



**Universidad del Azuay**

**Departamento de Posgrados**

Maestría en Desarrollo e Innovación de  
alimento

**DESARROLLO DE UN ALIMENTO  
SIMBIÓTICO A BASE DE CACAO A PARTIR  
DEL RESIDUO DE BANANO COMO  
PREBIÓTICO Y UNA MEZCLA COMERCIAL  
COMO PROBIÓTICO**

Autora:

**Thalía Lisseth Noles Romero**

Director:

**Dr. Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres**

**Cuenca – Ecuador**

**2025**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi madre, que ha sido el pilar fundamental en mi vida con su ejemplo de perseverancia y disciplina, me ha demostrado que cualquier meta se puede convertir en realidad.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por otorgarme la sabiduría y fortaleza para poder culminar con éxito esta etapa.

A mi hermana, por sus palabras de aliento y por su confianza en mi persona.

A mi director de tesis el Dr. Rodrigo Caroca, por su guía y orientación en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A los docentes de la maestría de D&I de la Universidad del Azuay, por el aporte de sus conocimientos para crecer profesionalmente.

## **RESUMEN:**

El aumento de enfermedades gastrointestinales, asociado al consumo excesivo de alimentos bajos en fibras y altos en grasa, ha impulsado en el ámbito científico el interés por el desarrollo de alimentos funcionales con efectos benéficos para la salud. El banano verde, dentro de la industria exportadora, es desechado semanalmente debido a los altos estándares de exportación, sin embargo, destaca su alto contenido de moléculas prebióticas. En el presente estudio se desarrolló un chocolate simbiótico enriquecido con prebióticos extraídos del banano y una mezcla comercial de probióticos. Para la extracción se utilizaron solventes, obteniendo  $251,24 \pm 16,75$  mg/ml de prebióticos con etanol al 70%. Los prebióticos y probióticos se encapsularon con alginato de sodio al 1% y 1,5%, y se evaluó la viabilidad de las bacterias probióticas presentes en el chocolate durante 45 días, manteniéndose por encima de  $10^6$  UFC/g, considerándose un alimento simbiótico.

**Palabras clave:** prebiótico, probiótico, microbiota intestinal, simbiótico, banano

## **ABSTRACT:**

The rise in gastrointestinal diseases, associated with the excessive consumption of low-fiber and high-fat foods, has spurred scientific interest in the development of functional foods with health benefits. Green bananas, within the export industry, are discarded weekly due to high export standards; however, they are notable for their high content of prebiotic molecules. In this study, a symbiotic chocolate enriched with prebiotics extracted from bananas and a commercial probiotic blend was developed. Solvents were used for extraction, yielding  $251.24 \pm 16.75$  mg/ml of prebiotics with 70% ethanol. The prebiotics and probiotics were encapsulated with 1% and 1.5% sodium alginate, and the viability of the probiotic bacteria in the chocolate was evaluated over 45 days, remaining above  $10^6$  CFU/g, thus qualifying it as a symbiotic food.

**Keywords:** prebiotic, probiotic, gut microbiota, symbiotic, banana.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
RESUMEN:.....	III
ABSTRACT:.....	III
CAPÍTULO 1 .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 2.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Estado del Arte.....	3
2.2. Marco Conceptual .....	5
2.2.1. Prebiótico .....	5
2.2.2. Probiótico .....	5
2.2.3. Alimentos simbióticos.....	6
2.2.4. Banano.....	6
2.2.4.1. Componentes del banano.....	7
2.2.5. Cacao.....	7
2.2.5.1. Componentes del cacao .....	7
CAPÍTULO 3.....	9
3. METODOLOGÍA .....	9
3.1. Implementación de una metodología para la extracción de prebióticos del banano ....	9
3.2. Secado de materia prima .....	9
3.2.1. Molienda y Tamizado de materia prima.....	9
3.2.2. Obtención de extractos acuosos y etanólicos de la pulpa y cáscara del banano .....	9
3.2.2.1. Extracción de probióticos desde la pulpa y cáscara de banano .....	9
3.2.2.2. Cuantificación de prebióticos del banano mediante UV-Visible .....	10
3.3. Evaluación del encapsulado del prebiótico y probiótico sometido a condiciones del tracto digestivo.....	11
3.3.1. Cuantificación de probióticos de la casa comercial.....	11
3.3.1.1. Preparación de medios de cultivo.....	11
3.3.1.2. Cultivo de probióticos a distintas diluciones.....	11
3.3.1.3. Determinación diversidad bacteriana en la mezcla probiótica mediante Tinción de Gram.....	12
3.3.1.4. Formulación de encapsulados con alginato de sodio y cloruro de calcio....	12
3.3.2. Análisis de resistencia de los probióticos encapsulados a la digestión <i>in vitro</i> ...	13
3.3.3. Cultivo de bacterias probióticas pre y posdigestión mediante la técnica recuento en placa.....	14
3.4. Formulación de chocolate 70% con prebióticos del banano y con una mezcla comercial de probióticos .....	14

3.4.1. Formulación del chocolate simbiótico.....	14
3.4.2. Análisis de viabilidad de bacterias probióticas en el chocolate.....	15
3.5. Análisis Estadístico .....	15
CAPÍTULO 4.....	16
4. RESULTADOS.....	16
4.1. Extracción de prebióticos del banano.....	16
4.1.1. Rendimiento de los extractos acuosos y etanólicos.....	16
4.2. Cuantificación de prebióticos mediante UV-Visible.....	16
4.3. Evaluación del encapsulado del prebiótico y probiótico sometido a condiciones del tracto digestivo .....	18
4.3.1. Cuantificación de bacterias probióticas de la casa comercial .....	18
4.3.2. Identificación bacteriana mediante Tinción de Gram .....	18
4.3.3. Microencapsulados de alginato de sodio al 1 y 1.5 %.....	19
4.3.4. Evaluación de los encapsulados digeridos y sin digerir mediante la técnica recuento en placa.....	20
4.4. Caracterización del chocolate enriquecido con prebióticos del banano y con una mezcla comercial de probióticos .....	21
4.4.1. Características físicas del chocolate probiótico.....	21
4.4.2. Análisis de viabilidad de bacterias probióticas en el chocolate simbiótico.....	21
CAPÍTULO 5.....	24
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	24
5.1. Discusión.....	24
5.2. Conclusiones .....	27
REFERENCIAS.....	28

## Índice de tablas y figuras

### Tablas

<b>Tabla 1.</b> .....	20
<i>Crecimiento de bacterias probióticas pre y post digestión en agar M17 y MRS al 1 y 1.5 % de alginato de sodio</i> .....	20

### Figuras

<b>Figura 1.</b> .....	10
<i>Flujograma extracción de prebióticos del banano</i> .....	10
<b>Figura 2.</b> .....	11
<i>Flujograma cuantificación de prebióticos</i> .....	11
<b>Figura 3.</b> .....	12

<i>Flujograma cuantificación de probióticos</i> .....	12
<b>Figura 4.</b> ....	14
<i>Flujograma formulación y evaluación de encapsulados</i> .....	14
<b>Figura 5.</b> .....	15
<i>Flujograma de formulación y evaluación de chocolate simbiótico</i> .....	15
<b>Figura 6.</b> .....	17
<i>Curva de calibración de inulina a 490 nm</i> .....	17
<b>Figura 7.</b> .....	18
<i>Cuantificación de prebióticos en los distintos tipos de extractos, siendo utilizado para la experimentación el extracto de pulpa con etanol al 70%. Los resultados son expresados en mg de prebiótico por ml de solución</i> .....	18
<b>Figura 8.</b> .....	19
<i>Observación de géneros bacterianos Lactobacillus y Enterococcus al microscopio.</i> .....	19
<b>Figura 9.</b> .....	21
<i>Chocolate simbiótico enriquecido con prebióticos del banano y probióticos (Proflora performance)</i> .....	21
<b>Figura 10.</b> .....	22
<i>Crecimiento de bacterias probióticas a los días 5, 10, 15, 30 y 45 de almacenamiento del chocolate simbiótico. Los medios de cultivo empleados fueron M17 y MRS.</i> .....	22

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> .....	35
<i>ANOVA de 1 factor sobre el crecimiento de bacterias probióticas de Proflora performance</i> ...	35
<b>Anexo 2.</b> .....	35
<i>Prueba de Anderson Darling sobre el crecimiento de bacterias probióticas de Proflora performance</i> .....	35
<b>Anexo 3.</b> .....	35
<i>Significancias sobre el crecimiento de bacterias probióticas pre y post digestión en agar M17 y MRS al 1 y 1.5% de alginato de sodio</i> .....	35
<b>Anexo 4.</b> .....	36
<i>Significancias sobre el crecimiento de bacterias probióticas pre y post digestión en agar M17 y MRS al 1 y 1.5% de alginato de sodio</i> .....	36
<b>Anexo 6.</b> .....	36
<i>Análisis de varianza de crecimiento de bacterias probióticas al 1 y 1.5% en los medios MRS y M17</i> .....	36
<b>Anexo 7.</b> .....	37
<i>Anova de 1 factor sobre el crecimiento de bacterias probióticas a lo largo de 45 días</i> .....	37
<b>Anexo 8.</b> .....	37
<i>Prueba de Tukey sobre el crecimiento de bacterias probióticas a lo largo de 45 días</i> .....	37
<b>Anexo 9.</b> .....	38
<i>Prueba de Normalidad de Anderson Darling del crecimiento bacteriano vs días</i> .....	38

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se ha evidenciado una creciente preocupación en la población por la salud intestinal, lo que ha llevado a la evolución del concepto de nutrición al de “nutrición adecuada”, que mejore la calidad de vida y el bienestar de los consumidores (Sender et al., 2016). Por lo tanto, dentro de la investigación científica y la industria alimentaria se han desarrollado alimentos funcionales que, además de los nutrientes básicos, aporten nutrientes con actividad selectiva en algunas funciones del organismo, con efecto fisiológico sobre órganos diana que contribuyan a la prevención de enfermedades crónicas (Silveira et al., 2003).

El término alimento funcional se originó en Japón hace aproximadamente 40 años atrás. Dentro de este grupo de alimentos destacan los productos simbióticos, que consisten en la combinación de prebióticos y probióticos. Los prebióticos son sustancias no digeribles por los humanos que estimulan el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino, lo que contribuye a una microbiota saludable. Un ejemplo de prebiótico son los fructooligosacáridos. Por otro lado, los probióticos son microorganismos vivos, entre los cuales se encuentran los géneros bacterianos *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Al trabajar concomitantemente, estos dos componentes han demostrado beneficios positivos en la salud digestiva, previniendo enfermedades relacionadas con el desequilibrio de la microbiota intestinal (Durán & Valenzuela, 2010).

El banano, consumido globalmente en grandes cantidades, es apreciado por su valor nutricional, aportando carbohidratos, vitaminas, macronutrientes y micronutrientes (Martínez-Solórzano & Rey-Brina, 2021). Su contenido de almidón resistente le confiere propiedades prebióticas, favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, que mediante procesos bioquímicos fermentan carbohidratos no digeribles, produciendo ácidos grasos de cadena corta (Martínez, 2015).

Ecuador es un importante exportador de banano, pero una fracción considerable de la producción se desecha debido a los estrictos estándares de exportación, que incluyen criterios como daños en la fruta, grosor, número de manos del racimo y otras alteraciones



durante el proceso de maduración. Este rechazo representa una valiosa fuente de prebióticos que podría ser aprovechada (Dadzie & Orchard, 1997).

El banano, por su contenido de prebióticos naturales, podría utilizarse como un vehículo para la administración de cepas bacterianas probióticas seleccionadas. La adición de estas bacterias vivas al banano potenciaría sus efectos beneficiosos, enriqueciendo la microbiota intestinal y contribuyendo a mejorar la digestión y fortalecer el sistema inmunitario (Reyes et al., 2012)

Ecuador, reconocido internacionalmente como un importante exportador de cacao, ofrece una amplia gama de productos derivados, desde polvos y barras de chocolate hasta bebidas alcohólicas (Hoper et al., 2012). Dada la creciente evidencia sobre los efectos beneficiosos del cacao para la salud, la adición de prebióticos y probióticos podría enriquecer aún más su valor nutricional, transformándolo en un alimento simbiótico con el potencial de mejorar la salud intestinal de la población (Pereira & Maraschin, 2015).

Por lo anteriormente expuesto, esta investigación se centra en el desarrollo de un chocolate simbiótico enriquecido con prebióticos derivados del banano y una mezcla comercial de probióticos, contribuyendo así al desarrollo de alimentos funcionales con potencial para mejorar la salud intestinal.

