UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la inclusión de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en panela granulada con propiedades probióticas

Jhon Fredy Ceron Cordoba

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Medellín, Colombia
2025

Evaluación de la inclusión de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en panela granulada con propiedades probióticas

Jhon Fredy Ceron Cordoba

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director (a):

Ms.C. José Uriel Sepúlveda Valencia

Codirector (a):

Ph.D., Ms.C., Esp., Zoo. Henry Jurado Gámez

Línea de Investigación:

Desarrollo de Productos Alimenticios

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos - GICTA

Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal, Forrajes y apicultura - PROBIOTEC-FORAPIS

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Medellín, Colombia

2025

Agradecimientos

A mi familia y amigos por su incondicional apoyo, que a pesar de la distancia siempre están presentes para ayudar y motivarme a seguir adelante. Es una lista interminable que siempre recuerdo.

Al profesor José Uriel Sepúlveda Valencia por su incondicional apoyo durante mi proceso investigativo y sobre todo por formar personas de gran valor humano.

Al profesor Henry Jurado Gámez por su motivación para seguir en este proceso.

Al profesor Diego Alonso Restrepo Molina por su dedicación, asesoría y disposición para la enseñanza y divulgación científica.

Al grupo de Investigación PROBIOTEC FORAPIS de la Universidad de Nariño y al Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos - GICTA de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Al laboratorio de Productos Lácteos y a su personal que se caracteriza por el gran recibimiento y brindar ayuda en momentos difíciles: Deisy Carolina Valencia, Omar Alexander Loaiza, Jose Luis Soto, Sandra Liliana Vargas, Isabel Dávila Morales.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, al Departamento de Ingeniería Agrícola y de Alimentos y al Laboratorio de Procesos Agrícolas de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, por el apoyo brindado en la fase experimental con el acceso a instalaciones y equipos para el desarrollo de la investigación.

Resumen

Evaluación de la inclusión de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en panela granulada con propiedades probióticas

El secado por aspersión es una estrategia que permite la preservación y conducción de compuestos bioactivos mediante la formación de una matriz protectora, con alta viabilidad de población bacteriana y de costo accesible. Por otro lado, la producción panelera forma parte de la economía campesina familiar Nariñense y la transformación contribuye en los ingresos monetarios. En el estudio, se evaluó la inclusión de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en panela granulada en el tiempo. Para conseguirlo, se optimizó el secado por aspersión, luego, se caracterizó por: Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), eficiencia de microencapsulación, estudio de supervivencia y estabilidad (64 días). Se determinó la estabilidad del probiótico microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales *in-vitro*. Finalmente, se evaluó la viabilidad en almacenamiento (45 días) en la inclusión de una formulación de panela granulada con *L. reuteri* microencapsulado. Como resultado, los parámetros para el *L. reuteri* microencapsulado se establecieron a 130 °C de temperatura de entrada, 10% de maltodextrina y 10 % de inulina. En la caracterización del material encapsulado se observaron partículas esféricas con superficie lisa de 6.085±0.621 µm, EE 96.122±0.245 %, viabilidad 8.781±0.178 Log UFC/g, humedad 3.120±0.057 y a_W 0.255±0.003. La viabilidad de *L. reuteri* microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales fue mayor a 8.118±0.434 Log UFC/g. Finalmente, se desarrolló una formulación de panela granulada con la inclusión de *L. reuteri* microencapsulado con viabilidad de 10.658±0.867 Log UFC/g, humedad (2.088±0.093 - 5.032±0.065) y a_W (0.394±0.002 - 0.601±0.002). Estos resultados, indican que la formulación es viable en términos de viabilidad, a_W, humedad, composición nutricional y aceptación sensorial.

Palabras clave: Secado por aspersión, *Limosilactobacillus reuteri*, panela, maltodextrina, inulina.

Abstract

Evaluation of the inclusion of microcapsulated *Limosilactobacillus reuteri* in granulated jaggery with probiotic proprieties

Spray drying constitutes an effective approach for preserving and delivering bioactive compounds by forming a protective matrix that ensures high bacterial viability at a relatively low cost. Moreover, panela production is integral to the family-scale peasant economy of Nariño, with value-added processing contributing to household incomes. This study investigated the temporal inclusion of microencapsulated *Limosilactobacillus reuteri* in granulated panela. To achieve this, the spray-drying process was optimized, and the resulting powder was characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), encapsulation efficiency (EE), survival and stability assays over 64 days, and *in-vitro* gastrointestinal simulation. Finally, probiotic viability was assessed during 45 days of storage in a formulated granulated panela containing microencapsulated *L. reuteri*.

Optimal microencapsulation conditions were established at a 130 °C inlet temperature with 10% maltodextrin and 10% inulin. SEM revealed spherical, smooth-surfaced microcapsules averaging 6.085±0.621 µm in diameter; EE was 96.122±0.245%, viability reached 8.781±0.178 Log CFU/g, moisture content was 3.120±0.057%, and water activity (a_W) was 0.255±0.003. Under simulated gastrointestinal conditions, microencapsulated *L. reuteri* viability exceeded 8.118±0.434 Log CFU/g. The granulated panela formulation maintained a viability of 10.658±0.867 Log CFU/g, moisture between 2.088±0.093% and 5.032±0.065%, and a_W between 0.394±0.002 and 0.601 ± 0.002. These results demonstrate that the formulated product is viable with respect to probiotic viability, a_W, moisture content, nutritional composition, and sensory acceptance.

Keywords: Spray drying, *Limosilactobacillus reuteri*, panela, maltodextrin, inulin.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **V**

Lista de figuras ..... **X**

Lista de tablas ..... **XI**

Introducción **1**

Objetivos **4**

1.Capítulo 1. Marco teórico **5**
1.1 Panela 5
1.1.1 Producción y Consumo 6
1.1.2 Contenido nutricional de panela 7
1.2 Alimento Funcional 8
1.3 Probióticos 9
1.3.1 Bacterias Ácido Lácticas 11
1.3.2 *Limosilactobacillus reuteri* - *Lactobacillus reuteri* 11
1.4 Prebióticos 13
1.4.1 Inulina 14
1.4.2 Maltodextrina 14
1.5 Microencapsulación 15
1.5.1 Secado por aspersión 16
1.6 Condiciones gastrointestinales 17
1.7 Vida útil 18
1.7.1 Contenido de humedad y actividad de agua (a_W) 19
1.8 Coordenadas CIEL*a*b* 20
1.9 Pruebas sensoriales 21
1.10 Bibliografía 22

2.Capítulo 2. Caracterización preliminar de *Limosilactobacillus reuteri* **33**
2.1 Resumen 33
2.2 Introducción 33
2.3 Metodología 35
2.3.1 Ubicación 35
2.3.2 Experimentación preliminar 35
2.3.3 Análisis estadístico 37
2.4 Resultados 38
2.5 Discusión 39
2.5.1 Reconstitución, siembre y conservación de *Limosilactobacillus reuteri* 39

2.6 Conclusiones y recomendaciones 41
2.6.1 Conclusiones 41
2.6.2 Recomendaciones 41
2.7 Bibliografía 41

3.Capítulo 3. Optimizar el proceso de secado por aspersión para la obtención de microcápsulas de *Limosilactobacillus reuteri* 45
3.1 Resumen 45
3.2 Introducción 46
3.3 Metodología 47
3.3.1 Optimización del secado por aspersión para la obtención de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado 47
3.3.2 Caracterización con Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) 47
3.3.3 Eficiencia de la microencapsulación 48
3.3.4 Estudio de supervivencia y estabilidad 48
3.3.5 Evaluación de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en el tiempo 50
3.3.6 Análisis estadístico 50
3.4 Resultados 50
3.4.1 Optimización del secado por aspersión para la obtención de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado 50
3.4.2 Caracterización con Microscopia Electrónica de Barrido - MEB 55
3.4.3 Eficiencia de la microencapsulación y estudio de supervivencia y estabilidad 55
3.4.4 Evaluación de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en el tiempo 56
3.5 Discusión 58
3.5.1 Optimización del secado por aspersión para la obtención de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado 58
3.5.2 Caracterización con Microscopia Electrónica de Barrido - MEB 60
3.5.3 Eficiencia de la microencapsulación y estudio de supervivencia y estabilidad. 61
3.5.4 Evaluación de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en el tiempo 63
3.6 Conclusiones y recomendaciones 64
3.6.1 Conclusiones 64
3.6.2 Recomendaciones 65
3.7 Bibliografía 65

4.Capítulo 4. Determinar la supervivencia del microencapsulado de *Limosilactobacillus reuteri* bajo condiciones gastrointestinales *in vitro* 71
4.1 Resumen 71
4.2 Introducción 71
4.3 Metodología 72
4.3.1 Condiciones gastrointestinales *in vitro* 72
4.3.2 Fase gástrica 73
4.3.3 Fase intestinal 73
4.3.4 Análisis estadístico 74
4.4 Resultados 74
4.4.1 Condiciones Gastrointestinales *in-vitro* 74
4.5 Discusión 75
4.6 Conclusiones y recomendaciones 77
4.6.1 Conclusiones 77
4.6.2 Recomendaciones 78
4.7 Bibliografía 78

5.Capítulo 5. Evaluar la estabilidad durante el almacenamiento de una panela granulada adicionada con *Limosilactobacillus reuteri* 81
5.1 Resumen 81
5.2 Introducción 82
5.3 Metodología 82
5.3.1 Inclusión de *Limosilactobacillus reuteri* en panela granulada 82
5.3.2 Viabilidad UFC/g 83
5.3.3 Humedad % 83
5.3.4 Actividad de agua a_W 84
5.3.5 Solubilidad % 84
5.3.6 Humectabilidad min 84
5.3.7 Coordenadas CIEL*a*b* 84
5.3.8 Análisis bromatológico 84
5.3.9 Identificación de colorantes 85
5.3.10 Pruebas microbiológicas 85
5.3.11 Prueba sensorial – Aceptabilidad por ordenamiento 86
5.3.12 Análisis estadístico 87
5.4 Resultados 88
5.4.1 Viabilidad 88
5.4.2 Humedad 90
5.4.3 Actividad de agua - a_W 91
5.4.4 Solubilidad % 92
5.4.5 Humectabilidad 93
5.4.6 Coordenadas CIEL*a*b* 95
5.4.7 Análisis bromatológico 98
5.4.8 Identificación de colorantes y pruebas microbiológicas 99
5.4.9 Prueba sensorial – Aceptabilidad por ordenamiento 100
5.5 Discusión 101
5.5.1 Evaluación de estabilidad durante el almacenamiento de una panela granulada adicionada con *Limosilactobacillus reuteri* 101
5.5.2 Coordenadas CIEL*a*b* 104
5.5.3 Análisis bromatológico 105
5.5.4 Identificación de colorantes y pruebas microbiológicas 106
5.5.5 Prueba sensorial – Aceptabilidad por ordenamiento 106
5.6 Conclusiones y recomendaciones 107
5.6.1 Conclusiones 107
5.6.2 Recomendaciones 107
5.7 Bibliografía 108

6.Conclusiones y recomendaciones 111
6.1 Conclusiones 111
6.2 Recomendaciones 112

A. Anexo: Prueba T-Student, Resistencia a diferentes temperaturas. 113

B. Anexo: Análisis estadístico para capítulo 3 – Optimizar el proceso de secado por aspersión para la obtención de microcápsulas de *Limosilactobacillus reuteri* 115

C. Anexo: Análisis estadístico para capítulo 5 - Evaluar la estabilidad durante el almacenamiento de una panela granulada adicionada con *Limosilactobacillus reuteri* 121

Bibliografía 145

Lista de figuras

Pág.

Figura 2-1: a). Colonias de *Limosilactobacillus. reuteri* en agar con azul de anilina. b). Tinción de gram para *L Limosilactobacillus reuteri* con objetivo 100X. 38
Figura 2-2: Resistencia a diferentes niveles de temperatura de *Limosilactobacillus. reuteri*..... 39
Figura 3-1: a) Grafica de efectos principales para rendimiento (%). b) Grafica superficie de respuesta estimada para rendimiento (%). temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %. 51
Figura 3-2: a). Grafica de efectos principales para humedad (%). b) Grafica superficie de respuesta estimada para humedad (%). temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %..... 52
Figura 3-3: a). Grafica de efectos principales para a_W. b). Grafica superficie de respuesta estimada para a_W. temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %. 52
Figura 3-4: a). Grafica de efectos principales para viabilidad (Log UFC/g). b). Grafica superficie de respuesta estimada para viabilidad (Log UFC/g). temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %. 53
Figura 3-5: Superficie respuesta para optimización. Deseabilidad vs temperatura y maltodextrina. 54
Figura 3-6: Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) de *Limosilactobacillus reuteri* ME con inulina y maltodextrina al 10% (w/v). 55
Figura 3-7: Evaluación en el tiempo (64 días) de *Limosilactobacillus. reuteri* microencapsulado: a) viabilidad Log UFC/g. b) humedad %. c) actividad de agua (a_W) (64 días). 57
Figura 4-1: Intervalos de viabilidad expresados en Log UFC/g de *L reuteri* microencapsulado frente a condiciones gastrointestinales..... 75
Figura 5-1: Interacción en el tiempo de medias de viabilidad (Log UFC/g) en panela granulada. 89
Figura 5-2: Interacción en el tiempo de medias de viabilidad (Log UFC/g) en panela granulada. 90
Figura 5-3: Interacción en el tiempo de humedad (%) en panela granulada. 91
Figura 5-4: Interacción en el tiempo de medias de a_w en panela granulada. 92
Figura 5-5: Interacción en el tiempo de solubilidad (%) en panela granulada. 93
Figura 5-6: Interacción en el tiempo de humectabilidad (min) en panela granulada..... 94
Figura 5-7: Interacción en el tiempo de las coordenadas CIEL*a*b* - Coordenada L*. 95
Figura 5-8: Interacción en el tiempo de las coordenadas CIEL*a*b* - Coordenada a*..... 96
Figura 5-9: Interacción en el tiempo de las coordenadas CIEL*a*b* - Coordenada b* 97
Figura 5-10: Intervalos de los tratamientos evaluados tto 3 y tto 5: a) humedad %. b) ceniza %. c) Proteína% y d) Azucares reductores %. 99
Figura 5-11: Pruebas microbiológicas Peel Plate EC Microbial: a). Test *E. coli* & Coliform, b). Test Aeróbicos contables, c). Test *Staphylococcus aureus*..... 100

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Requisitos fisicoquímicos de la panela granulada o pulverizada. 8
Tabla 1-2: Clasificación general de los métodos para evaluación sensorial 21
Tabla 2-1: Ajuste de inoculo para *Limosilactobacillus reuteri.* 36
Tabla 2-2: Producción de Exopolisacáridos por *Limosilactobacillus reuteri.* 38
Tabla 3-1: Combinación de los niveles de factores para optimización correspondiente a cada variable respuesta (Rendimiento, humedad, a_W, viabilidad). 53
Tabla 3-2: Optimización de múltiples respuestas en la microencapsulación de *Limosilactobacillus reuteri*. 54
Tabla 3-3: Modelos ajustados para las variables evaluadas en el tiempo. 57
Tabla 4-1: ANOVA para pruebas gastrointestinales *in vitro.* 74
Tabla 5-1: Métodos para análisis bromatológico realizado a panela granulada..... 85
Tabla 5-2: Pruebas microbiológicas realizadas a panela granulada con adición de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado. 86
Tabla 5-3: Ficha para prueba de aceptabilidad por ordenamiento. 87
Tabla 5-4: Análisis bromatológico de panela granulada con adición de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado (15%) y control. 98
Tabla 5-5: Análisis de identificación de colorantes y pruebas microbiológicas. 100
Tabla 5-6: Media, mediana y sumatoria de niveles asignados a cada tratamiento..... 101

Introducción

La panela es un endulzante natural obtenido al someter el juego de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) a elevadas temperaturas, en este proceso se concentran las azúcares y se reduce la humedad hasta un 3% (Aponte, 2020). La panela se caracteriza por su contenido en minerales, vitaminas, aminoácidos, proteínas, antioxidantes (Lee *et al*., 2018), sacarosa y menos del 10% de glucosa y fructosa, que le confieren un alto valor nutricional y posible reducción del riesgo de diabetes (Asfaq *et al*., 2023; H. Ramírez, 2018).

Las cifras de la Unidad de Planificación Rural Agropecuaria (UPRA, 2023) indican que Colombia es el segundo productor de panela a nivel mundial, centrándose nacionalmente en los departamentos de Santander, Cundinamarca, Antioquia, Boyacá y Nariño (SIPA, 2023). Sin embargo, el consumo de panela a nivel nacional entre 2000 y 2021 ha decrecido constantemente (UPRA, 2023), la disminución de la demanda junto a la variación en el precio, son factores que afectan principalmente la agricultura familiar y el pequeño productor tradicional, actores con gran participación en la producción de panela nacional (Rodriguez *et al*., 2019), alteraciones que se pueden disminuir mediante el desarrollo de nuevas propuestas alimentarias de la mano con la innovación y tecnología.

El consumo de panela en Colombia disminuye a medida que aumentan los ingresos familiares debido a la elasticidad negativa de la demanda, los cambios en los hábitos de consumo, la preocupación por la salud y las preferencias culturales (Rodriguez *et al*., 2019). Para asegurar la sostenibilidad de la producción de panela, es importante posicionarla como un producto de alto valor agregado con atributos diferenciadores en el mercado (FEDEPANELA, 2022), entre ellos, la presentación e innovación. La panela granulada o en polvo gracias a su rápida solubilidad y fácil dosificación, es de cómoda manipulación y mayor versatilidad para uso en recetas, además, por el bajo contenido de humedad (10-30 g/kg panela granulada y 50-120 g/kg en bloque) se estima que la vida útil es mayor a comparación con la presentación de panela en bloque (Verma *et al*., 2019a).

Sin embargo, los crecientes problemas de salud a nivel mundial, la globalización, la eficacia de los probióticos, el aumento de la diversidad étnica e ingredientes alimentarios más nutritivos, son algunos de los factores claves para el crecimiento del mercado de probióticos (Tufarelli & Laudadio, 2016), de tal forma que la ciencia y tecnología alimentaria ha desarrollado un carácter dinámico y se han diseñado nuevos alimentos, entre ellos los alimentos funcionales, probióticos, prebióticos y simbióticos (May-Torruco *et al*., 2020). Una de las principales características de los probióticos, generalmente Bacterias Ácido Lácticas (BAL), es su distribución en la naturaleza y producción de metabolitos de gran interés para la salud humana y animal, industrias de alimentos, farmacéutica, cosmética y química (El-Enshasy & Yang, 2021).

En la salud humana y/o animal, los probióticos tienen la capacidad de colonizar y multiplicarse en el intestino del consumidor después de la administración, lo que conlleva efectos beneficiosos al modular diversos sistemas biológicos en el hospedador (Divyashree *et al*., 2024). Algunos de los microorganismos comúnmente utilizados en los probióticos son *Lactobacillus rhamnosus, Limosilactobacillus reuteri, Lactobacillus casei* y especies del genero *Bifidobacteria,* (Essa *et al*., 2023). No obstante, la viabilidad de los microorganismos se ve afectada por las condiciones ambientales y gastrointestinales, como temperatura, humedad, pH y oxígeno (Rodrigues *et al*., 2020). La inclusión especifica de probióticos en el diseño de un alimento funcional requiere la utilización de métodos que protejan el microrganismo para evitar disminución en las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) mínimas recomendadas que ejercen el efecto probiótico en el consumidor (10^6-10^8 UFC/mL) (El-Enshasy & Yang, 2021; Yin *et al*., 2024). Una alternativa es la microencapsulación de BAL mediante el método de “secado por aspersión” o “spray drying”, es el más recomendado y utilizado debido a su bajo costo y alta eficiencia en el proceso (Yin *et al*., 2024).