## CAPÍTULO 2

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Estado del Arte

La investigación en alimentación funcional ha ganado considerable atención en la exploración del potencial de ingredientes específicos para mejorar la salud y el bienestar. En este contexto, el enriquecimiento de productos como el cacao con compuestos bioactivos, prebióticos y probióticos se ha convertido en un área de interés creciente (Obayomi et al., 2024). Este enriquecimiento busca no solo optimizar las características del producto final, sino también contribuir a la prevención de enfermedades crónicas, como las cardiovasculares y los trastornos cerebrales (Obayomi et al., 2024).

La implementación de alimentos simbióticos, que combinan prebióticos y probióticos, emerge como una estrategia prometedora para abordar las deficiencias en la calidad de la alimentación contemporánea. Madrigal & Sangronis (2007) señalan que factores como el sedentarismo y el consumo excesivo de grasas saturadas han impactado negativamente en los hábitos alimentarios, generando un creciente interés en alternativas nutricionales que promuevan la salud intestinal.

En este contexto, los alimentos simbióticos, al combinar prebióticos y probióticos, ofrecen un enfoque integral para mejorar la microbiota intestinal. Los prebióticos, como la inulina y los fructooligosacáridos (FOS) (Soto, 2010; Madrigal & Sangronis, 2007), son sustratos no digeribles que estimulan el crecimiento y la actividad de bacterias beneficiosas en el colon. Por otro lado, los probióticos, como las bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, son microorganismos vivos que, al ser consumidos en cantidades adecuadas, pueden ejercer efectos beneficiosos en la salud intestinal y general.

El banano se presenta como una fuente potencial de prebióticos para la formulación de alimentos simbióticos. Estudios clínicos han demostrado que la suplementación con prebióticos derivados del banano puede modular la composición de la microbiota intestinal y reducir la inflamación en individuos con síndrome del intestino irritable (SII) (López-Siles et al., 2017). Esta fruta también contiene almidones resistentes que, al resistir la digestión en el intestino delgado y ser fermentados en el colon, favorecen la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), con efectos beneficiosos para la salud intestinal (Olaya et al., 2021).

En línea con esta evidencia, Jiménez et al. (2002) concluyeron que la harina de banana presenta potencial prebiótico y podría ser una alternativa a la inulina para diversificar las fuentes de prebióticos en la dieta. La optimización de las propiedades de los alimentos funcionales, como los simbióticos, también ha sido objeto de investigación. Caballero et al. (2022) han explorado el uso de tecnologías emergentes de procesamiento, como el ultrasonido de alta intensidad y la tecnología de luz pulsada, para mejorar la supervivencia de los probióticos y potenciar los beneficios para la salud de los alimentos simbióticos.

Chacón et al. (2021) investigaron el efecto del enriquecimiento del chocolate negro con frutas, especias, probióticos (principalmente *Lactobacillus*) y prebióticos (como la inulina y la goma xantana). Sus hallazgos proporcionan información valiosa sobre cómo estos ingredientes influyen en las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes del chocolate negro, con posibles implicaciones para la salud cardiovascular y cerebral. Además, el cacao 70% (o más) es reconocido por su contenido de compuestos bioactivos, como flavonoides y fibras, que pueden ejercer efectos prebióticos. El uso de cacao al 70% como base para productos simbióticos representa, por lo tanto, una estrategia prometedora para el desarrollo de alimentos funcionales (Shin et al., 2022).

El Biocodex Microbiota Institute (2024) sugiere que el consumo de chocolate oscuro con 70% de cacao puede modular positivamente la microbiota intestinal, favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, actuando como un prebiótico. En línea con esto, una revisión bibliográfica sobre chocolates funcionales con probióticos, como los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Bifidobacterium*, demostró que estas formulaciones mejoran tanto las propiedades sensoriales como los beneficios nutricionales, manteniendo la viabilidad de los probióticos en el producto final. Este estudio también indicó que la incorporación de probióticos en forma liofilizada o microencapsulada, preferiblemente después del templado, es crucial para garantizar su viabilidad en el tracto gastrointestinal (Aji Muhammad et al., 2021).

Konar et al. (2021) demostraron la viabilidad de incorporar los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei* en chocolate blanco tras el proceso de conchado, con una concentración inicial de 9.00 log UFC por 25 g. Tras 90 días de

almacenamiento, ambos probióticos mantuvieron una viabilidad superior a 6.61 log UFC/25 g, destacándose *L. acidophilus* por sus mayores niveles de viabilidad en comparación con *L. paracasei*. En chocolate con leche, la viabilidad de las cepas probióticas también superó los 5.90 log UFC/25 g, con resultados similares en la comparación entre cepas.

Por lo tanto, la investigación actual destaca la importancia de la alimentación funcional y el uso de ingredientes específicos, como los prebióticos y probióticos, en la mejora de la salud intestinal y general. El enriquecimiento de productos como el cacao y la aplicación de tecnologías emergentes ofrecen nuevas perspectivas para el desarrollo de alimentos más saludables y funcionales.

## **2.2. Marco Conceptual**

### **2.2.1. Prebiótico**

Los prebióticos se definen como componentes alimenticios no digeribles que estimulan el crecimiento y la actividad de bacterias beneficiosas en el intestino humano (Castañeda Guillot, 2018). Estos compuestos, principalmente oligosacáridos y polisacáridos no amiláceos como los fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), inulina y lactulosa, son fermentados por la microbiota colónica, produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como butirato, propionato y acetato. Estos AGCC desempeñan un papel fundamental en la salud intestinal, incluyendo la reducción del pH colónico, la modulación de la respuesta inmunitaria a través de la producción de citocinas antiinflamatorias y el fortalecimiento de la barrera intestinal (Obayomi et al., 2024).

Los prebióticos pueden obtenerse de fuentes naturales como el plátano, la cebolla, el ajo, los espárragos y la raíz de achicoria, o producirse industrialmente a partir de sustratos como el almidón o la lactosa (Corzo et al., 2015).

### **2.2.2. Probiótico**

Los probióticos son microorganismos vivos que, al administrarse en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped (Hill et al., 2014). Estos microorganismos, entre los que se encuentran ciertas cepas de bacterias y levaduras, pueden colonizar el tracto gastrointestinal y ejercer efectos beneficiosos como la mejora de la digestión, el fortalecimiento del sistema inmunitario y la prevención de

enfermedades intestinales (Galdeano et al., 2015). Adicionalmente, contribuyen al equilibrio de la microbiota intestinal, lo que se traduce en efectos positivos tanto para la salud gastrointestinal como para la salud general (Plaza-Díaz et al., 2019).

Los probióticos tienen la capacidad de modificar la composición de la microbiota intestinal e inhibir el crecimiento de patógenos perjudiciales, favoreciendo así la producción de inmunoglobulina A (IgA) por parte del huésped. Asimismo, contribuyen al fortalecimiento de la barrera intestinal al mantener la integridad de las uniones estrechas y fomentar la producción de mucina. Además, los probióticos pueden influir en el sistema inmune mediante la regulación de la liberación de citoquinas a través de vías de señalización como el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), lo que modula la proliferación y diferenciación de las células inmunitarias y epiteliales (Mohammed et al., 2024).

### **2.2.3. Alimentos simbióticos**

Los alimentos simbióticos son productos que contienen tanto prebióticos como probióticos en cantidades específicas. Esta combinación sinérgica busca promover el crecimiento y la actividad de bacterias beneficiosas en el intestino, proporcionando un entorno favorable para su supervivencia y función (Markowiak & Śliżewska, 2017). Entre los ejemplos de alimentos simbióticos desarrollados a lo largo de la historia alimentaria se encuentran: el yogur enriquecido con prebióticos como la inulina y los FOS, que pueden obtenerse de fuentes como la espinaca; el kéfir (similar al yogur), enriquecido con frutas y semillas ricas en fibras; el pan integral con semillas y levaduras probióticas; y el chucrut casero con la adición de prebióticos presentes en el ajo y la cebolla; entre otros (Kamali et al., 2021).

### **2.2.4. Banano**

El banano (*Musa cavendish*) es una fruta tropical ampliamente consumida en todo el mundo y cultivada en regiones tropicales y subtropicales debido a su alto valor nutricional y versatilidad. Botánicamente, el banano es una baya que crece en racimos en plantas herbáceas perennes de rápido crecimiento. Además de ser una fuente rica en fibra dietética, vitaminas y minerales, el banano contiene compuestos bioactivos, incluyendo prebióticos, que pueden promover la salud intestinal y contribuir al bienestar general (Pereira & Maraschin, 2015). El consumo de banano tiene un impacto positivo en la salud

humana, ayudando a regular la presión arterial, mejorar la digestión y proporcionar energía rápida, lo que lo convierte en un alimento adecuado para deportistas y dietas equilibradas. Su alta disponibilidad, bajo costo y valor nutricional lo convierten en un elemento clave en la seguridad alimentaria y en la economía agrícola global.

#### **2.2.4.1. Componentes del banano**

Los bananos contienen una variedad de compuestos bioactivos, incluyendo fenoles, carotenoides, aminos biogénicas y fitoesteroles, que ofrecen beneficios para la salud y el bienestar. Estos componentes contribuyen a mantener niveles saludables de radicales libres, permitiendo que estos desempeñen sus funciones biológicas esenciales sin causar daño celular y previniendo así la aparición de enfermedades. En cuanto a su potencial prebiótico, el banano contiene inulina como principal componente que promueve el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino, mejorando la salud digestiva y la regularidad intestinal. Por lo tanto, la incorporación de banano en la dieta ofrece una estrategia efectiva para fortalecer el equilibrio microbiano y mejorar el bienestar general (López-Siles et al., 2017). Según Zhang et al., (2005), refiere que el banano en su estado inmaduro tiene un alto contenido en almidón resistente, una fibra que posee alta capacidad prebiótica; a medida que aumenta su grado de maduración el almidón se transforma en azúcares simples lo que reduce su contenido prebiótico.

#### **2.2.5. Cacao**

El cacao es un fruto cuyas semillas se utilizan como ingrediente principal en la elaboración de diversos productos, entre los que destaca el chocolate. Según Lujano et al. (2019), el cacao, especialmente en su forma no procesada, contiene un alto contenido de flavonoides, como las catequinas y las epicatequinas, que se asocian con diversos beneficios para la salud, principalmente en la prevención de enfermedades cardiovasculares y la mejora de la circulación sanguínea.

##### **2.2.5.1. Componentes del cacao**

El cacao posee propiedades antioxidantes e inflamatorias, razón por la cual se utiliza tanto para fines medicinales como alimenticios, debido a su contenido en minerales como magnesio, potasio, cobre y zinc, así como vitaminas de los grupos B y C (Kongor et al., 2016).

Además de los flavonoides, el cacao contiene una variedad de nutrientes esenciales, como fibra dietética, minerales y ácidos grasos saludables. La fibra dietética, particularmente la fibra soluble, actúa como sustrato fermentable para las bacterias beneficiosas en el colon, estimulando el crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, géneros bacterianos estrechamente asociados con la mejora de la salud intestinal (Steinberg et al., 2003). Se ha estudiado el efecto prebiótico del cacao en diversos modelos *in vitro*, mostrando que las fibras del cacao pueden potenciar la producción de AGCC como el butirato, que tiene efectos antiinflamatorios y beneficia la función de barrera intestinal (Hayek, 2013).

Investigaciones como la de Perea et al. (2009) han demostrado los beneficios de ingredientes específicos, como las semillas de cacao alcalinizado, en la promoción de una microbiota intestinal saludable debido a su contenido de prebióticos.

## **CAPÍTULO 3**

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Implementación de una metodología para la extracción de prebióticos del banano**

Para determinar la metodología que proporcione un mayor rendimiento de prebióticos se aplicó agitación con etanol al 50%, etanol al 70%, agua desionizada y agua destilada con la pulpa y cáscara del banano.

#### **3.2. Secado de materia prima**

Las pulpas y cáscaras de banano verde (*Musa cavendish*) se separaron manualmente para su análisis individual. Posteriormente, se cortaron en rebanadas de 0.5 cm de grosor y se lavaron con agua destilada, con el objetivo de eliminar impurezas presentes (Bonik et al., 2024). Las muestras se colocaron en un deshidratador (TECNOPAST, Italia) por un lapso de 24 horas a 18°C, con la finalidad de extraer el agua del producto y facilitar su proceso de trituración, aplicando el procedimiento establecido por Álvarez et al., (2007) con ligeras modificaciones.

##### **3.2.1. Molienda y Tamizado de materia prima**

Los trozos de pulpa y cáscara secos, se colocan en un molino (KRUPS, México) por un lapso de 5 minutos, posterior a este proceso se colocó la masa pulverizada en los tamices (LABALPHA, EEUU) en orden descendente, obteniéndose un polvo de diámetro de 0.45 mm.

##### **3.2.2. Obtención de extractos acuosos y etanólicos de la pulpa y cáscara del banano**

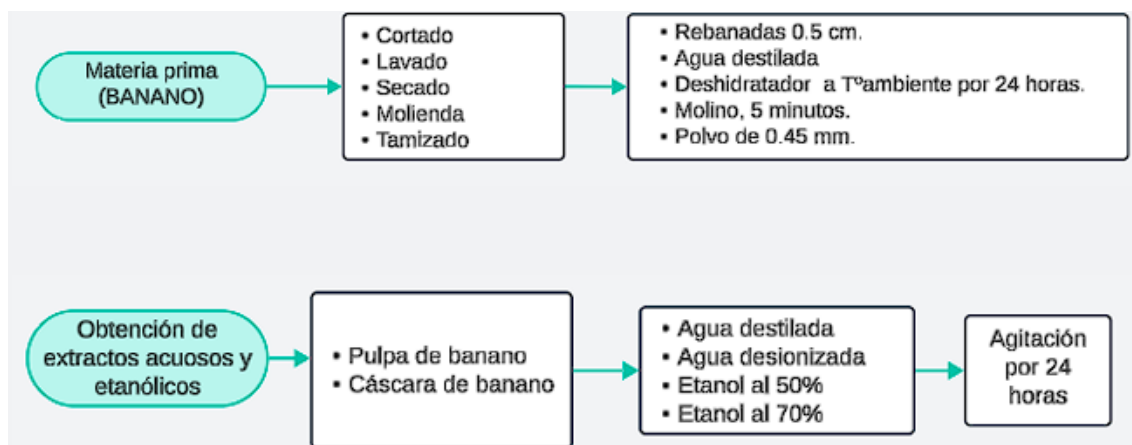
La metodología de extracción se basó en el artículo de Corzo et al., (2016).

###### **3.2.2.1. Extracción de prebióticos desde la pulpa y cáscara de banano**

Se colocó una proporción 1:10 soluto (pulpa, cáscara): solvente (agua destilada, agua desionizada, etanol al 50% y al 70%) en un frasco ámbar. Posteriormente, se colocó los extractos en un rodillo (THERMO SCIENTIFIC, Alemania) con agitación por 24 horas. Transcurrido el tiempo de agitación, se centrifugó (ST8R, THERMO SCIENTIFIC, Alemania) el extracto a una temperatura de 4°C a una velocidad de 3000 rpm por un tiempo de 5 minutos para evitar la presencia de partículas sólidas en el



extracto. A continuación, se puso el extracto resultante en tubos y se dejó por 8 horas en un concentrador al vacío (RVC 2-18 CD plus, CHRIST, Alemania) a una temperatura de 40°C, para evaporar el solvente. Por último, se almacenó el extracto final en congelación a -20°C hasta su uso.



**Figura 1.**

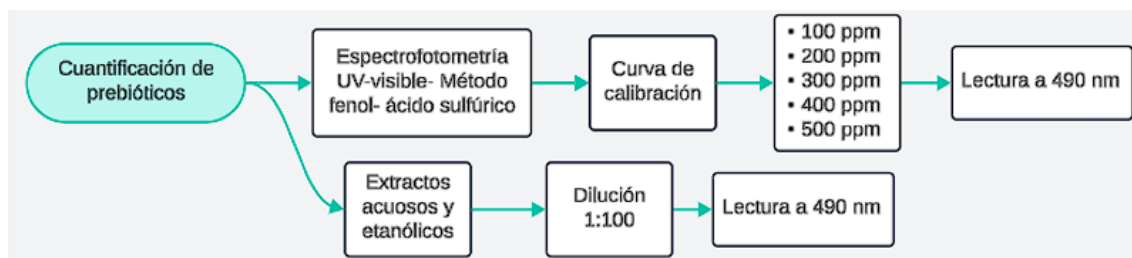
*Flujograma extracción de prebióticos del banano*

### 3.2.2.2. Cuantificación de prebióticos del banano mediante UV-Visible

La cuantificación de los prebióticos presentes, como la inulina, además de otros carbohidratos como almidón, FOS (fructooligosacáridos) y azúcares simples, en las muestras se realizó mediante espectrofotometría UV-Visible utilizando el método de fenol-ácido sulfúrico (Zhang et al., 2005). Este método permite detectar la concentración de carbohidratos totales. Inicialmente, se prepararon soluciones estándar del prebiótico inulina en concentraciones conocidas (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL), disolviendo el compuesto en agua destilada. Paralelamente, las muestras de los extractos que contenían prebióticos se diluyeron a una concentración 1:100 para asegurar que los valores de absorbancia estuvieran dentro del rango lineal de la curva estándar.

Para la reacción colorimétrica, se pipetearon 0.5 mL de la muestra o estándar en tubos de ensayo, a los cuales se añadieron 0.5 mL de una solución de fenol al 5% (p/v), seguido de la adición rápida de 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se dejó reposar durante 10 minutos para permitir el desarrollo del color amarillo. Posteriormente, los tubos se enfriaron en un baño de agua a temperatura ambiente durante 20 minutos. La absorbancia de las muestras y los estándares se midió a 490 nm utilizando un

espectrofotómetro UV-Visible (EPOCH, BIOTEK, EEUU). Los valores de absorbancia de las muestras se compararon con la curva de calibración generada a partir de las soluciones estándar para calcular la concentración de prebióticos en las muestras analizadas (López et al., 2017). El proceso se realizó por triplicado para garantizar la precisión y reproducibilidad de los resultados.



**Figura 2.**

*Flujograma cuantificación de prebióticos*

### **3.3. Evaluación del encapsulado del prebiótico y probiótico sometido a condiciones del tracto digestivo**

Para evaluar los encapsulados se realizó una formulación previa y se cuantificó el crecimiento de bacterias probióticas mediante la técnica recuento en placa.

#### **3.3.1. Cuantificación de probióticos de la casa comercial**

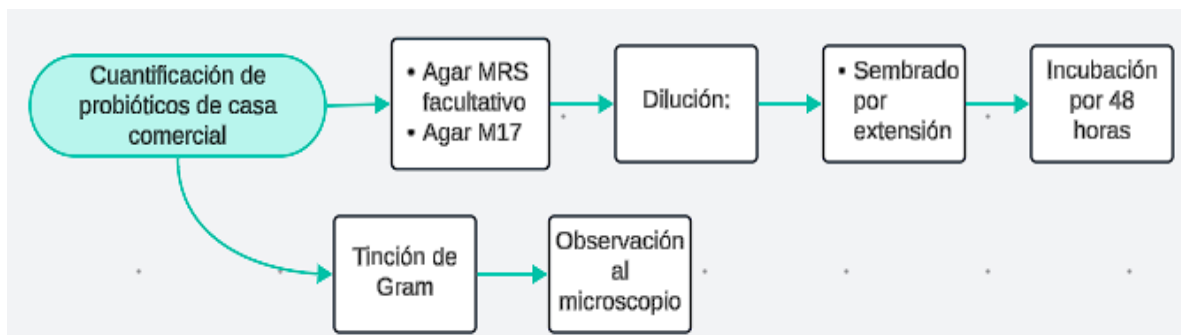
##### **3.3.1.1. Preparación de medios de cultivo**

Se prepararon los medios de cultivo MRS Agar y M17 Agar de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Condalab), considerado 52.25g y 33.25g por litro de agua destilada, respectivamente. Las soluciones resultantes fueron esterilizadas en autoclave (2540 MLV, TUTTNAUER, Israel) a 121°C durante 15 minutos. Tras la esterilización y manteniendo condiciones estériles, se vertió los medios en las placas Petri, y se dejó solidificar por 20 minutos. Se realizó por triplicado.

##### **3.3.1.2. Cultivo de probióticos a distintas diluciones**

En un tubo de ensayo con 18 ml de peptona se colocó 2g del polvo probiótico *Proflora performance (Prosirios)*, formando una dilución  $10^{-1}$ , posterior a la disolución en tubos de ensayo con 9 ml de peptona se adicionó 1ml de la dilución anterior, formando una dilución  $10^{-2}$ , de esta manera sucesivamente se formaron las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ . Luego de obtener las diluciones, se tomaron 100µl de las diluciones  $10^{-1}$

<sup>7</sup> y  $10^{-8}$  y se colocaron en cada medio de cultivo sembrando por extensión con ayuda de un rastrillo microbiológico. Las placas inoculadas fueron incubadas (Isotherm, ESCO, Singapur) a 37°C en cajas de anaerobiosis en el caso de las placas con MRS y a 30°C durante 48 horas las de M17 Agar. Finalizada la incubación, se observaron las colonias formadas y se realizó el recuento de estas para evaluar el crecimiento del probiótico (Sánchez et al., 2017). Se realizó el proceso por triplicado.



*Flujograma cuantificación de probióticos*

### 3.3.1.3. Determinación diversidad bacteriana en la mezcla probiótica mediante Tinción de Gram

Las diversas de colonias bacterianas identificadas en el cultivo de probióticos, se analizaron mediante tinción de Gram y se observó la forma bacteriana relacionándola con el tipo de género bacteriano probiótico presente (Rodríguez & Arena, 2018).

### 3.3.1.4. Formulación de encapsulados con alginato de sodio y cloruro de calcio

Se realizó el encapsulado usando alginato de sodio en concentraciones de 1% y 1.5% (m/v). Se prepararon las concentraciones antes mencionadas en 200 ml del extracto prebiótico del banano al 90% y se agitó en la placa calefactora (TOPO MS300HS, Korea) a temperatura ambiente con la ayuda de una barra magnética. Al obtener una solución uniforme, se adicionó 0.1 g de polvo probiótico por cada mililitro de solución prebiótica. La cantidad del probiótico está basada en la cuantificación previa de este producto comercial (*Prosirios*). La solución obtenida se dejó en agitación por 20 minutos, para que todos los componentes se incorporen de manera homogénea. Para la formación de las cápsulas se empleó el método de gelificación iónica. Con la ayuda de una micropipeta de 1000 $\mu$ l (DRAGON LAB, Malasia) se procedió a llenar con la solución obtenida y se depositó por goteo en una solución de cloruro de calcio al 1.5% a 5 cm de distancia y de manera constante. Este proceso facilitó la formación de cápsulas sólidas, las que se

dejaron reposar por un periodo de 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, las cápsulas fueron retiradas de la solución de cloruro de calcio y se tamizaron en un colador, donde fueron lavadas con abundante agua destilada con la finalidad de eliminar el exceso de cloruro de calcio de su superficie externa. Una vez lavadas las cápsulas fueron colocadas en la estufa (Isotherm, ESCO, Singapur) a una temperatura de 26°C, por un periodo estimado de 12 horas con la finalidad de eliminar la humedad (Muchiutti et al., 2019).

### **3.3.2. Análisis de resistencia de los probióticos encapsulados a la digestión *in vitro***

Previo al análisis *in vitro* de los encapsulados a condiciones del tracto digestivo se prepararon soluciones stock de sales de saliva, gástrico, duodenal y biliar con pH similar al organismo (Serena-Romero et al., 2023).