La microencapsulación se entiende como la captura de un compuesto activo dentro de una matriz o material pared que lo protege de las condiciones del entorno, minimiza la interacción con otros componentes, controla su liberación y aumenta la estabilidad de los compuestos bioactivos preservando su integridad (Laureanti *et al*., 2023). Existe gran cantidad de materiales de recubrimiento, entre ellos, maltodextrina e inulina, Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) (Oluwatosin *et al*., 2022) y clasificados como prebióticos por sus efectos benéficos y su crecimiento bacteriano selectivo en función de BAL y la flora bacteriana del tracto intestinal (Luzzi *et al*., 2024; Shah *et al*., 2020) , en esta sentido, la maltodextrina MD, es un polisacárido derivado de la hidrolisis acida o enzimática de almidón (Saavedra–Leos *et al*., 2018), de bajo costo y alta eficiencia en encapsulación de materiales (Laureanti *et al*., 2023), y la inulina, un polisacárido lineal que se

encuentra principalmente en plantas (S. Zhang *et al*., 2023). Los alimentos funcionales poseen propiedades específicas que las diferencias de los alimentos convencionales, más allá de su valor nutricional, influye de manera medible en las funciones fisiológicas en términos de promoción de la salud o prevención de enfermedades (May-Torruco *et al*., 2020). Un alimento funcional puede ser natural, al que se le ha añadido o eliminado un ingrediente, producto al que se le han modificado componentes, biodisponibilidad, o cualquier combinación de estas posibilidades (Pérez-Martínez *et al*., 2023).

La inclusión de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulada en panela granulada como alimento con características funcionales en el municipio de Pasto, Nariño, es una propuesta biotecnológica aplicada en la agroindustria rural en la región. La producción panelera abarca desde el cultivo hasta su transformación, proceso guiado por la mano del productor. Así, la integración de probióticos con la producción panelera, y el uso de nuevas tecnologías para el diseño de un alimento con características funcionales, puede generar un producto con valor agregado

De acuerdo con lo mencionado anteriormente y por medio de esta investigación se formula la siguiente la pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto de la inclusión de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en panela granulada con características probióticas?

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la inclusión de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en panela granulada con propiedades probióticas.

Objetivos específicos

- Optimizar el proceso de secado por aspersión para la obtención de microcápsulas de *Limosilactobacillus reuteri*.

- Determinar la supervivencia del microencapsulado de *Limosilactobacillus reuteri* bajo condiciones gastrointestinales *in vitro*.

- Evaluar la estabilidad durante el almacenamiento de una panela granulada adicionada con *Limosilactobacillus reuteri.*

1. Capítulo 1. Marco teórico

1.1 Panela

La panela es un edulcorante tradicional no centrifugado, popular en muchos países de Suramérica y Asia (Verma *et al*., 2019). Producto sólido que se obtiene a través de la evaporación, concentración y cristalización del jugo de la caña de azúcar, posteriormente se moldea o somete a una reducción de partícula mediante procesos físicos para obtener presentaciones en bloque o gránulos (Aponte, 2020; Solís-Fuentes *et al*., 2019). Sin importar su presentación, este producto es soluble en agua, se puede utilizar en la industria alimentaria para la fabricación de refrescos, en repostería como endulzante, disponible para consumo directo en bebidas calientes, café, chocolate, aromáticas, té, salsas para carnes, conservas de frutas, verduras, y suplemento energético (Gupta *et al*., 2023).

Dependiendo del contenido de humedad, la panela que se puede encontrar en bloque, gránulos o liquida, se caracteriza por tener un tono dorado, textura firme y naturaleza cristalina, es conocida por sus beneficios para la salud como favorecer la digestión, aliviar el estreñimiento, limpiar el hígado, aumentar la energía, purificar la sangre, tener efectos anticancerígenos y antitóxicos (Bashir *et al*., 2023).

Como sistema productivo, una gran fracción de la producción de panela es artesanal, se hace bajo métodos de economía campesina, siendo la principal actividad económica y estratégica de empleo para familias rurales, que dinamiza la economía de las regiones paneleras vinculando a trabajadores campesinos, transportadores y comerciantes (UPRA, 2023). Este producto juega un papel importante en el desarrollo económico y social, contribuyendo en el Producto Interno Bruto (PIB) y generando alrededor de 290.000 empleos, distribuidos en los departamentos colombianos de Santander, Boyacá, Cundinamarca, Antioquia, Nariño y Huila (Beltrán Martínez, 2020; Sanchez *et al*., 2024).

El modelo convencional de producción de panela ha perdido rentabilidad en comparación con años anteriores, debido a las nuevas demandas del mercado. Los consumidores actuales, la industria

alimentaria y los mercados internacionales exigen productos con altos estándares de calidad y presentaciones innovadoras (Silva Gonzáles, 2020). En respuesta a estas demandas, la panela granulada ha surgido como una alternativa tanto para el consumo directo como para su uso en la industria alimentaria, donde se emplea como sustituto de azúcares no saludables. A través de la generación de valor agregado y el aseguramiento de la inocuidad del producto, es posible posicionar la panela granulada en mercados especializados y en la industria de alimentos (Silva Gonzáles, 2020; Verma *et al*., 2019). Además, Bhola & Bhadekar (2024) determinaron que la incorporación de panela líquida orgánica como aditivo favorece significativamente la promoción de los probióticos, mejorando tanto las cinéticas de crecimiento como los rasgos funcionales asociados al crecimiento microbiano.

1.1.1 Producción y Consumo

Culturalmente, la panela se comercializa en Colombia en forma de bloques de distintos tamaños, pesos y diseños. Sin embargo, han surgido otras formas de presentación, como la panela granulada, en pastillas saborizadas y en pequeñas porciones listas para el consumo personal, tendencias que han ganado popularidad en supermercados y tiendas especializadas (Alarcón *et al*., 2020; UPRA, 2023a). De acuerdo con las cifras de UPRA (2023), para el año 2022 el país alcanzó un área total cosechada de 170.464 ha, un promedio de rendimiento de 5.45 Ton/ha, una producción total de 1,053,674 Ton, en 29 departamentos del país, cubriendo 542 municipios. La producción se centró en los departamentos de Santander, Cundinamarca, Antioquia, Boyacá y Nariño (SIPA, 2023; UPRA, 2023).

El mercado de exportación de panela es dinámico y presenta constante crecimiento, con una tasa de incremento anual del 21% desde el 2011 tanto en volumen como en valor. En 2021, las exportaciones alcanzaron 12 mil Ton, generando ingresos de 16 millones de dólares, mientras que para el 2020 el valor exportado fue de 18 millones de dólares, lo que resalta el gran potencial de este mercado. Las importaciones de panela son mínimas y poco frecuentes, manteniendo una balanza comercial siempre superavitaria (SIPA, 2023; UPRA, 2023). En exportación, se presentó un crecimiento de 300% en los últimos años, pasando de exportar 3.000 Ton en 2015 a exportar 12.000 Ton para el año 2020, tendencia explicada por el consumo de productos con propiedades nutricionales en todo el mundo, algunos de los principales destinos son Estados Unidos, España, Italia, Chile y Panamá (Sanchez *et al*., 2024; Tovar & Parra, 2020; UPRA, 2023a). Se exportaron 716 mil toneladas por

valor de 327 millones de dólares en 2020 (33% de la producción), ubicando el sector como el cuarto generador agroindustrial de divisas después de café, flores, banano y aceite de palma. La agroindustria de la caña representa el 0,6% del PIB Total Nacional y el 3,7% del PIB Agrícola nacional (Tovar & Parra, 2020; UPRA, 2023). La panela se ha convertido en un producto importante para el mercado internacional, consumido por comunidades colombianas, venezolanas o mexicanos en el exterior, y ahora la demandan cada vez más, tanto los hogares de otras culturas como diferentes sectores de la cocina internacional (Sanchez *et al*., 2024).

1.1.2 Contenido nutricional de panela

La panela es un alimento básico para la población rural y urbana que sustituye el azúcar refinado. A diferencia de éste, el proceso de elaboración de panela evita la pérdida de los nutrientes, vitaminas y minerales (Gupta *et al*., 2023; Tyagi *et al*., 2022). Este producto es rico en proteínas 280 mg/100g, calcio 40-100 mg, magnesio 70-90 mg, potasio 10-56 mg, fósforo 20-90 mg, sodio 19-30 mg, hierro 10-13 mg, manganeso 0,2-0,5 mg, zinc 0,2- 0,4 mg, cobre 0,1- 0,9 mg, cloruro 5,3 mg, vitamina A 3,8 mg, B1 0,01 mg, B2 0,06 mg, B5 0,01 mg, B6 0,01 mg, C 7,00 mg, D2 6,50 mg (Shrivastav *et al*., 2016; Solís-Fuentes *et al*., 2019). Además, contiene polifenoles que pueden variar en un rango de 3000 a 6000 µg/g (GAE) (Verma *et al*., 2019).