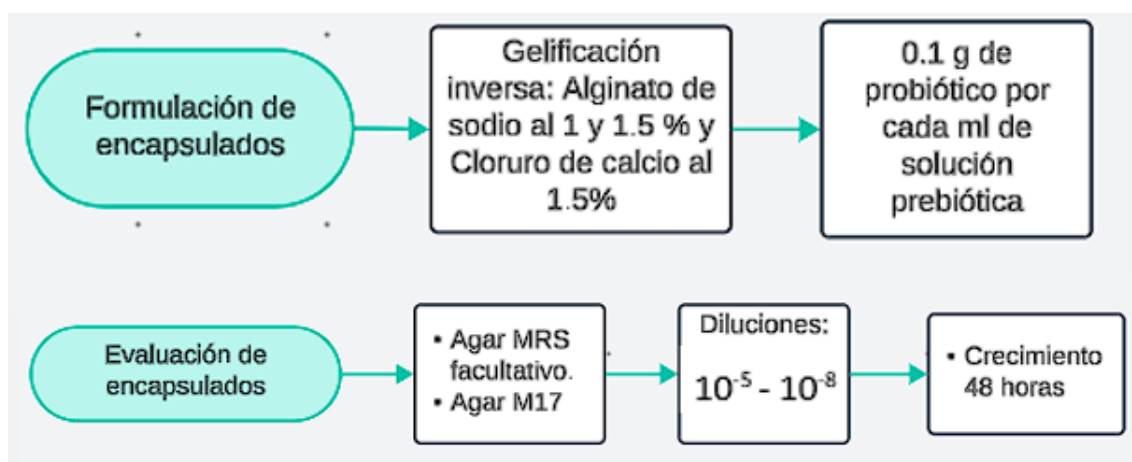
Para la preparación de la solución stock de saliva se utilizó: 58,5 mg de Cloruro de sodio (NaCl), 74,5 mg de Cloruro de potasio (KCl), 1,05 g Carbonato ácido de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), 0,2 g de Urea (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>). En la solución stock gástrica se empleó 2,72 g de Cloruro de sodio (NaCl), 0,82 g de Cloruro de potasio (KCl), 0,08 g de Urea (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 0,26 g de Fosfato de sodio monobásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,39 g de Cloruro de calcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>· 2H<sub>2</sub>O), 0,306 g de Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl). En cuanto a las soluciones stock duodenal se utilizó: 7,01 g de Cloruro de sodio (NaCl), 0,56 g de Cloruro de potasio (KCl), 3,38 g Carbonato ácido de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), 0,1 g de Urea (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 80 mg de Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y 50 mg de Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). En lo referente a la solución biliar se formó con: 5,25 g de Cloruro de sodio (NaCl), 0,37 g de Cloruro de potasio (KCl), 5,78 g Carbonato ácido de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) y 0,25 g de Urea (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)

En un tubo Falcon de 50 ml se adicionó 1 g de encapsulado (1 y 1.5% alginato), previamente triturado y se colocó 5 ml de solución stock de saliva y alfa-amilasa por un lapso de tiempo de 10 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo se agregó 10 ml de solución gástrica y bromelina por un periodo de 2 horas a 37°C, luego se añadió 12 ml de solución duodenal con las enzimas lipasa y pancreatina concomitante se anexó 3 ml de solución biliar y sales biliares por un transcurso de 2 horas a 37°C. Para cesar las reacciones se colocó los tubos en hielo por 20 minutos y finalmente se centrifugó el extracto restante a 9000 RPM a 4°C (ST8R, THERMO SCIENTIFIC, Alemania) (Serena-Romero et al.,

2023). El sobrenadante obtenido contiene a las bacterias probióticas que cumplirán una función homeostática en el organismo.

### 3.3.3. Cultivo de bacterias probióticas pre y posdigestión mediante la técnica recuento en placa

En un tubo de ensayo con 9 ml de peptona se colocó 1 g de encapsulados sin digerir y 1 ml de sobrenadante obtenido de la digestión antes mencionada. En ambos casos con cápsulas formuladas con 1 y 1.5% de alginato. Se realizó diluciones seriadas aplicando el mismo protocolo del punto 3.3.1.2.



**Figura 4.**

*Flujograma formulación y evaluación de encapsulados*

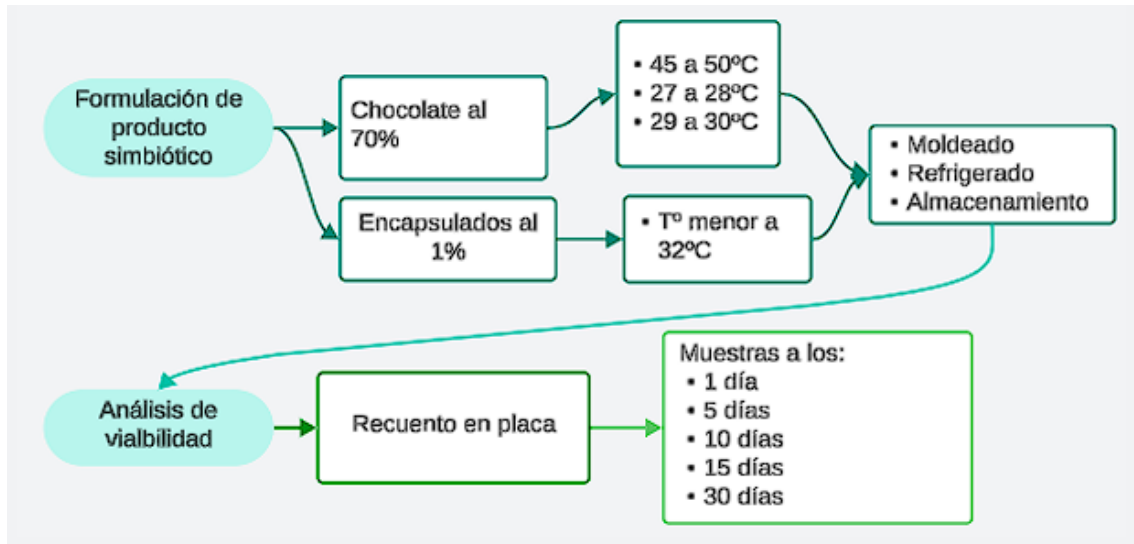
## 3.4. Formulación de chocolate 70% con prebióticos del banano y con una mezcla comercial de probióticos

### 3.4.1. Formulación del chocolate simbiótico

Se fundió 250 g de chocolate al 70%, hasta alcanzar una temperatura de 45 a 50°C. Durante el proceso de templado del chocolate, se aplicó tres temperaturas, con la finalidad de optimizar la textura y conservación del chocolate. La primera temperatura se mantuvo entre 45 a 50°C, la segunda entre 27 y 28°C y la tercera, considerándose una temperatura óptima para la adición de los Microencapsulados, se estableció entre 29 y 30°C, garantizando su supervivencia. Una vez finalizado el proceso de templado, se colocó el chocolate fundido en los respectivos moldes (bloques de 5g aproximadamente) y se adicionó 1 g de encapsulados por cada bloque. Se colocó en la nevera a una temperatura de 4°C por 20 a 30 minutos para endurecer chocolate (Villafuerte et al., 2024).

### 3.4.2. Análisis de viabilidad de bacterias probióticas en el chocolate

En una funda Whirl-pak estéril se colocó 45 ml de agua peptonada y 5g de chocolate con la mezcla simbiótica. Se desintegró el bloque de chocolate con la ayuda de un homogeneizador (SCIENTZ- 11 GERMFREE, China) se realizaron y sembraron diluciones seriadas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.1.2 (Sánchez et al., 2017). Este proceso se realizó los días 5, 10, 15, 30 y 45 por triplicado.



**Figura 5.**

*Flujograma de formulación y evaluación de chocolate simbiótico*

### 3.5. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en el transcurso de la investigación fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza para la viabilidad de bacterias antes y después de la digestión a concentraciones del 1 y 1.5 % de alginato de sodio; y el software estadístico Minitab (Minitab, LLC, EEUU), para la cuantificación de bacterias probióticas durante 45 días, posterior a la misma, se aplicó una prueba Tukey HSD, para evaluar diferencias significativas.

## **CAPÍTULO 4**

### **4. RESULTADOS**

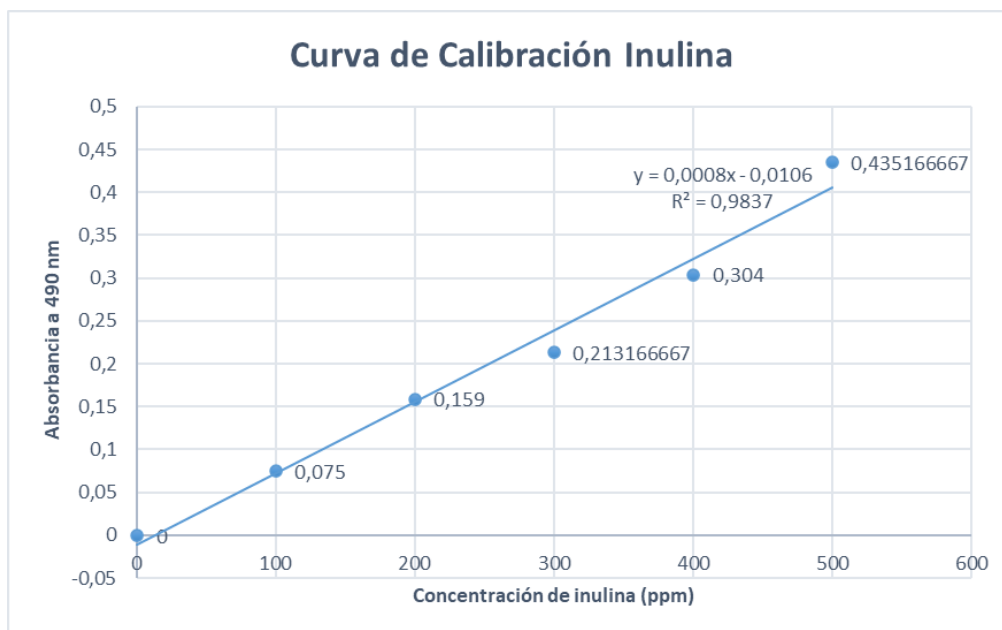
#### **4.1. Extracción de prebióticos del banano**

##### **4.1.1. Rendimiento de los extractos acuosos y etanólicos**

Los rendimientos de los extractos de la cáscara y pulpa de banano obtenidos tras el proceso de centrifugación y concentración durante 8 horas mostraron que, en los extractos etanólicos al 50 y 70%, se obtuvo un rendimiento del 33 y 34.5%, respectivamente. En contraste, los extractos acuosos obtuvieron un rendimiento del 90%. Estos rendimientos se basan en la cantidad de materia prima inicial utilizada.

#### **4.2. Cuantificación de prebióticos mediante UV-Visible**

Previo a la cuantificación de los prebióticos presentes en los extractos, los datos obtenidos en la curva de calibración muestran la relación entre la concentración de inulina (ppm) y la absorbancia medida a 490 nm. Se observa un incremento progresivo en la absorbancia conforme aumenta la concentración de inulina, con valores que van desde 0 hasta 0,435. Los resultados evidencian una relación lineal directa y proporcional entre la concentración de inulina y la señal analítica obtenida a 490 nm (*figura 6*). La ecuación de calibración generada a partir de estos datos ( $y = 0.0008x - 0.0106$ ), muestran una relación lineal altamente significativa ( $r^2 = 0.987$ ), lo que permite cuantificar de manera precisa y confiable la concentración de inulina, FOS, almidón y azúcares simples en los extractos. Estos hallazgos corroboran la viabilidad del método espectrofotométrico empleado para la cuantificación precisa de inulina en el rango de concentraciones analizado.



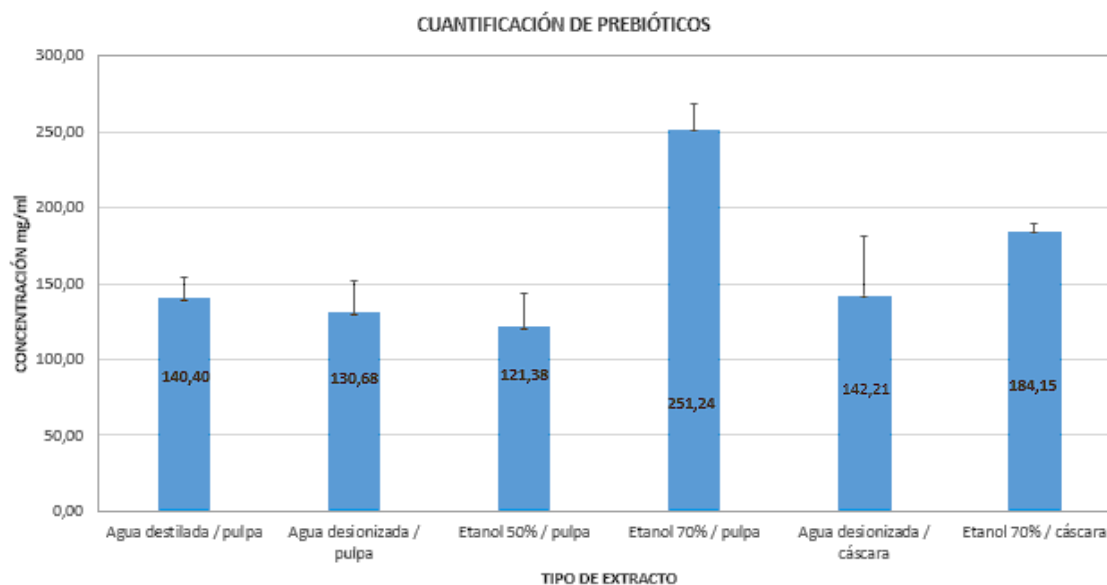
**Figura 6.**

*Curva de calibración de inulina a 490 nm*

Las concentraciones de carbohidratos totales, entre los cuales se encuentran inulina, FOS, almidón y azúcares simples, se observan en la figura 7. Para la pulpa, el extracto con agua destilada presentó un contenido promedio de prebióticos de  $140,40 \pm 13,55$  mg/ml, mientras que con agua desionizada fue de  $130,68 \pm 21,43$  mg/ml. En los extractos con etanol, el de concentración al 50 % tuvo un valor de  $121,38 \pm 21,73$  mg/ml, mientras que el de etanol al 70 % mostró el mayor contenido, con  $251,24 \pm 16,75$  mg/ml.