La panela es más compleja que el azúcar común, se compone de cadenas más largas de sacarosa, que se traduce en una liberación lenta de energía y no espontanea. Además, las sales minerales presentes en la panela constituyen una fuente excepcional de minerales esenciales (Asfaq *et al*., 2023; Kumar & Singh, 2020). Los productos de caña de azúcar no refinados son particularmente ricos en componentes fenólicos, especialmente flavonoides, que exhiben efectos antioxidantes y antimicrobianos, compuestos bioactivos característicos para el desarrollo de alimentos funcionales (Barrera *et al*., 2024; Nath *et al*., 2015). De igual modo, se atribuyen varios efectos beneficiosos para la salud a los extractos de caña de azúcar, incluyendo propiedades contra líneas celulares cancerígenas, estimulación y regulación del sistema inmunológico, protección contra el daño hepático, recuperación de la función intestinal, propiedades antitrombóticas y antiestrés, un rol protector contra el daño en el ADN, estimulación del crecimiento y prevención de trastornos como la hipertensión y la diabetes (Barrera *et al*., 2024).

En Colombia, la producción panelera es regulada por la Resolución No. 779 de 2006 y los requisitos fisicoquímicos para la panela granulada o pulverizada se presentan en la NTC 1311 (ICONTEC,

2009), valores a cumplir para la comercialización de la panela apto para consumo humano (**Tabla 1-1**).

Tabla 1-1: Requisitos fisicoquímicos de la panela granulada o pulverizada.

Requisitos	Mínimo	Máximo
Humedad %	--	5.0
Cenizas %	1.0	--
Azúcares totales (sacarosa) %	--	93.0
Azúcares reductores (glucosa) %	5.0	--
Proteínas, en % (N x 6.25)	0.2	--
Potasio mg/100 g	100.0	-
Calcio mg/100 g	10.0	--
Fosforo mg/100 g	5.0	---
Hierro mg/100 g	1.5	---
Colorantes	Ausencia	

Fuente: Tomado de NTC 1311 (ICONTEC, 2009)

1.2 Alimento Funcional

El concepto “alimento funcional” se atribuye a alimentos que tienen posibles efectos beneficiosos para la salud más allá de su valor nutricional básico, promueven la buena salud y reducen el riesgo de enfermedades, dicho significado fue iniciado y regulado por el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón en el año 1980 y luego avanzó a Norte América y otros mercados (Essa *et al*., 2023a). La responsabilidad de dichos efectos beneficiosos se atribuye a compuestos bioactivos presentes en frutas, productos animales y vegetales específicos, que demuestran en estudios epidemiológicos la reducción de los riesgos de diversos trastornos metabólicos (Karasawa & Mohan, 2018).

Los alimentos funcionales se clasifican en tres categorías: alimentos de uso convencional, alimentos modificados e ingredientes alimentarios. Los alimentos de uso convencional son aquellos que no ha sufrido ninguna modificación y se presentan como un todo, entre ellos verduras, frutas, pescado, lácteos, legumbres y cereales. Los alimentos modificados corresponden a productos enriquecidos o fortificados con un nutriente específico, se encuentran bebidas, snacks, harinas y galletas enriquecidas con calcio, fosforo, vitaminas, antioxidantes, esteroles de fibra vegetal y ácidos grasos (Essa *et al*., 2023; Hasler & Brown, 2009). Finalmente, los ingredientes alimentarios son prebióticos, grupo compuesto por oligofructosa, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y

transgalactooligosacáridos (TOS), compuestos fermentables por la microbiota intestinal que produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC), mejoran la cognición, la inmunidad, la absorción de Ca^{2+}, disminuye la prevalencia del síndrome del intestino irritable (SII) y el cáncer colorrectal (Essa *et al*., 2023; Hasler & Brown, 2009; Marco *et al*., 2021).

La panela es considerada como alimento funcional gracias a sus beneficios para el consumidor como, la inhibición del mecanismo genotóxico del arsénico (Singh *et al*., 2008), propiedades para limpiar vías respiratorias y esófago (Shrivastav *et al*., 2016). Además, contiene fitoquímicos, compuestos fenólicos, esteroles vegetales y policosanoles que debido su actividad antioxidante tiene propiedades reductoras del colesterol (Kumar & Singh, 2020).

Los grupos de alimentos funcionales más consumidos y estudiados son los productos lácteos fermentados, los cereales integrales, verduras, semillas y frutos secos. La aceptación de estos alimentos se relaciona con diversos factores: gusto, calidad, precio, comodidad y familiaridad con el producto (Larrea *et al*., 2023). Optimizar el desarrollo de alimentos con propiedades funcionales incitará a los productores a fabricar alimentos de alta calidad, más sanos y sostenibles que satisfagan las expectativas de los consumidores y del mercado, aumentando el potencial innovador y la competitividad de la industria alimentaria.

1.3 Probióticos

De acuerdo con *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP), el término “probiótico” solo debe usarse cuando se ha demostrado un beneficio para la salud conferido por microorganismos vivos bien definidos y caracterizados, este beneficio debe ser resultado de microorganismos vivos y debe extenderse más allá de cualquier beneficio nutricional de la matriz alimentaria (Marco *et al*., 2021; Zhou *et al*., 2024). Por estas razones, los términos “alimentos fermentados” y “probióticos” no pueden usarse indistintamente (Marco *et al*., 2021). Para etiquetar un producto como alimento fermentado probiótico con un beneficio adicional para la salud, se requiere evidencia de un beneficio específico de la cepa proveniente de un estudio de intervención bien controlado junto con una seguridad comprobada y la confirmación de una cantidad suficiente de esa cepa en el producto final para conferirle el beneficio reclamado (Divyashree *et al*., 2024; Marco *et al*., 2021).

De acuerdo con la FAO (2006), citado por Aponte (2020) "los probióticos son microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren efectos saludables al hospedador". Asimismo, el término probiótico incluye una gran cantidad de microorganismos, siendo los más importantes las Bacterias Acido Lácticas (BAL), debido a los efectos benéficos en el tracto gastrointestinal del hospedador (El-Enshasy & Yang, 2021). En este sentido, Perez-Sanchez *et al*. (2013), contemplan el uso de probióticos en diferentes campos y se considera un enfoque moderno desde el punto de vista terapéutico para evitar los impactos adversos de los medicamentos y como una alternativa nutricional y conservadora de alimentos.

Se han realizado un gran número de investigaciones sobre la identificación y selección de microorganismos como probióticos. Para lograr este objetivo, la mayoría de los estudios han seguido varios pasos para el aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos potenciales mediante el empleo de herramientas moleculares, microbiológicas, bioquímicas y tecnológicas, como los enunciados por El-Enshasy & Yang (2021):

- Aislamiento de cepas de una fuente adecuada (las destinadas al consumo humano deben ser de origen humano).
- Identificación fenotípica y genotípica.
- Evaluación de la seguridad de las cepas identificadas.
- Conformidad de las posibles cepas probióticas con los criterios de selección preliminares.
- Justificación de propiedades saludables específicas asociadas con los probióticos mediante un modelo de prueba *in-vitro*, *in-vivo* y *ex-vivo* verificable y repetible.
- Compatibilidad de cepas probióticas con aplicaciones tecnológicas (es decir, fermentación, secado por aspersión o liofilización, competitividad con otras microfloras del alimento en cuestión).

Hutkins (2019), afirma que las cepas probióticas destinadas al consumo humano y animal deben tener el estado Presunción Calificada de Seguridad (QPS), por la EFSA Official Journal o Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS), bajo las secciones 201 (s) y 409 de la Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. Varias BAL han recibido el estatus QPS o GRAS ya que se han usado de manera segura durante mucho tiempo sin ningún informe de problemas asociados con el consumo de alimentos que contienen estas bacterias

1.3.1 Bacterias Ácido Lácticas

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), constituyen un grupo de bacterias gran positivas que comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas; son cocos o bacilos no esporulados, anaeróbicos, que producen ácido láctico como uno de los principales productos de la fermentación de carbohidratos, carecen de catalasa y de citocromos, pertenecen al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, y orden *Lactobacillales*, las diferentes familias incluyen *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae* (Vinderola *et al*., 2019). Las especies que regularmente se usan como probióticos son *Lactobacillus acidophilus*, *Limosilactobacillus reuteri* (*Lactobacillus reuteri), Lacticaseibacillus casei* ssp. *casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus casei* ssp. *rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactobacillus johnsonii* (Goranov *et al*., 2023; Jia *et al*., 2025).

La capacidad probiótica de las BAL se expresa por la producción de componentes antimicrobianos, antioxidantes, péptidos, ácido láctico, exopolisacáridos y otros productos resultantes del metabolismo de las fuentes de energía en su medio (Sørensen *et al*., 2022), mediante la ruta homofermentativa, donde más del 90% del sustrato se convierte en ácido láctico, o la ruta heterofermentativa, cuyos productos finales son ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono. Sin embargo, existen especies del género *Lactobacillus* que tienen las dos vías metabólicas llamadas, heterofermentativas facultativas (Hutkins, 2019; Thatoi *et al*., 2020).

Entre las propiedades que presentan los sustratos metabólicos lácticos, se encuentran, inhibición de la adherencia de patógenos, unión al colesterol a través de la superficie celular, reducción de cadmio en los tejidos, disminución toxicidad por plomo, alivio del estrés oxidativo renal y hepático, capacidad antioxidante y estimulación de microbiota intestinal (Kanauchi, 2019; Sørensen *et al*., 2022). Tradicionalmente, las BAL se han utilizado en la producción de alimentos como bacterias fermentativas, empleadas para preparar productos como yogur, kumis, quesos, vinos, whisky, salsas y productos de pescado (Kanauchi, 2019).

1.3.2 *Limosilactobacillus reuteri - Lactobacillus reuteri*

Limosilactobacillus reuteri, antes conocido como *Lactobacillus reuteri*, se clasifica como un microorganismo Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS), desempeña un papel fundamental en la salud humana (Santos-Rocha *et al*., 2024; Zheng *et al*., 2020). En cuanto a la digestión, nutrición e inmunología, *L. reuteri* facilita la digestión de la leche materna y de alimentos

sólidos en los bebés, fortalece la barrera intestinal que previene la permeabilidad, mejora respuestas inmunológicas, beneficia al huésped al disminuir la producción de citocinas proinflamatorias, favorece el desarrollo y la función de las células T reguladoras, fortalece la barrera intestinal para reducir la translocación microbiana y la inflamación (Bian *et al*., 2011; Santos-Rocha *et al*., 2024).