En cuanto a los extractos de cáscara, la extracción con agua desionizada resultó en una concentración de  $142,21 \pm 39,33$  mg/ml, mientras que con etanol al 70 % el contenido fue de  $184,15 \pm 4,97$  mg/ml. Estos resultados sugieren que tanto el tipo de solvente como la parte del material vegetal influyen significativamente en la extracción de prebióticos. El etanol al 70 % resultó ser el solvente más eficiente en ambos casos y la pulpa del banano es el extracto con mayor cuantificación prebiótica.





**Figura 7.**

*Cuantificación de prebióticos en los distintos tipos de extractos, siendo utilizado para la experimentación el extracto de pulpa con etanol al 70%. Los resultados son expresados en mg de prebiótico por ml de solución.*

### **4.3. Evaluación del encapsulado del prebiótico y probiótico sometido a condiciones del tracto digestivo**

#### **4.3.1. Cuantificación de bacterias probióticas de la casa comercial**

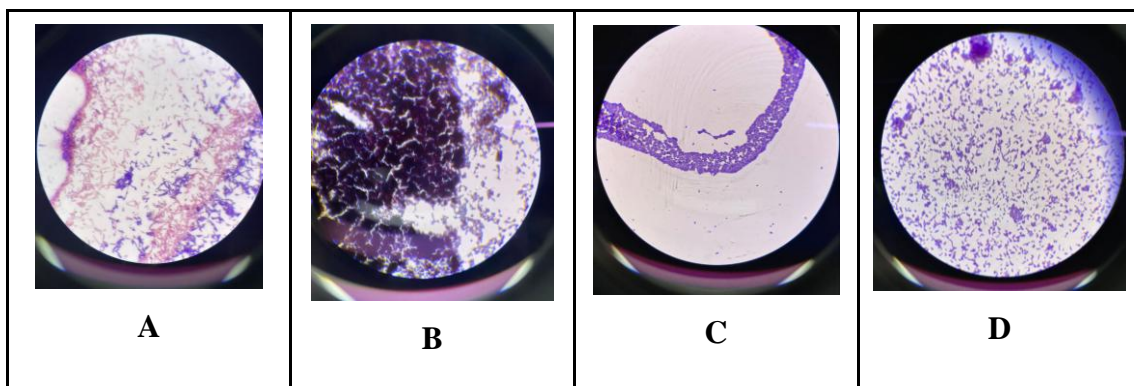
En lo referente a los resultados del crecimiento de bacterias probióticas a partir de las cápsulas comerciales, se determinó que el conteo en el agar MRS facultativo fue de  $5,5 \times 10^9$  UFC/g y en el agar M17 fue de  $3,5 \times 10^9$  UFC/g. Se realizó un análisis estadístico ANOVA (Anexo 1), en el cual, como resultados arrojó una importancia del 22,81% del tipo de agar para facilitar el crecimiento bacteriano, un valor de MCE de  $1,43 \times 10^{18}$ , que corresponde al error puro del experimento y un valor p de 0,231, indicando que no es estadísticamente significativo. Además, se realizó una prueba de normalidad de Anderson Darling (Anexo 2), obteniendo un valor p de 0,818, demostrando que los datos siguen una distribución normal.

#### **4.3.2. Identificación bacteriana mediante Tinción de Gram**

Para la identificación de los géneros bacterianos se verificó en la ficha técnica del producto Proflora performance, que estaba compuesto por seis cepas bacterianas entre las cuales están: *Bifidobacterium bifidum* (W23), *Bifidobacterium lactis* (W51), *Enterococcus faecium* (W54), *Lactobacillus acidophilus* (W22), *Lactobacillus brevis*

(W63) y *Lactococcus lactis* (W58). En base al resultado del crecimiento de bacterias probióticas en el medio de cultivo MRS, se identificó una colonia de coloración blanca con halo poco brillante, al observar en el microscopio se corroboró su forma de bacilo (bastón), que, al comparar con géneros bacterianos probióticos, presentó similitud con *Lactobacillus brevis*. También se observó el crecimiento de colonias brillantes blancas pequeñas y medianas en el agar MRS facultativo, al ser observadas en el microscopio se identificó su forma de bacilo, relacionándolo por su morfología con *Lactobacillus acidophilus*.

En el medio de cultivo M17, se observaron tres tipos de colonias de coloración rosadas brillantes, que al ser observadas en el microscopio se encontraban como diplococos, relacionándolos por su forma con *Lactococcus lactis*. Colonias bacterianas grises brillantes de tamaños pequeños y medianos identificadas como *Enterococcus faecium*.



**Figura 8.**

*Observación de géneros bacterianos Lactobacillus y Enterococcus al microscopio.*

**Nota:** A: *Lactobacillus brevis*; B: *Lactobacillus acidophilus*; C: *Lactococcus lactis*; D: *Enterococcus faecium*

#### **4.3.3. Microencapsulados de alginato de sodio al 1 y 1.5 %**

Las microcápsulas obtenidas posterior al secado a temperatura de 26°C, presentaron una morfología predominantemente esférica, presentando cierta heterogeneidad en el tamaño de partícula en un rango entre 2 y 4 mm. Se evidenció una tonalidad beige amarillenta de las partículas indicando la influencia del polvo probiótico utilizado. En general, las microcápsulas presentaron un estado sólido y seco.

#### 4.3.4. Evaluación de los encapsulados digeridos y sin digerir mediante la técnica recuento en placa

Como resultado de la evaluación de los encapsulados de prebióticos de banano con probióticos de Proflora performance, con concentraciones al 1 y 1.5% de alginato de sodio, se obtuvieron por triplicado los resultados para las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ . Los resultados para el agar M17 y MRS F en condiciones de aerobiosis, y encapsulados al 1% se aprecian en la tabla 1

**Tabla 1.**

*Crecimiento de bacterias probióticas pre y post digestión en agar M17 y MRS al 1 y 1,5 % de alginato de sodio*

<b>Concentración alginato</b>	<b>Sin digerir</b>		<b>Post digestión in vitro</b>	
	<b>M17</b>	<b>MRS F</b>	<b>M17</b>	<b>MRS F</b>
	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>
	<b>Log UFC/ ml</b>	<b>Log UFC/ ml</b>	<b>Log UFC/ ml</b>	<b>Log UFC/ ml</b>
<b>1%</b>	9,43 ± 0,02	8,42 ± 0,07	9,94 ± 0,04	6,71 ± 0,02
<b>1,5%</b>	9,56 ± 0,02	9,61 ± 0,04	9,07 ± 0,02	6,44 ± 0,02

Si comparamos los resultados obtenidos en agar M17 y MRS facultativo a concentraciones al 1 y 1.5%, se observó que las cápsulas de probióticos sin digerir al 1.5% ofrecieron una mayor protección a los microorganismos. Sin embargo, tras la digestión, las cápsulas al 1% mostraron una mejor liberación de los probióticos, lo que sugiere una mayor digestibilidad en el tracto gastrointestinal.

Los encapsulados al 1.5%, presentaron una rigidez excesiva, que dificultaba la masticación, razón por la cual, se optó por trabajar con los encapsulados al 1%, con una

menor cantidad de alginato que resulta más fácil el proceso de masticación y se digieren de mejor manera dentro del organismo. En el análisis estadístico se aplicó análisis de varianza, Anexo 3, 4 y 5, comparando el medio MRS al 1 % digerido y sin digerir, identificándose diferencias significativas al 99,9%; el medio M17 digerido y sin digerir al 1,5 %, también se corroboró diferencias significativas al 99,9%. Se comparó los resultados obtenidos en el medio M17 sin digerir al 1 y 1.5%, en el cual se obtuvo una diferencia significativa del 99 %, al comparar los resultados de crecimiento de bacterias probióticas al 1 y 1.5 % se obtuvo una diferencia significativa del 99.9 %. Al comparar los resultados de los medios de cultivo M17 y MRS posdigestión a las concentraciones al 1 y 1,5 % se obtuvieron diferencias significativa del 99, 9%, respectivamente para cada tipo de agar.

#### **4.4. Caracterización del chocolate enriquecido con prebióticos del banano y con una mezcla comercial de probióticos**

##### **4.4.1. Características físicas del chocolate probiótico**

Los chocolates presentaron una morfología cúbica con bordes definidos, la textura es mayormente lisa con áreas brillantes, debido a un templado adecuado, con un color marrón oscuro debido al alto contenido de cacao.



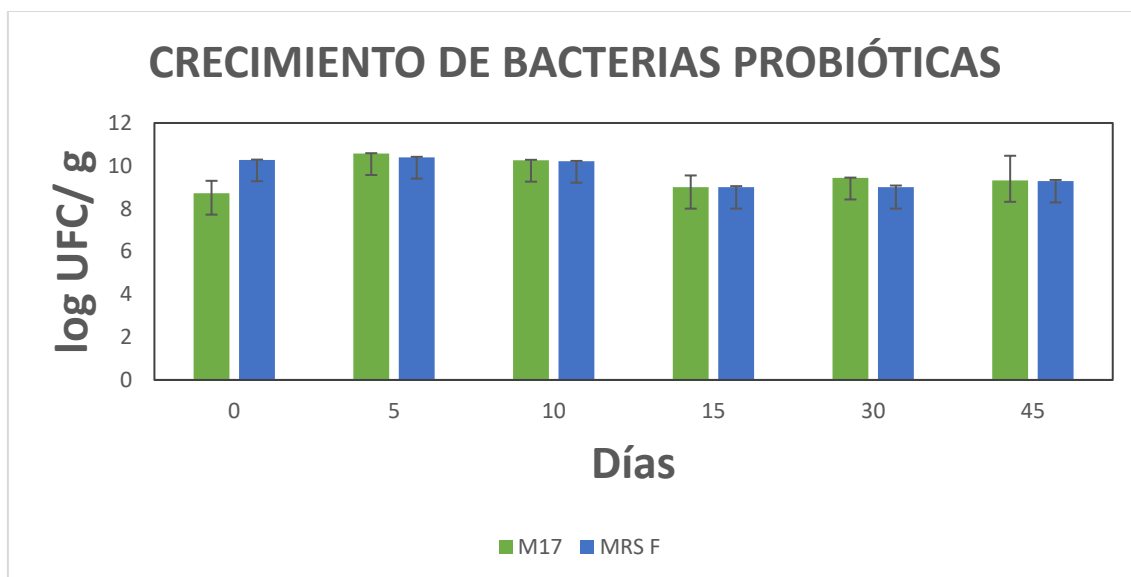
**Figura 9.**

*Chocolate simbiótico enriquecido con prebióticos del banano y probióticos (Proflora performance)*

##### **4.4.2. Análisis de viabilidad de bacterias probióticas en el chocolate simbiótico**

Dentro de cada bombón de chocolate se colocó 1 g de microencapsulados de alginato de sodio al 1%, considerando que la ingesta de chocolate al 70% por persona

diariamente, debe estar contenido entre 20 y 25 g para que sea considerado un alimento funcional (Villanueva, 2020). Considerando que el peso de cada bombón se encuentra entre 5 y 5.30 g, la cantidad de bombones que debería ingerir diariamente una persona está entre 4 a 5.



**Figura 10.**

*Crecimiento de bacterias probióticas a los días 0, 5, 10, 15, 30 y 45 de almacenamiento del chocolate simbiótico. Los medios de cultivo empleados fueron M17 y MRS.*

La viabilidad de bacterias probióticas a lo largo de 45 días de almacenamiento en dos medios de cultivo, M17 y MRS F, se observa en la figura 10. Durante los primeros días, se observa un aumento significativo en el crecimiento de bacterias en ambos medios, lo que indica una fase de crecimiento. A partir del día 10, la población bacteriana comienza a disminuir progresivamente, con una mayor reducción en MRS F. Para el día 15, la cantidad de bacterias en ambos medios es menor, y desde el día 30 hasta el día 45, los valores se estabilizan en niveles bajos. Esto indica que M17 favorece un crecimiento inicial mayor, pero a largo plazo ambos medios muestran una reducción en la viabilidad bacteriana.

El análisis de varianza (ANOVA) aplicado muestra que los factores día y crecimiento bacteriano contribuyen el 72,96 %, el valor de MCE es de 0,22 y el valor de p es 0,09 mayor a 0,05, lo que confirma que los cambios a lo largo del tiempo no son estadísticamente significativos, Anexo 6. Esto indica que el día influye significativamente en la variable de respuesta analizada, en base al medio de cultivo Anexo 7. Además, se

realizó una prueba de Anderson Darling, obteniéndose un valor de p de 0.291, corroborándose que los datos siguen una distribución normal, Anexo 8.