La actividad probiótica de *L. reuteri* incluye la producción de ácidos orgánicos, etanol, exopolisacaridos y reuterina, responsables de modificar la composición de la microbiota, conferir propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas que permiten controlar el crecimiento de *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Clostridium difficile*, *Salmonella, Candida, neumovirus*, *circovirus*, *rotavirus*, *coxsackievirus* y *papilomavirus* (Bian *et al*., 2011; Mu *et al*., 2018; Santos-Rocha *et al*., 2024).

L. reuteri es un anaerobio facultativo que, a pesar de tener una cadena de transporte de electrones incompleta es capaz de utilizar oxígeno como aceptor final de electrones en presencia de hemo y menaquinona (Pedersen *et al*., 2012). Utiliza tanto la vía de Embden-Meyerhof (EMP) como la vía de fosfocetolasa (PKP), cuando crece en glucosa y produce lactato y etanol como productos de la fermentación. Sin embargo, el crecimiento en glucosa es limitado debido a un desequilibrio redox, lo que da lugar a la formación de etanol en lugar de la formación de acetato, que es energéticamente más favorable (Pedersen *et al*., 2012). La adición de un aceptor de electrones, como la fructosa, restaura el equilibrio redox, lo que resulta en la formación de acetato, ganancia de 1 ATP, mayor tasa de crecimiento y producción de biomasa (Mu *et al*., 2018; Pedersen *et al*., 2012).

Por otra parte, posee una fuerte resistencia a condiciones ácidas y es capaz de resistir y controlar el crecimiento de *H. pylori* (Yang *et al*., 2021). Esta BAL se aísla frecuentemente de yeyuno/íleon y heces de animales (Rajoka *et al*., 2019a). Además, es ampliamente utilizada como aditivo alimentario para mejorar el sistema gastrointestinal y conferir propiedades organolépticas al producto final (Urrutia-Baca *et al*., 2018; Yang *et al*., 2021).

Reuterina

La reuterina es una mezcla de diferentes formas de 3-hidroxi-propionaldehído (3-HPA), compuesto no proteico de bajo peso molecular (PM = 74.08 g/mL), pH neutro y altamente soluble en agua (Mu *et al*., 2018; Urrutia-Baca *et al*., 2018). Metabolito que se produce a partir de la fermentación de

glicerol como fuente de energía por *L. reuteri* en una reacción mediada por la glicerol-deshidratasa dependiente de la coenzima B12 (Chen & Chen, 2013; Mu *et al*., 2018), esta BAL es la única con la capacidad para producir y secretar 3-HPA en cantidades superiores a las necesarias para su requerimiento (Mu *et al*., 2018; Stevens *et al*., 2011). La reuterina tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana, desde bacterias gran negativas hasta gram negativas (Urrutia-Baca *et al*., 2018).

1.4 Prebióticos

De acuerdo con *The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics* (ISAPP), un prebiótico se define como un sustrato utilizado selectivamente por la microbiota del huésped que confiere un beneficio para la salud (Gibson *et al*., 2017). El concepto incluye productos basados en carbohidratos, oligosacáridos, fibra dietética, compuestos fenólicos, ácido linoleico conjugado y ácidos grasos polinsaturados, que han mostrado efectos favorables en la salud (Gibson *et al*., 2017; Luzzi *et al*., 2024). La mayoría de estos son utilizados como ingredientes alimentarios en galletas, cereales, chocolate, cremas untables y productos lácteos (Guarner *et al*., 2017).

La fibra dietética es un componente alimentario no digestible que no pueden ser hidrolizados por enzimas endógenas en estomago e intestino, pero puede ser utilizado por la microflora intestinal (Luzzi *et al*., 2024). Según su solubilidad en agua, la fibra dietética puede clasificarse en fibra soluble, como pectina, gomas, mucílago, galactomananos, β-glucanos, oligosacáridos, fructanos, algunas hemicelulosas y en fibras insolubles, como celulosa, hemicelulosas y lignina (Kheto *et al*., 2023). Las fibras de tipo inulina, fructooligosacáridos y galactooligosacáridos, pueden incluirse en la definición de prebióticos debido a su capacidad fermentativa y la liberación subsecuente de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los cuales estimulan específicamente el crecimiento de microorganismos beneficiosos, incluyendo *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Gibson *et al*., 2017; Luzzi *et al*., 2024).

Los efectos metabólicos de los prebióticos se dan gracias a los productos de la fermentación, en general, AGCC, absorción de iones (Ca, Fe, Mg), estimulación de la inmunidad del huésped mediante producción de IgA, modulación de las citoquinas, mejora de la integridad del epitelio intestinal del colon y la barrera sanguínea del intestino (Luzzi *et al*., 2024; Zhao *et al*., 2020). Los AGCC entran fácilmente en el torrente sanguíneo y atraviesan la barrera hematoencefálica produciendo saciedad y linfocitos activamente antiinflamatorios (Floch *et al*., 2017; Liu *et al*., 2024).

1.4.1 Inulina

La inulina se caracteriza por ser un fructano lineal, reconocido como GRAS, fibra dietética soluble, resistente a la hidrolisis enzimática, absorbida en el intestino delgado en forma de AGCC después de la fermentación, se compone de un 97 % de fructosa, y dependiendo de su longitud de cadena, puede clasificarse como oligosacárido o polisacárido (Kheto *et al*., 2023; Oluwatosin *et al*., 2022), formados por unidades de D-fructosa (fructanos) mediante enlaces β-(2,1) (Floch *et al*., 2017). Jackson *et al*. (2022), han utilizado inulina como ingrediente alimentario y como componente del material pared para encapsular probióticos, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, en combinación con materiales como alginato, leche de cabra, yogur y lactosuero. La adición de inulina en procesos de microencapsulación da lugar a una estructura compacta de la cápsula, y altas UFC bajo condiciones gastrointestinales simuladas (Kheto *et al*., 2023).

1.4.2 Maltodextrina

La maltodextrina es un producto de la hidrólisis parcial del almidón y se considera un polímero de D-glucosa unido por enlaces α-(1, 4) y α-(1, 6), presenta alta solubilidad en agua, sabor neutro, bajo contenido de azúcar, bajo costo, baja viscosidad a concentraciones elevadas y capacidad de proteger materiales encapsulados contra la oxidación (Lacerda *et al*., 2016; Zanoelo *et al*., 2024), debido a estas características se usa ampliamente en la industria de alimentos y como material de recubrimiento en la microencapsulación de bioactivos (Kong *et al*., 2024; Lacerda *et al*., 2016; Zanoelo *et al*., 2024).

Dependiendo del grado de hidrolisis de la maltodextrina, se puede clasificar mediante el valor de Equivalente Dextrosa (ED) que varía desde 0 a 100, el valor más bajo ED corresponde al almidón puro sin tratamiento enzimático y el más alto a glucosa pura (Badin *et al*., 2023). Este valor está relacionado con las propiedades de la maltodextrina, es decir, las maltodextrinas de bajo ED (cadenas poliméricas largas) presentan alta viscosidad y temperatura de transición vítrea (Tg), mientras que altos ED (cadenas poliméricas cortas) tienen baja viscosidad y baja Tg (Badin *et al*., 2023; Siemons *et al*., 2020). En el contexto de la microencapsulación, se requieren agentes protectores para los microorganismos probióticos y reconocidos como GRAS, entre los cuales se incluyen los oligosacáridos como la maltodextrina y la inulina (González *et al*., 2020; Oluwatosin *et al*., 2022).

1.5 Microencapsulación

La microencapsulación es un método para recubrir compuestos bioactivos de condiciones adversas, las microcápsulas formadas juegan un papel importante en la industria alimentaria al aumentar la viabilidad y estabilidad del elemento protegido (Mohamadzadeh *et al*., 2025). Existe gran cantidad de métodos biotecnológicos para proteger compuestos, pero la microencapsulación es una de las técnicas que permite la protección de probióticos mediante el empaquetado en pequeñas cápsulas que se liberan a velocidades controladas (Laureanti *et al*., 2023). Este proceso protege microrganismos contra factores ambientales extremos, mejora la capacidad de supervivencia y mantiene la viabilidad expresada en UFC a la concentración mínima necesaria para entregar sus efectos beneficiosos al hospedador (El-Enshasy & Yang, 2021).

Hutkins (2019), menciona que la viabilidad de los probióticos al momento de su aplicación y acción se ve afectada por condiciones gastrointestinales (pH, peróxido de hidrógeno, concentración de oxígeno, enzimas y sales biliares), el recuento mínimo recomendado es $1x10^9$ UFC para que se consideran los efectos beneficiosos de los probióticos (FAO & OMS, 2018). Los probióticos microencapsulados no solo mejoran la calidad de los alimentos, también brindan varios beneficios al hospedador, como una mejor salud intestinal y propiedades antimicrobianas. La liberación controlada de probióticos en el colon y la mejora de su eficacia tras la administración oral son otras ventajas de la microencapsulación de probióticos, que dependen del material encapsulante (ME), utilizado en la microencapsulación y el proceso aplicado (Luo *et al*., 2022; Mohamadzadeh *et al*., 2025).

Una matriz encapsulante debe ser compatible con probióticos, debe propiciar la viabilidad celular de los probióticos durante y después de los procesos de microencapsulación y ser compatible con el sistema alimentario al que se va a incluir, en general, se usan los prebióticos (Kent & Doherty, 2014), entre ellos, maltodextrinas de diferentes ED (Laureanti *et al*., 2023), este es un polímero digestible y los compuestos bioactivos encapsulados pueden liberarse rápidamente durante la digestión, quedando expuestos a las condiciones gastrointestinales (Badin *et al*., 2023), mientras la inulina, a diferencia de la maltodextrina, es moderadamente soluble en agua, pero sus enlaces glucosídicos β-(2-1) la hacen indigestible para los seres humanos y en gran medida fermentado por microflora intestinal (González *et al*., 2020).

1.5.1 Secado por aspersión

El secado por aspersión o spray-drying es el método de microencapsulación más utilizado para encapsular extractos de frutas y plantas, alimentos funcionales, antioxidantes naturales, vitaminas, ingredientes cosméticos y películas biodegradables (Laureanti *et al*., 2023). Este proceso consiste en atomizar una solución en una cámara de secado con aire caliente, donde se produce la evaporación del agua de las gotas atomizadas, formando así un polvo seco (Qiao *et al*., 2024; Rajam & Anandharamakrishnan, 2015). Entre las ventajas del secado por aspersión se encuentran la velocidad, modo de producción continuo, bajo costo energético y económico, mayor productividad y viabilidad (Qiao *et al*., 2024; Rios-Aguirre & Gil-Garzón, 2021).

Según Lepsien *et al*. (2024), para este proceso se utiliza un fluido que se atomiza mediante una boquilla, las gotas creadas se secan posteriormente en un flujo concurrente o en contracorriente de gas caliente dentro de la cámara de secado. Las gotas que no están suficientemente secas son demasiado pesadas o grandes y caen en la cámara de eliminación, la recolección de las partículas secas se realiza típicamente mediante un ciclón, el producto final se recoge en la cámara de producto, finalmente, el aire pasa a través de un filtro de salida y es extraído por la turbina de salida (aspirador).

Las propiedades finales de los materiales microencapsulados, como la eficiencia y el tamaño de las microcápsulas, humedad y a_w, dependen del tipo y la caracterización del agente de recubrimiento utilizado para la encapsulación (Sarabandi *et al*., 2019). En este sentido, la maltodextrina es un material de revestimiento comúnmente utilizado en la técnica de secado por aspersión debido a su bajo costo, eficiencia de encapsulación de materiales centrales hidrofílicos, como antocianinas y ácido gálico (Yoha *et al*., 2020). Por otra parte, para compuestos hidrofóbicos se usan materiales de revestimiento como proteínas y gomas hidrofílicas que confieren mayor estabilidad, sin embargo, con el fin de mejorar la eficiencia de encapsulación, se ha incrementado las mezclas de materiales para revestimiento y lograr propiedades funcionales que no tienen cuando se usan solos (Laureanti *et al*., 2023; Sarabandi *et al*., 2019).

El secado por aspersión permite obtener un polvo compuesto por microcápsulas, donde, cada partícula se forma a partir de una gota de solución (Lepsien *et al*., 2024). La formación de las microcapsulas está sujeta a diferentes mecanismos, incluido el intercambio de material del disolvente con el aire circundante mientras está suspendida en un campo de flujo turbulento, el tamaño de la boquilla de aspersión, la composición del soluto-disolvente, la colisión con otras partículas en el

campo de flujo, las interacciones dinámicas entre partículas que conducen a la formación de una costra y la colisión final con la pared del secador (Lepsien *et al*., 2024; Rezaei & Netz, 2021; F. Zhang *et al*., 2024).

Las propiedades del producto microencapsulado se ven afectadas por la temperatura, material de recubrimiento y velocidad de flujo (Yoha *et al*., 2020). Behboudi-jobbehdar *et al*. (2013), indicaron que en la microencapsulación de *Lactobacillus acidophilus* el incremento de 120 a 160 °C en la temperatura de entrada durante el secado por aspersión redujo la viabilidad celular en aproximadamente 2 unidades logarítmicas, oscilando entre 9,02 y 7,20 $\log_{10}$ UFC/g. Lorenzoni *et al*. (2018), evaluaron inulina y trehalosa como material pared, obtuvieron eficiencias de encapsulación del 93,12% y 90,34%, respectivamente. Además, la velocidad de flujo durante la alimentación incide en la viabilidad celular, un aumento en esta velocidad reduce el tiempo de retención de las gotas atomizadas que previene la pérdida de viabilidad celular (Yoha *et al*., 2020).

1.6 Condiciones gastrointestinales

Existen tres desafíos clave que enfrentan los probióticos antes de alcanzar la mucosa intestinal: acidez del estómago, presencia de enzimas digestivas y sales biliares en el intestino superior (Laureanti *et al*., 2023). Para superar estas dificultades relacionadas con la estabilidad de los probióticos, la microencapsulación se presenta como una de las técnicas más efectivas. Esta técnica no solo mejora la estabilidad de los probióticos durante el procesamiento y almacenamiento, sino que también asegura su actividad dentro del tracto intestinal (Algaithi *et al*., 2022).

Existen varios modelos de digestión *in vitro* para la evaluación de alimentos, estos se pueden dividir en métodos estáticos y dinámicos, modelos que se diseñan con el fin de simular las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal superior, entre las fases oral, gástrica e intestinal (Brodkorb *et al*., 2019). Los modelos dinámicos son adecuados para simular la digestión de alimentos y productos farmacéuticos, sin embargo, estos modelos son complejos, costosos de implementar y mantener. Por otro lado, los modelos estáticos utilizan una proporción constante de alimento, enzimas y electrolitos, además un control de temperatura y pH para cada fase digestiva. Los modelos estáticos *in vitro* son útiles para predecir los resultados de la digestión *in vivo* (Brodkorb *et al*., 2019; Zimmermann *et al*., 2023).

El Tracto Gastrointestinal (TGI) comprende un canal continuo que induce transformaciones físicas, estructurales y bioquímicas a los componentes de la dieta, desde la cavidad oral hasta el colon. El primer paso de la digestión de los alimentos ocurre en la cavidad oral, donde la masticación y la mezcla con la saliva descomponen los alimentos sólidos y semisólidos, reduciéndolos a partículas más pequeñas y transformándolos en un bolo (Witt & Stokes, 2015). Aunque el procesamiento oral no es una etapa obligatoria de la digestión, es un factor clave en una dieta saludable, prepara los alimentos para iniciar con el metabolismo y determina la aceptabilidad de estos (Meldrum & Yakubov, 2024). Las condiciones orales como fuerzas de fricción, flujo salival, pH, fuerza iónica y la actividad enzimática de lipasa y amilasa inician el proceso digestivo (Arenales, 2019)

En el estómago, las células epiteliales gástricas producen diversas secreciones y enzimas que, al liberarse en el lumen gástrico, facilitan la digestión química, mientras las contracciones de la pared gástrica contribuyen a la trituración mecánica para finalmente formar el quimo gástrico (Bilodeau *et al*., 2022). Entre las principales secreciones destacan el pepsinógeno, proenzima que en un ambiente ácido (pH 1.0-2.0), se convierte en pepsina, caracterizada por su función proteolítica que inicia la digestión de proteínas, y la lipasa gástrica, producida por células zimógenas, encargada de la digestión de lípidos (Bilodeau *et al*., 2022; Brodkorb *et al*., 2019).

Cuando las partículas de alimento son menores a 2 mm se trasladan al intestino delgado donde se digieren mediante secreciones biliares y pancreáticas junto a enzimas especificas (proteasas, lipasas y amilasas) a pH 6.0–7.0, bajo estas condiciones, las macromoléculas se convierten en sustratos simples que atraviesan las vellosidades intestinales y llegan a las células epiteliales para su absorción. Si bien los alimentos ingeridos son degradados principalmente por el estómago y el intestino delgado, algunos componentes, como la fibra dietética, pasan al colon, donde se desintegran por fermentación bacteriana, donde el efecto de los probióticos entra en función (Arenales, 2019; Bilodeau *et al*., 2022; Brodkorb *et al*., 2019).

1.7 Vida útil

La vida útil de un alimento se entiende como el lapso después de su fabricación hasta el momento de consumo, durante el cual debe mantenerse inocuo (Rasane *et al*., 2015). Estudiar la estabilidad ayuda a conocer y mantener la integridad nutricional, contribuir en la salud y el bienestar general de los consumidores (Gojiya *et al*., 2024). En la industria alimentaria, evaluar la estabilidad y

determinar la vida útil de productos tiene impacto en el manejo de almacenamiento, distribución, manejo de desperdicios y costos de producción, herramientas esenciales para investigar las posibilidades de extender la vida útil a través de técnicas adecuadas de formulación y procesamiento (Mizrahi, 2011).

Entre los factores que aceleran la descomposición de los alimentos se puntualizan temperatura, humedad, luz y tiempo, en el mismo sentido, la calidad de diferentes presentaciones comerciales de panelas se ven afectadas por variaciones de a_W, humedad y temperatura, considerados factores críticos de vida útil para alimentos con humedad por debajo del 13% (Bolaños-Cardona *et al*., 2018) (Verma *et al*., 2019b).

1.7.1 Contenido de humedad y actividad de agua (a_W)

El agua actúa como agente para gran variedad de reacciones biológicas y procesos de transporte, mientras un alto contenido es necesario para las funciones de células vivas no es deseable en la conservación de alimentos, favorecen deterioro microbiano y no microbiano durante el almacenamiento (Fennema *et al*., 2017), no solo el contenido de agua se relaciona con la estabilidad de un alimento, se tiene en cuanta el estado o actividad termodinámica del agua en la matriz alimentaria (Aydın *et al*., 2024; Fennema *et al*., 2017).