## CAPÍTULO 5

### 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

#### 5.1. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelan diferencias significativas en la concentración de inulina, FOS, almidón y azúcares simples extraídos de la pulpa y la cáscara de banano (*Musa cavendishii*) empleando diversos solventes.

En primer lugar, se determinó que el etanol al 70% es el solvente más eficiente para la extracción de prebióticos, tanto en la pulpa como en la cáscara del banano. En la pulpa, el extracto etanólico al 70% (v/v) exhibió la mayor concentración de inulina, FOS, almidón y azúcares simples ( $251,24 \pm 16,75$  mg/ml), lo que sugiere una mayor afinidad del etanol al 70% por los compuestos prebióticos presentes en la pulpa, posiblemente inulina y FOS. Esto coincide con la investigación de Yudhistira et al. (2019), que observaron que el etanol facilita la precipitación y recuperación de inulina al disminuir la solubilidad de otros azúcares interferentes. La concentración de etanol al 70% podría optimizar la interacción entre el solvente y los prebióticos, favoreciendo la solubilización para su posterior extracción.

Los hallazgos muestran que el extracto etanólico al 50% (v/v) presentó la menor concentración de prebióticos en la pulpa ( $121,38 \pm 21,73$  mg/ml), sugiriendo que una proporción insuficiente de etanol limita la extracción. Esto se atribuyen a que el etanol al 50% tiene una polaridad intermedia, y presentan menor efectividad para solubilizar compuestos prebióticos, tales como fructooligosacáridos (FOS) o la inulina. Estudios como los de Zhang et al. (2005) y Aurore et al. (2009) respaldan esta observación, indicando que la polaridad del solvente es determinante para la extracción de carbohidratos.

En la cáscara, el extracto acuoso con agua desionizada contenía  $142,21 \pm 39,33$  mg/ml de prebióticos, mientras que el extracto etanólico al 70% (v/v) incrementó esta cantidad a  $184,15 \pm 4,97$  mg/ml. Esto sugiere que la cáscara es una fuente importante de prebióticos.

Cabe destacar el estudio de Rivera Quixchan et al., (2018), sobre siete variedades de banano, que identificó la variedad *Musa nendran* como la que presentó el mayor contenido de fructanos,  $3.19 \pm 0.04$  g/100 g de fruta. Según Bello-Pérez et al. (1999) que

trabajaron con otras especies de banano, como *Musa paradisiaca* o *Musa acuminata* reportaron concentraciones prebióticas de 150-200 mg/ml en extractos de pulpa de banano utilizando etanol al 70%, lo que es inferior a los 251,24 mg/ml obtenidos en este estudio. Esto sugiere que la especie *Musa cavendishii* podría tener un contenido más alto de prebióticos.

La microencapsulación con alginato se elige como una estrategia para la protección y liberación controlada de probióticos, optimizando su eficacia y supervivencia en el tracto gastrointestinal (Wang et al., 2022). Los resultados obtenidos en el presente estudio revelan que la concentración de alginato modula la interacción entre la matriz de encapsulación y el entorno gastrointestinal. Específicamente, se observó que los encapsulados sin digerir con una concentración de alginato al 1.5% exhibieron una mayor protección inicial de los probióticos, lo que sugiere una mayor resistencia de la matriz a la degradación por los ácidos y enzimas presentes en el estómago. Esto coincide con las investigaciones previas que demuestran que concentraciones elevadas de alginato mejoran la viabilidad de probióticos durante el tránsito gastrointestinal (Diep & Schiffman, 2024; Starovoitova et al., 2023). Sin embargo, la mayor protección proporcionada por el alginato al 1.5% podría haber limitado la liberación de los probióticos en el intestino, donde producen sus efectos beneficiosos. La menor concentración de alginato en las cápsulas al 1% posiblemente facilitó la degradación de la matriz y la liberación de los probióticos en las condiciones simuladas del intestino, lo que se traduce en una mejor digestión y disponibilidad de los probióticos.

En este contexto, es importante mencionar que estudios previos han demostrado la eficacia de la microencapsulación con alginato al 2% para proteger probióticos en diversos alimentos. Por ejemplo, Khalil y Mansour (1998) incorporaron bifidobacterias encapsuladas con alginato en mayonesa y se observó una supervivencia superior a  $1 \times 10^6$  UFC/ml sometido a refrigeración. De manera similar, Ozer et al. (2009) añadieron *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado en queso blanco y obtuvieron recuentos por encima de  $1 \times 10^6$  UFC/ml tras 90 días de almacenamiento.

En el presente estudio, se priorizó el uso de encapsulados al 1% de alginato debido a su mejor digestión y facilidad de masticación, a pesar de que podrían ofrecer una menor protección inicial a los probióticos. Además, esta decisión se fundamenta en la



importancia de asegurar una liberación adecuada de los probióticos en el intestino para que desempeñen efectos benéficos.

El análisis de la viabilidad de las bacterias probióticas dentro del chocolate en los medios de cultivo M17 y MRS a lo largo del tiempo muestra una tendencia decreciente en la concentración de UFC/g. Sin embargo, se observa un comportamiento variable en los primeros días de almacenamiento, lo que sugiere que ciertos factores podrían influir en la adaptación y estabilidad de las bacterias en la matriz de chocolate. Para el día 5, se observó un cambio notable en la tendencia: el medio M17 alcanzó 10,57 log UFC/g, superando al MRS que registró 10,4 log UFC/g. Durante el almacenamiento prolongado, las concentraciones bacterianas continuaron disminuyendo. En el Día 30, M17 mantuvo 9,43 log UFC/g, mientras que MRS mostró 9,30 log UFC/g. Al llegar al Día 45, los valores descendieron a 9,32 log UFC/g y 9,29 log UFC/g, respectivamente. Sin embargo, la cantidad de bacterias supera el umbral superior requerido para considerarse probiótico.

En cuanto a la viabilidad de los probióticos en los medios de cultivo M17 y MRS F, se observó un aumento inicial seguido de una disminución progresiva a partir del día 10. Este resultado coincide con las investigaciones de Dave & Shah (1997) y Gomes & Malcata (1999), quienes reportaron que la viabilidad de las bacterias puede disminuir con el tiempo debido a factores como la falta de nutrientes o la acumulación de metabolitos. En el caso de la viabilidad de los probióticos en el chocolate, se observó una disminución con el tiempo, pero se mantuvieron en niveles aceptables durante 45 días. Esta observación concuerda con lo reportado por Pimentel et al. (2015) y Santivarangkna et al. (2007), quienes encontraron que el chocolate es una matriz eficiente para el mantenimiento de probióticos, aunque la viabilidad disminuye con el tiempo. Según la Organización Mundial de la Salud (2002), un producto simbiótico debe contener tanto probióticos como prebióticos en cantidades adecuadas para conferir beneficios a la salud. En este caso, los probióticos encapsulados en alginato e incorporados en la matriz de chocolate, mantuvieron su viabilidad durante 45 días de almacenamiento a temperatura ambiente (18°C), con recuentos superiores a 6 log UFC/g, lo que cumple con los requisitos para considerarse probiótico (Shah, 2007). Además, la dosis sugerida de chocolate (4-5 bombones al día) proporciona una ingesta diaria de 25 g de chocolate al 70%, 5 g de prebióticos, dentro del rango recomendado de 2-10 g/día (Roberfroid, 2007), y una cantidad de probióticos superior al millón de UFC por dosis para obtener beneficios.

Para futuras investigaciones, se podría realizar un análisis sensorial del producto para verificar la aceptabilidad del producto por parte de los consumidores finales, realizar un estudio de casos y controles para verificar sus beneficios a largo plazo en la salud intestinal. Dentro de la metodología sería factible realizar un extracto de cáscara y pulpa del banano con la finalidad de aprovechar los prebióticos y aumentar su concentración.

## **5.2. Conclusiones**

- Los resultados obtenidos indican que hay entre 6 y 9 log UFC/g después de 45 días de almacenamiento de las muestras de chocolate, lo que afirma que existen la cantidad necesaria de bacterias para considerarse un alimento probiótico.
- El extracto de pulpa de banano con etanol al 70 % presentó el mayor contenido de inulina, FOS, almidón y azúcares simples, alcanzando un valor de  $251,24 \pm 16,75$  mg/ml, lo que resalta la eficacia de este solvente en la extracción de compuestos bioactivos de esta parte del banano, en comparación con los extractos obtenidos con agua destilada y agua desionizada.
- Los microencapsulados al 1,5% de alginato de sodio, ofrecieron una mayor protección a los probióticos, con una rigidez excesiva que dificultaba la masticación, mientras que los encapsulados al 1% fueron más adecuados, al momento de las pruebas de digestión *in vitro*, con un mayor crecimiento bacteriano en los medios M17 y MRS.
- Los resultados demostraron que los prebióticos se encontraban en los estándares de consumo diario comprendido entre 2 y 10 g, los probióticos encapsulados mantuvieron su viabilidad mayor a 6 log UFC/g, durante 45 días de almacenamiento a temperatura ambiente, cumpliendo con los requisitos mínimos para considerarse un alimento simbiótico.

## REFERENCIAS

- Aji Muhammad, D. R., Rahayu Endang, S., & Fibri, D. L. N. (2021). Revisando el desarrollo de chocolates funcionales basados en probióticos. *Revista de la Asociación de Sociología*, 9(0), 233-248. [https://doi.org/10.7831/ras.9.0\\_233](https://doi.org/10.7831/ras.9.0_233)
- Álvarez Reyes, A., González Lavaut, J. A., Urquiola, A., García, M., & Monteagudo, R. (2007). Influencia del método de secado y el tiempo de almacenamiento en estante de las hojas de *Erythroxylum minutifolium* Griseb sobre la actividad citotóxica y antiherpética tipo 1. *Revista Cubana de Química*, 19(1), 33-35.
- Aurore, G., Parfait, B., & Fehrasmane, L. (2009). Bananas, raw materials for making processed food products. *Trends in Food Science & Technology*, 20(2), 78-91. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.003>
- Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., Sánchez-Hernández, L., & Paredes-López, O. (1999). Isolation and partial characterization of banana starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 854-857.
- Biocodex Microbiota Institute. (2024). Para ver la vida de color de rosa, coma chocolate negro. <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/es/para-ver-la-vida-de-color-de-rosa-coma-chocolate-negro>
- Bonik, S. K., Tamanna, S. T., Feliz, T. A., Haque, N., Shariar, I., & Faruque, O. (2024). Formulation and evaluation of cereal-based breads fortified with natural prebiotics from green banana, moringa leaves powder and soya powder. *1 Applied Food Research*, 4(1), 100377. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100377>
- Caballero-Figueroa, E., Terrés, E., Hernández-Hernández, HM, & Escamilla-García, M. (2022). Revisión sobre las tecnologías emergentes no térmicas para el procesamiento de alimentos. *CONSEJO. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25e459. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.459>
- Castañeda Guillot, C. (2018). Actualización en prebióticos. *Revista Cubana de Pediatría*, 90 (4). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75312018000400008&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312018000400008&lng=es&tlng=es)
- Chacón Ortiz, CY, Mori Culqui, PL y Chávez Quintana, SG (2021). Antioxidantes y polifenoles totales de chocolate negro con incorporación de cacao (*Theobroma cacao* L.) crudo. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 23 (4), 266-273. <https://doi.org/10.18271/ria.2021.331>

- Corzo Sánchez, N., Montilla Corredera, A., Moreno Andújar, FJ, Villamiel Guerra, M., & Olano Villén, A. (2016). Prebióticos: definición, obtención y estructura. Grupo de Química y Funcionalidad de Carbohidratos y Derivados, Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) , CEI (UAM-CSIC), Madrid, España.
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F. J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M. L., & Clemente, A. (2015). Prebióticos: Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutr Hosp*, 31(Supl. 1), 99-118. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8851>
- Dadzie, BK y Orchard, JE (1997). Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: Criterios y métodos (Guías técnicas INIBAP 2). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos; Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano.
- marDave, R. I., & Shah, N. P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7(1), 31-41. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(96\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(96)00046-5)
- Diep, E., & Schiffman, J. D. (2024). Targeted release of live probiotics from alginate-based nanofibers in a simulated gastrointestinal tract. *RSC Applied Polymers*, 2(4), 719–725. <https://doi.org/10.1039/d4lp00023d>
- Durán C, Rodrigo, & Valenzuela B, Alfonso. (2010). LA EXPERIENCIA JAPONESA CON LOS ALIMENTOS FOSHU: ¿LOS VERDADEROS ALIMENTOS FUNCIONALES? *Revista chilena de nutrición*, 37(2), 224-233. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182010000200012>
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO). <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/382476b3-4d54-4175-803f-2f26f3526256/content>
- Gomes, A. M. P., & Malcata, F. X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and

- therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4-5), 139-157. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00033-3)
- Hayek, N. (2013). Chocolate, gut microbiota, and human health. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00011>. PMID: PMC3566565.
  - Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66
  - Jiménez Vera, R., García Garibay, M., & Corona Cruz, A. (2002). Efecto prebiótico de harina y almidones de plátano en la flora colónica in vitro. XI CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA. [https://smbb.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/AREA\\_III/OIII-08.pdf](https://smbb.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/AREA_III/OIII-08.pdf)
  - Kamali, R., Dadashi, S., Dehghannya, J., & Ghaffari, H. (2021). Production of green banana powder using foam-mat drying as influenced by drying air temperature: Experimental and <scp>3D</scp> numerical study. *Journal of Food Process Engineering*, 44(6). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13703>
  - Khalil, A. H., & Mansour, E. H. (1998). Microencapsulation of Bifidobacterium bifidum in alginate and its survival in mayonnaise. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 26(2), 231-241.
  - Konar, N., Palabiyik, I., Toker, O. S., Polat, D. G., Kelleci, E., Rasouli Pirouzian, H., Akcicek, A., & Sagdic, O. (2018). Conventional and sugar-free probiotic white chocolate: Effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. *Journal of Functional Foods*, 43, 206-213. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.016>
  - Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. Van, Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (Theobroma cacao) bean flavour profile — A review. *Food Research International*, 82, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
  - López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura-Sánchez, F., & Restrepo-Betancur, LF (2017). Comparación de métodos que

- utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29 (2), 180-198. <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v29n2/ind02217.pdf>
- Lopez-Siles, M., Duncan, SH, Garcia-Gil, LJ, & Martinez-Medina, M. (2017). *Faecalibacterium prausnitzii* : De la microbiología al diagnóstico y pronóstico. *ISME Journal*, 11 (4), 841-852 . <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.176>
  - Lujano, E., Manganiello, L., Contento, A., & Ríos, Á. (2019). Identificación y cuantificación de (+)-catequinas y procianidinas en cacao procedente de Ocumare de la Costa, Venezuela. *Revista INGENIERÍA UC*, 26(2), 192-201. Universidad de Carabobo.
  - Madrigal, L. y Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57 (4), 387-396. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222007000400012&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000400012&lng=es&tlng=es) .
  - Martínez-Mora, Edison Omar. (2015). Caracterización morfológica y contenido de almidón resistente y disponible en bananos (*Musa sapientum*) exportables del Ecuador. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 19(3), 153-159. <https://dx.doi.org/10.14306/renhyd.19.3.161>
  - Martínez-Solórzano, GE y Rey-Brina, JC (2021). Plátanos (*Musa AAA*): Importancia, producción y comercio en tiempos de Covid-19. *Agronomía Mesoamericana*, 32 (3), 1034–1046. <https://doi.org/10.15517/am.v32i3.43610>
  - Mohammed, C., Fuego, J. P., Garcia, K. V., Jamil, H., Rajesh, R. Y., Escobar, A. S., Hassan, M. J., & Rai, M. (2024). A mini literature review of probiotics: Transforming gastrointestinal health through evidence-based insights. *Cureus*, 16(3), e57055. <https://doi.org/10.7759/cureus.57055>. PMID: PMC11051678.
  - Muchiutti, GS, López Novello, LH, Córscico, FA y Larrosa, VJ (2019). Cápsulas de alginato para la protección de polifenoles presentes en el aceite esencial de orégano. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 30 (59), 29.
  - Obayomi, O., Olaniran, A., & Owa, S. (2024). Unveiling the role of functional foods with emphasis on prebiotics and probiotics in human health: A review. *Journal of Functional Foods*, 119(106337), 106337. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106337>
  - Ozer, D., et al. (2009). Viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white cheese during storage. *International Dairy Journal*, 19(1), 38-43.

- Perea-Villamil, JA, Cadena-Cala, T., & Herrera-Ardila, J. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41 (2), 128-134. Universidad Industrial de Santander.
- Pereira, A., & Maraschin, M. (2015). Banana (*Musa spp*) from peel to pulp: Ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health. *Journal of Ethnopharmacology*, 160, 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.008>
- Pimentel, T. C., Garcia, S., & Prudencio, S. H. (2015). Effect of long-chain inulin on the texture profile and survival of *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* in set yoghurts during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, 68(1), 49-56. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12155>
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Vilchez-Padial, L. M., & Gil, A. (2017). Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. *Nutrients*, 9(6), 555. <https://doi.org/10.3390/nu9060555>
- Reyes Esparza, JA, & Rodríguez Frago, L. (2012). Los probióticos: ¿cómo una mezcla de microorganismos hace un gran trabajo? *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43 (1), 7-17. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952012000100002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000100002&lng=es&tlng=es) .
- Roberfroid, M. B. (2007). Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of Nutrition*, 137(11), 2493S-2502S.
- Rodríguez, PA, & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16 (2), 166-167. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Sánchez F., EP, Núñez R., D., Cruz L., RO, Torres H., MA, & Herrera M., EV (2017). Simulación y recuento de unidades formadoras de colonias. *Recibe. Revista Electrónica de Computación, Informática, Biomédica y Electrónica*, 6 (1), 97-111. Universidad de Guadalajara. <https://www.redalyc.org/journal/5122/512253717006/html/>
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2007). Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*, 23(2), 302-315. <https://doi.org/10.1021/bp060268f>

- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the human body. *PLoS biology*, 14(8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Serena-Romero, G., Ignot-Gutiérrez, A., Conde-Rivas, O., Lima-Silva, MY, Martínez, AJ, Guajardo-Flores, D., & Cruz-Huerta, E. (2023). Impacto de la digestión in vitro en la digestibilidad, liberación de aminoácidos y actividad antioxidante de las proteínas de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) y cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) en células Caco-2 y HepG2. *Antioxidantes*, 12 (12), 2075. <https://doi.org/10.3390/antiox12122075>
- Shin, J.-H., Jung, S., Kim, S.-A., Kang, M.-S., Kim, M.-S., Joung, H., & Hwang, D.-Y. (2022). Consumption of 85% cocoa dark chocolate improves mood in association with gut microbial changes in healthy adults: A randomized controlled trial. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 99, 108854. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108854>
- Silveira Rodríguez, Manuela Belén, Monereo Megías, Susana, & Molina Baena, Begoña. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿Cerca o lejos? *Revista Española de Salud Pública*, 77(3), 317-331. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S113557272003000300003&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113557272003000300003&lng=es&tlng=es).
- Soto Azurduy, VS (2010). Cuantificación de almidón total y de almidón resistente en harina de plátano verde (*Musa cavendishii*) y plátano *Musa paradisíaca*). *Revista Boliviana de Química*, 27, 94-93.
- Starovoitova, S. O., Kishko, K. M., Demchenko, O. M., & Bila, V. V. (2023). Encapsulated probiotic microorganisms in functional food products. *Mikrobiolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993)*, 85(6), 77–94. <https://doi.org/10.15407/microbiolj85.06.077>
- Steinberg, F. M., Bearden, M. M., & Keen, C. L. (2003). Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(2), 215-223. <https://doi.org/10.1053/jada.2003.50028>. PMID: 12589329.
- Villafuerte-Carrillo, FR, Sancho-Aguilera, D., Enríquez-Estrella, MA, Basantes-Basantes, EF, & Ruíz-Mármol, HP (2024). Operaciones unitarias para la producción de chocolate negro, con leche y blanco. Una revisión sistemática.



Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales, 11 (2), 64-86.  
<https://doi.org/10.23850/24220582.6533>

- Villanueva, M. E. (2020). Revisión de Literatura: Alimentos funcionales en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles y propuesta de elaboración de chocolate funcional en la EAP, Zamorano.
- Wang, X., Gao, S., Yun, S., Zhang, M., Peng, L., Li, Y., & Zhou, Y. (2022). Microencapsulating Alginate-Based Polymers for Probiotics Delivery Systems and Their Application. *Pharmaceuticals*, 15(5), 644.  
<https://doi.org/10.3390/ph15050644>
- Yudhistira, B., Siswanti, & Luwidharto, J. C. N. (2019). The effect of solvent ratio and precipitation time on isolation of inulin from white sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *The 5th International Seminar on Agribusiness 2019. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 518(1), 012009. IOP Publishing.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/518/1/012009>
- Zhang, P., Whistler, R. L., BeMiller, J. N., & Hamaker, B. R. (2005). Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility—a review. *Carbohydrate Polymers*, 59(4), 443–458.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.10.014>

## ANEXOS

### Anexo 1.

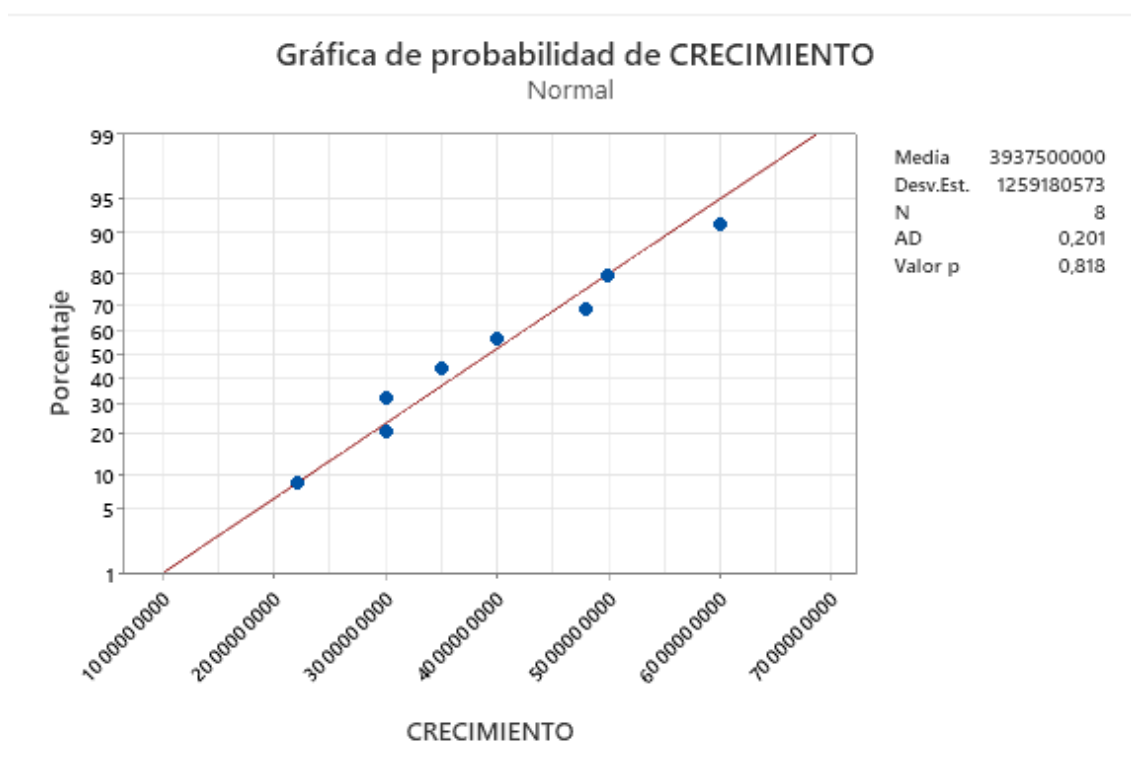
ANOVA de 1 factor sobre el crecimiento de bacterias probióticas de Proflora performance

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TIPO AGAR	1	2,53125E+18	22,81%	2,53125E+18	2,53125E+18	1,77	0,231
Error	6	8,56750E+18	77,19%	8,56750E+18	1,42792E+18		
Total	7	1,10988E+19	100,00%				

### Anexo 2.

Prueba de Anderson Darling sobre el crecimiento de bacterias probióticas de Proflora performance



### Anexo 3.

Significancias sobre el crecimiento de bacterias probióticas pre y post digestión en agar M17 y MRS al 1 y 1.5% de alginato de sodio

Concentración de alginato	Sin digerir (M17)	Digerido (M17)	Sin digerir (MRS)	Digerido (MRS)
1%	9,43 ± 0,02***	9,94 ± 0,04***	8,42 ± 0,07***	6,71 ± 0,02***
1,50%	9,56 ± 0,02***	9,07 ± 0,02***	9,61 ± 0,04***	6,44 ± 0,02***

Nota: La lectura de la tabla es en filas, la presencia de triple asterisco indica diferencia significativa del 99.9% de confianza.