La a_W, puede variar dependiendo de la composición física y química del alimento, "agua ligada" a los grupos químicos de los alimentos puede estar o no estar disponible para el crecimiento microbiano y/o para reacciones hidrolíticas que deterioran la calidad (Fennema *et al*., 2017; Gichau *et al*., 2020). Generalmente, la reducción del contenido de agua y a_W por debajo de 0.6–0.8 es considerado suficiente para alcanzar tiempos de almacenamiento prolongados sin necesidad de una cadena de frío, por otro lado, la actividad de microorganismos y enzimas se presenta con valores de a_W>0.85 (Aydın *et al*., 2024). Los alimentos de humedad intermedia, entre 20-50% y a_W entre 0.70–0.85, conservan propiedades como la apariencia, el sabor y la textura, y son preferidos por su seguridad microbiológica, alto valor nutricional y facilidad de consumo (Aydın *et al*., 2024; Qiu *et al*., 2019).

La a_W es un parámetro fisicoquímico que describe el estado del agua dentro de un material sólido, se define como la relación entre la presión de vapor del agua en el material y la presión de vapor del agua pura a la misma presión y temperatura (Gichau *et al*., 2020). En complemento, la panela tiene

la capacidad de absorber la humedad de la atmósfera, esta reacción crea condiciones favorables para la inversión de azucares y el crecimiento de diferentes tipos de bacterias y hongos que en última instancia conducen a la producción de alcoholes y ácidos orgánicos que afectan la inocuidad del producto (Asfaq & Chand, 2020).

1.8 Coordenadas CIEL*a*b*

La apariencia constituye uno de los atributos sensoriales más relevantes en la evaluación de la calidad de los alimentos, tanto en su estado fresco como procesado, influyendo significativamente en su comercialización. Este concepto engloba diversas características, tales como el tamaño, la forma, la textura, la masa, el brillo y el color. Particularmente, el color superficial de los alimentos representa el primer criterio de calidad que los consumidores consideran, desempeñando un papel crucial en la aceptación o rechazo del producto. Además, el color puede estar correlacionado con otros atributos de calidad, como defectos sensoriales, nutricionales o visuales, y permite un control inmediato de estos aspectos (Jiang & Westland, 2024; Kontogiorgos, 2024; Pathare *et al*., 2013).

El color de un material puede ser descrito mediante diversos sistemas de coordenadas cromáticas. Entre los sistemas más utilizados se encuentran el sistema de color CIEL*a*b*, creado en 1976, ofrece una representación uniforme de las diferencias de color en relación con la percepción humana. Este sistema permite una evaluación precisa y consistente de las variaciones cromáticas, alineándose con la forma en que el ojo humano distingue los colores (Jiang & Westland, 2024; Pathare *et al*., 2013).

En la industria alimentaria, el sistema CIEL*a*b* es una escala ampliamente utilizada y las coordenadas se leen directamente. Este sistema se considera un espacio de color uniforme en el que se miden dos coordenadas de color, a* y b*, junto con un índice psicométrico de luminosidad, L*. El parámetro a* toma valores positivos para tonos rojizos y negativos para tonos verdosos, mientras que b* toma valores positivos para tonos amarillentos y negativos para tonos azulados. L* es una medida aproximada de la luminosidad, que es la propiedad que permite considerar cada color como equivalente a un tono de la escala de grises, entre el negro y el blanco (Jiang & Westland, 2024; Kontogiorgos, 2024; Pathare *et al*., 2013).

1.9 Pruebas sensoriales

Las pruebas sensoriales están conformadas por un grupo de técnicas para la medición precisa de las respuestas humanas a los alimentos, puede minimizar sesgos de marca y otras influencias de información en la percepción del consumidor (Lawless & Heymann, 2010). La evaluación sensorial se define como el método científico para evocar, medir, analizar e interpretar las respuestas a los productos tal como se perciben a través de los sentidos de la vista, el olfato, el tacto, el gusto y el oído (Lawless & Heymann, 2010; Pimentel *et al*., 2016).

Las pruebas suelen clasificarse según su propósito principal y su uso más válido. Se utilizan comúnmente tres tipos de pruebas sensoriales, cada una con un objetivo diferente y cada una con participantes/panelistas seleccionados utilizando diferentes criterios (Lawless & Heymann, 2010). En la **Tabla 1-2** se muestran la clasificación de los métodos de prueba en la evaluación sensorial de alimentos.

Tabla 1-2: Clasificación general de los métodos para evaluación sensorial

Clase	Pregunta de interés	Tipo de prueba	Características de los panelistas
Discriminación	¿Se diferencian los productos de alguna forma perceptible?	Analítico	Evaluado en cuanto a agudeza sensorial, orientado al método de prueba, a veces entrenado.
Descriptivo	¿En qué se diferencias los productos en características sensoriales específicas?	Analítico	Evaluado en cuanto a agudeza sensorial y motivación, capacitado o altamente capacitado
Afectivo, Preferencia o Aceptabilidad	¿Qué tan populares son los productos o cuales son los productos preferidos?	Hedónico	Examinado para productos, sin formación.

Fuente: Tomado de Lawless & Heymann (2010).

Las pruebas utilizadas para evaluar la preferencia, aceptabilidad o el grado de agrado hacia un producto se denominan pruebas cuantitativas de consumo o pruebas orientadas al consumidor (POC), estas se realizan con paneles de consumidores no entrenados, quienes clasifican diversos

productos en orden ascendente o descendente según su nivel de preferencia o gusto (Civille & Carr, 2015; Pimentel *et al*., 2016). Generalmente, este tipo de pruebas emplea un enfoque de elección forzada, lo que implica que los participantes no pueden asignar empates en su clasificación, garantizando así resultados claros y diferenciados (Lawless & Heymann, 2010). Los datos obtenidos son ordinales, se tratan como no paramétricos y pueden analizarse con la prueba de Friedman y como post hoc la prueba de Wilcoxin. Este método se usa cuando el objetivo es comparar varias muestras para un único atributo, preferencia, requiere menos tiempo que otros métodos y es útil cuando las muestras se deben seleccionar para un análisis posterior (Civille & Carr, 2015). La temperatura de servicio, el volumen y cualquier otro detalle relacionado con la preparación del producto y el método de degustación deben estar estandarizados y controlados (Lawless & Heymann, 2010).

1.10 Bibliografía

Alarcón, Á. L., Orjuela, A., Narváez, P. C., & Camacho, E. C. (2020). Thermal and Rheological Properties of Juices and Syrups during Non-centrifugal Sugar Cane (Jaggery) Production. *Food and Bioproducts Processing*, *121*, 76–90. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.01.016

Algaithi, M., Mudgil, P., Hamdi, M., Redha, A. A., Ramachandran, T., Hamed, F., & Maqsood, S. (2022). Lactobacillus reuteri-fortified camel milk infant formula: Effects of encapsulation, in vitro digestion, and storage conditions on probiotic cell viability and physicochemical characteristics of infant formula. *J Dairy Sci*, *105*(11), 8621–8637. https://doi.org/10.3168/jds.2022-22008

Aponte, D. J. (2020). *Elaboración y evaluación sensorial de un yogur probiotico tipo batido, endulcorado con panela granulada orgánica y aromatizado con concentrado de café orgánico*. Universidad Catolica sedes Sapientiae.

Arenales, I. M. (2019). *Control de pH interno de microcápsulas para la proteccion de probioticos ante condiciones gastrointestinales simuladas.* Universidad Autónoma de Chapingo.

Asfaq, & Chand, K. (2020). Effect of Moisture Absorber and High-Density Polyethylene Bags on Shelf Life of Edible Coated Jaggery Cubes During Storage. *Sugar Tech*, *22*(6), 1130–1137. https://doi.org/10.1007/s12355-020-00849-4

Asfaq, Chand, K., Nasir, G., Hussain, A., Bisht, B., upadhyay, S., Ahmad, S., & Kumar, S. (2023). Numerical optimization of process parameters and quality stability of active edible coated jaggery cubes during storage. *Journal of Agriculture and Food Research*, *14*(June). https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100790

Aydın, A., Yüceer, M., Ulugergerli, E., & Caner, C. (2024). Improving food security as disaster relief using intermediate moisture foods and active packaging technologies. *Applied Food Research*, *4*(1). https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100378

Badin, R., Gaiani, C., Desobry, S., Prakash, S., Bhandari, B., & Burgain, J. (2023). *Food Hydrocolloids Dynamic investigation of maltodextrins surface properties by environmental atomic force microscopy*. *145*(July). https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109081

Barrera, C., Betoret, N., & Seguí, L. (2024). Potential of vacuum impregnation and osmotic dehydration techniques in producing jaggery-fortified apple snacks. *Sustainable Food Technology*, *2*(4), 1041–1051. https://doi.org/10.1039/d3fb00255a

Behboudi-jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I., Jobbehdar, S. B., Yonekura, L., Fisk, I., Behboudi-jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., & Fisk, I. (2013). *Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated L . acidophilus NCIMB 701748 Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated*. *3937*. https://doi.org/10.1080/07373937.2013.788509

Beltrán Martínez, C. (2020). *EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA GESTIÓN DE LOS RESIDUOS DE LA PRODUCCIÓN PANELERA (CACHAZA) EN LA VEREDA NACEDEROS MUNICIPIO DE QUEBRADANEGRA-CUNDINAMARCA*.