#### Anexo 4.

Significancias sobre el crecimiento de bacterias probióticas pre y post digestión en agar M17 y MRS al 1 y 1.5% de alginato de sodio

Concentración de alginato	Sin digerir (M17)	Digerido (M17)	Sin digerir (MRS)	Digerido (MRS)
1%	9,43 ± 0,02**	9,94 ± 0,04***	8,42 ± 0,07***	6,71 ± 0,02***
1,50%	9,56 ± 0,02**	9,07 ± 0,02***	9,61 ± 0,04***	6,44 ± 0,02***

Nota: La lectura de la tabla es en columnas, la presencia de doble asterisco indica diferencia significativa al 99 % de confianza, y el triple asterisco indica diferencia significativa del 99.9% de confianza.

#### Anexo 6.

Análisis de varianza de crecimiento de bacterias probióticas al 1 y 1.5% en los medios MRS y M17

<p>Analysis Summary</p> <p>Sample 1: MRS D 1%</p> <p>Sample 2: MRS SD 1%</p> <p>Sample 1: 3 values ranging from 6.7 to 6.73</p> <p>Sample 2: 3 values ranging from 8.34 to 8.48</p> <p>The StatAdvisor</p> <hr/> <p>Summary Statistics</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>MRS D 1%</th> <th>MRS SD 1%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Count</td> <td>3</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table> <p>Confidence interval for the difference between the means, which extends from -2.08422 to -1.33578. Since the interval does not contain the value 0.0, there is a statistically significant difference between the means of the two samples at the 99.9% confidence level.</p> <p>A t-test may also be used to test a specific hypothesis about the difference between the means of the populations from which the two samples come. In this case, the test has been constructed to determine whether the difference between the two means equals 0.0 versus the alternative hypothesis that the difference does not equal 0.0. Since the computed P-value is less than 0.001, we can reject the null hypothesis in favor of the alternative.</p> <p>NOTE: these results assume that the variances of the two samples are equal. In this case, that assumption appears to be reasonable based on the results of an F-test to compare the standard deviations.</p> <p>Análisis MRS Digerido y sin digerir al 1 %</p>		MRS D 1%	MRS SD 1%	Count	3	3	<p>Analysis Summary</p> <p>Sample 1: M17 D 1.5%</p> <p>Sample 2: M17 D 1%</p> <p>Sample 1: 3 values ranging from 9.05 to 9.1</p> <p>Sample 2: 3 values ranging from 9.9 to 9.98</p> <p>The StatAdvisor</p> <hr/> <p>Summary Statistics</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>M17 D 1.5%</th> <th>M17 D 1%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Count</td> <td>3</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Average</td> <td>9.07</td> <td>9.94333</td> </tr> <tr> <td>Variance</td> <td>0.0007</td> <td>0.00163333</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation</td> <td>0.0264575</td> <td>0.0404145</td> </tr> <tr> <td>Minimum</td> <td>9.05</td> <td>9.9</td> </tr> <tr> <td>Maximum</td> <td>9.1</td> <td>9.98</td> </tr> <tr> <td>Range</td> <td>0.05</td> <td>0.08</td> </tr> </tbody> </table> <p>It also constructs confidence intervals or bounds for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from -1.11246 to -0.63203. Since the interval does not contain the value 0.0, there is a statistically significant difference between the means of the two samples at the 99.9% confidence level.</p> <p>A t-test may also be used to test a specific hypothesis about the difference between the means of the populations from which the two samples come. In this case, the test has been constructed to</p> <p>Análisis M17 Digerido y sin digerir al 1 %</p>		M17 D 1.5%	M17 D 1%	Count	3	3	Average	9.07	9.94333	Variance	0.0007	0.00163333	Standard deviation	0.0264575	0.0404145	Minimum	9.05	9.9	Maximum	9.1	9.98	Range	0.05	0.08																		
	MRS D 1%	MRS SD 1%																																															
Count	3	3																																															
	M17 D 1.5%	M17 D 1%																																															
Count	3	3																																															
Average	9.07	9.94333																																															
Variance	0.0007	0.00163333																																															
Standard deviation	0.0264575	0.0404145																																															
Minimum	9.05	9.9																																															
Maximum	9.1	9.98																																															
Range	0.05	0.08																																															
<p>Analysis Summary</p> <p>Sample 1: MRS SD 1.5%</p> <p>Sample 2: MRS SD 1%</p> <p>Sample 1: 3 values ranging from 9.57 to 9.66</p> <p>Sample 2: 3 values ranging from 8.34 to 8.48</p> <p>The StatAdvisor</p> <hr/> <p>Summary Statistics</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>MRS SD 1.5%</th> <th>MRS SD 1%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Count</td> <td>3</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Average</td> <td>9.61333</td> <td>8.42333</td> </tr> <tr> <td>Variance</td> <td>0.00203333</td> <td>0.00543333</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation</td> <td>0.0450925</td> <td>0.0737111</td> </tr> <tr> <td>Minimum</td> <td>9.57</td> <td>8.34</td> </tr> <tr> <td>Maximum</td> <td>9.66</td> <td>8.48</td> </tr> <tr> <td>Range</td> <td>0.09</td> <td>0.14</td> </tr> </tbody> </table> <p>This option runs a t-test to compare the means of the two samples. It also constructs confidence intervals or bounds for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from 0.760443 to 1.61956. Since the interval does not contain the value 0.0, there is a statistically significant difference between the means of the two samples at the 99.9% confidence level.</p> <p>Análisis MRS sin digerir al 1 y 1,5 %</p>		MRS SD 1.5%	MRS SD 1%	Count	3	3	Average	9.61333	8.42333	Variance	0.00203333	0.00543333	Standard deviation	0.0450925	0.0737111	Minimum	9.57	8.34	Maximum	9.66	8.48	Range	0.09	0.14	<p>Analysis Summary</p> <p>Sample 1: M17 SD 1.5%</p> <p>Sample 2: M17 SD 1%</p> <p>Sample 1: 3 values ranging from 9.54 to 9.59</p> <p>Sample 2: 3 values ranging from 9.41 to 9.45</p> <p>The StatAdvisor</p> <hr/> <p>Summary Statistics</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>M17 SD 1.5%</th> <th>M17 SD 1%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Count</td> <td>3</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Average</td> <td>9.56</td> <td>9.43667</td> </tr> <tr> <td>Variance</td> <td>0.0007</td> <td>0.000533333</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation</td> <td>0.0264575</td> <td>0.023094</td> </tr> <tr> <td>Minimum</td> <td>9.54</td> <td>9.41</td> </tr> <tr> <td>Maximum</td> <td>9.59</td> <td>9.45</td> </tr> <tr> <td>Range</td> <td>0.05</td> <td>0.04</td> </tr> </tbody> </table> <p>This option runs a t-test to compare the means of the two samples. It also constructs confidence intervals or bounds for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from -0.0512481 to 0.297915. Since the interval contains the value 0.0, there is not a statistically significant difference between the means of the two samples at the 99.9% confidence level.</p> <p>Análisis M17 sin digerir al 1 y 1,5 %</p>		M17 SD 1.5%	M17 SD 1%	Count	3	3	Average	9.56	9.43667	Variance	0.0007	0.000533333	Standard deviation	0.0264575	0.023094	Minimum	9.54	9.41	Maximum	9.59	9.45	Range	0.05	0.04
	MRS SD 1.5%	MRS SD 1%																																															
Count	3	3																																															
Average	9.61333	8.42333																																															
Variance	0.00203333	0.00543333																																															
Standard deviation	0.0450925	0.0737111																																															
Minimum	9.57	8.34																																															
Maximum	9.66	8.48																																															
Range	0.09	0.14																																															
	M17 SD 1.5%	M17 SD 1%																																															
Count	3	3																																															
Average	9.56	9.43667																																															
Variance	0.0007	0.000533333																																															
Standard deviation	0.0264575	0.023094																																															
Minimum	9.54	9.41																																															
Maximum	9.59	9.45																																															
Range	0.05	0.04																																															

<p><b>Analysis Summary</b></p> <p>Sample 1: HRS D 1%</p> <p>Sample 2: HRS SD 1%</p> <p>Sample 1: 3 values ranging from 6.7 to 6.73</p> <p>Sample 2: 3 values ranging from 8.34 to 8.48</p> <p>The StatAdvisor</p> <hr/> <p><b>Summary Statistics</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>HRS D 1%</th> <th>HRS SD 1%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Count</td> <td>3</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table> <hr/> <p>confidence interval for the difference between the means, which extends from -2.08422 to -1.33578. Since the interval does not contain the value 0.0, there is a statistically significant difference between the means of the two samples at the 99.9% confidence level.</p> <p>A t-test may also be used to test a specific hypothesis about the difference between the means of the populations from which the two samples come. In this case, the test has been constructed to determine whether the difference between the two means equals 0.0 versus the alternative hypothesis that the difference does not equal 0.0. Since the computed P-value is less than 0.001, we can reject the null hypothesis in favor of the alternative.</p> <p>NOTE: these results assume that the variances of the two samples are equal. In this case, that assumption appears to be reasonable based on the results of an F-test to compare the standard deviations.</p> <p>Análisis MRS Digerido al 1 y 1,5 %</p>		HRS D 1%	HRS SD 1%	Count	3	3	<p><b>Analysis Summary</b></p> <p>Sample 1: M17 D 1%</p> <p>Sample 2: M17 SD 1%</p> <p>Sample 1: 3 values ranging from 9.9 to 9.98</p> <p>Sample 2: 3 values ranging from 9.41 to 9.45</p> <p>The StatAdvisor</p> <hr/> <p><b>Summary Statistics</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>M17 D 1%</th> <th>M17 SD 1%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Count</td> <td>3</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Average</td> <td>9.94333</td> <td>9.43667</td> </tr> <tr> <td>Variance</td> <td>0.00163333</td> <td>0.000533333</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation</td> <td>0.0404145</td> <td>0.023094</td> </tr> <tr> <td>Minimum</td> <td>9.9</td> <td>9.41</td> </tr> <tr> <td>Maximum</td> <td>9.98</td> <td>9.45</td> </tr> <tr> <td>Range</td> <td>0.08</td> <td>0.04</td> </tr> </tbody> </table> <hr/> <p>It also constructs confidence intervals or bounds for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from 0.275272 to 0.73062. Since the interval does not contain the value 0.0, there is a statistically significant difference between the means of the two samples at the 99.9% confidence level.</p> <p>A t-test may also be used to test a specific hypothesis about the difference between the means of the populations from which the two samples come. In this case, the test has been constructed to</p> <p>Análisis M17 Digerido al 1 y 1,5 %</p>		M17 D 1%	M17 SD 1%	Count	3	3	Average	9.94333	9.43667	Variance	0.00163333	0.000533333	Standard deviation	0.0404145	0.023094	Minimum	9.9	9.41	Maximum	9.98	9.45	Range	0.08	0.04
	HRS D 1%	HRS SD 1%																													
Count	3	3																													
	M17 D 1%	M17 SD 1%																													
Count	3	3																													
Average	9.94333	9.43667																													
Variance	0.00163333	0.000533333																													
Standard deviation	0.0404145	0.023094																													
Minimum	9.9	9.41																													
Maximum	9.98	9.45																													
Range	0.08	0.04																													

## Anexo 7.

Anova de 1 factor sobre el crecimiento de bacterias probióticas a lo largo de 45 días

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
DÍA	5	3,577	72,96%	3,577	0,7154	3,24	0,092
Error	6	1,325	27,04%	1,325	0,2209		
Total	11	4,902	100,00%				

## Anexo 8.

Prueba de Tukey sobre el crecimiento de bacterias probióticas a lo largo de 45 días

DÍAS	M17	MRS F	DÍA	N	Media	Agrupación
0	8,72 ± 0,58 <sup>abc</sup>	10,28 ± 0,01 <sup>abc</sup>	5	2	10,4850	A
5	10,57 ± 0,02 <sup>a</sup>	10,4 ± 0,02 <sup>a</sup>	10	2	10,2350	A B
10	10,26 ± 0,02 <sup>ab</sup>	10,21 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0	2	9,500	A B C
15	9 ± 0,55 <sup>c</sup>	9 ± 0,05 <sup>c</sup>	45	2	9,3050	B C
30	9,43 ± 0,02 <sup>bc</sup>	9 ± 0,08 <sup>bc</sup>	30	2	9,215	B C
45	9,32 ± 1,15 <sup>bc</sup>	9,29 ± 0,05 <sup>bc</sup>	15	2	9,000	C

Las medias que no comparten una letra son

### Anexo 9.

Prueba de Normalidad de Anderson Darling del crecimiento bacteriano vs días