Bhola, J., & Bhadekar, R. (2024). Prebiotic effect of daily dietary polyphenols and oligosaccharides on lactobacillus species. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *31*, 100407. https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2024.100407

Bian, L., Molan, A.-L., Maddox, I., & Shu, Q. (2011). Antimicrobial activity of Lactobacillus reuteri DPC16 supernatants against selected food borne pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(4), 991–998. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0543-z

Bilodeau, M., Bouin, M., & Ghia, J.-E. (2022). The Digestive System: From Basic Sciences to Clinical Practice. In P. Poitras & M. Bouin (Eds.), *The Digestive System: from Basic Sciences to Clinical Practice* (0th ed.). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-98381-9

Bolaños-Cardona, L. C., Briñez-Javela, I. A., & Ramírez-Navas, J. S. (2018). Evaluación termodinámica de variables críticas en la Estabilidad de la panela de caña de azúcar. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, *14*(2), 100–110. https://doi.org/10.18359/rfcb.3167

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., … Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1

Chen, G., & Chen, J. (2013). A novel cell modification method used in biotransformation of glycerol to 3-HPA by Lactobacillus reuteri. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(10), 4325–4332. https://doi.org/10.1007/s00253-013-4723-2

Civille, G. V., & Carr, B. T. (2015). *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press. https://doi.org/10.1201/b19493

Divyashree, S., Ramu, R., & Sreenivasa, M. Y. (2024). Evaluation of new candidate probiotic lactobacillus strains isolated from a traditional fermented food- multigrain-millet dosa batter. *Food Biosci*, *57*(December 2023), 103450. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103450

El-Enshasy, H. A., & Yang, S.-T. (2021). Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms. In *Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms* (1st ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781351027540

Essa, M. M., Bishir, M., Bhat, A., Saravana, C., Al-Balushi, B., Hamdan, H., Govindarajan, N., Freidland, R., & Walid Qoronfleh, M. (2023). Functional foods and their impact on health. *Journal of Food Science and Technology*, *60*(3). https://doi.org/10.1007/s13197-021-05193-3

FAO & OMS. (2018). DOCUMENTO DE DEBATE SOBRE LAS DIRECTRICES ARMONIZADAS SOBRE EL USO DE PROBIÓTICOS EN ALIMENTOS Y COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS. In *Comisión del Codex Alimentarius*. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/ar/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-720-40%252FWD%252Fnf40_12s.pdf

FEDEPANELA. (2022, May 31). *Estas son las marcas locales que le están dando una nueva vida a la tradicional panela*. https://fedepanela.org.co/gremio/estas-son-las-marcas-locales-que-le-estan-dando-una-nueva-vida-a-la-tradicional-panela/

Fennema, O., Damodaran, S., & Parkin, K. (2017). *Fennema´s Food Chemistry* (Fifth). Taylor & Francis Group. https://lccn.loc.gov/2016027062

Floch, M., Ringel, Y., & Walker, A. (2017). *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* (1st ed.). Elsevier.

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *14*(8), 491–502. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75

Gichau, A. W., Okoth, J. K., & Makokha, A. (2020). Moisture sorption isotherm and shelf life prediction of complementary food based on amaranth–sorghum grains. *Journal of Food Science and Technology*, *57*(3), 962–970. https://doi.org/10.1007/s13197-019-04129-2

Gojiya, D., Gohil, V., Dabhi, M., & Dhamsaniya, N. (2024). Storage stability of jaggery based sesame spread: A comprehensive study. *Journal of Stored Products Research*, *107*. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2024.102350

González, E., Gómez-Caravaca, A. M., Giménez, B., Cebrián, R., Maqueda, M., Parada, J., Martínez-Férez, A., Segura-Carretero, A., & Robert, P. (2020). Role of maltodextrin and inulin as encapsulating agents on the protection of oleuropein during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem*, *310*, 125976. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125976

Goranov, B., Denkova-Kostova, R., Denkova, Z., & Kostov, G. (2023). Growth kinetics of probiotic lactobacilli strains cultivated in a laboratory bioreactor with stirring. *BIO Web of Conferences*, *58*, 3–7. https://doi.org/10.1051/bioconf/20235802003

Guarner, F., Ellen Sanders, M., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., Kaufmann, P., Karakan, T., Khan, A. G., Kim, N., Andrés De Paula, J., Ramakrishna, B., Shanahan, F., Szajewska, H., Thomson, A., & Le Mair, A. (2017). Probióticos y prebióticos. In *Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología Probióticos y prebióticos*.

Gupta, E., Mishra, P., Mishra, N., Singh, P., & Sheikh, A. (2023). Topic: Utilization of fruit peel for the development of functional fruit peel bar. *Food Chemistry Adv*, *2*(June 2022), 0–5. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100310

Hasler, C. M., & Brown, A. C. (2009). Position of the American Dietetic Association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, *109*(4), 735–746. https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.02.023

Hutkins, R. (2019). *Microbiology and Technology of Fermented Food* (Wiley Blac, Vol. 2). John Wiley & Sons, Inc.

ICONTEC. (2009). Productos Agrícolas Panela. In *Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación* (NTC 1311).

Jackson, P. P., Wijeyesekera, A., Theis, S., van Harsselaar, J., & Rastall, A. R. (2022). Food for thought! Inulin-type fructans: Does the food matrix matter? *J Funct Foods*, *90*(January), 104987. https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104987

Jia, J., Zhang, X., Jia, X., Duan, J., Wu, Z., Deng, X., & Ge, J. (2025). Lactic acid fermentation improves rehydration and emulsifying properties of spray-dried egg yolk powder. *Food Chemistry*, *463*(September 2024). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141352

Jiang, A., & Westland, S. (2024). *Colour Measurement* (pp. 33–48). https://doi.org/10.1007/978-3-031-70920-3_3

Kanauchi, M. (2019). *Lactic Acid Bacteria: Methods and Protocols* (Vol. 1887).

Karasawa, M. M. G., & Mohan, C. (2018). Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review. *Natural Products and Bioprospecting*, *8*(5), 335–346. https://doi.org/10.1007/s13659-018-0186-6

Kent, R. M., & Doherty, S. B. (2014). Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *FRIN*, *64*, 567–576. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.029

Kheto, A., Bist, Y., Awana, A., Kaur, S., Kumar, Y., & Sehrawat, R. (2023). Utilization of inulin as a functional ingredient in food : Processing , physicochemical characteristics , food applications , and future research directions. *Food Chemistry Adv*, *3*(March), 100443. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100443

Kong, X. P., Yang, Q., Wang, Q. L., & Chen, H. Q. (2024). Effects of ball milling treated wheat flour and maltodextrin on the texture and oil absorption properties of fried batter-coated cashews and almonds. *Food Chemistry*, *460*, 140627. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140627

Kontogiorgos, V. (2024). Colour Chemistry. In *Introduction to Food Chemistry* (pp. 131–146). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-53558-1_7

Kumar, A., & Singh, S. (2020). The benefit of Indian jaggery over sugar on human health. *Dietary Sugar, Salt and Fat in Human Health*, 347–359. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816918-6.00016-0

Lacerda, E. C. Q., Calado, V. M. D. A., Monteiro, M., Finotelli, P. V., Torres, A. G., & Perrone, D. (2016). Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 500–510. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.093

Larrea, V., Morell, P., Quiles, A., & Hernando, I. (2023). *Alimentos funcionales: probióticos, prebióticos y simbióticos*. Universidad Politecnica de Valencia.

Laureanti, E. J. G., Paiva, T. S., de Matos Jorge, L. M., & Jorge, R. M. M. (2023). Microencapsulation of bioactive compound extracts using maltodextrin and gum arabic by spray and freeze-drying techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, *253*(September), 126969. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126969

Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food* (Second Edition). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6488-5

Lee, J. S., Ramalingam, S., Jo, I. G., Kwon, Y. S., Bahuguna, A., Oh, Y. S., Kwon, O. J., & Kim, M. (2018). Comparative study of the physicochemical, nutritional, and antioxidant properties of some commercial refined and non-centrifugal sugars. *Food Res Int*, *109*, 614–625. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.047

Lepsien, A., Jüptner, A., Scherließ, R., & Schaum, A. (2024). Control oriented modeling for particle size distributions in a spray drying process. *IFAC-PapersOnLine*, *58*(15), 438–443. https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2024.08.568

Liu, Z., Liu, M., Meng, J., Wang, L., & Chen, M. (2024). A review of the interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on associated disease. *Journal of Future Foods*, *4*(3), 221–232. https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.07.004

Lorenzoni, G., Araújo, M. De, José, A., Queiroz, L., Jacob, E., Smanioto, J., Marlon, É., Flores, D. M., Bona, C. De, Ragagnin, C., & Menezes, D. (2018). Inulin, hi-maize , and trehalose as thermal protectants for increasing viability of Lactobacillus acidophilus encapsulated by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *89*(May 2017), 128–133.

Luo, Y., De Souza, C., Ramachandran, M., Wang, S., Yi, H., Ma, Z., Zhang, L., & Lin, K. (2022). Precise oral delivery systems for probiotics: A review. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 352, pp. 371–384). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.10.030

Luzzi, A., Briata, I. M., Di Napoli, I., Giugliano, S., Di Sabatino, A., Rescigno, M., & Cena, H. (2024). Prebiotics, probiotics, synbiotics and postbiotics to adolescents in metabolic syndrome. *Clin Nutr*, *43*(6), 1433–1446. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2024.04.032

Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *18*, 196–208. https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5

May-Torruco, L. A., Corona-Cruz, A. I., Luna-Jiménez, A. L., González-Cortés, N., & Jiménez-Vera, R. (2020). Sensibilidad y Resistencia a Antibióticos de Cepas Probióticas Empleadas en Productos Comerciales. *European Scientific Journal*, *16*(18), 43–60. https://doi.org/10.19044/esj.2020.v16n18p43

Meldrum, O. W., & Yakubov, G. E. (2024). Journey of dietary fiber along the gastrointestinal tract: role of physical interactions, mucus, and biochemical transformations. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2390556

Mizrahi, S. (2011). Accelerated shelf life testing of foods. In *Food and Beverage Stability and Shelf Life* (pp. 482–506). Elsevier. https://doi.org/10.1533/9780857092540.2.482

Mohamadzadeh, M., Fazeli, A., Vasheghani-Farahani, E., & Shojaosadati, S. A. (2025). Viability and stability evaluation of microencapsulated Lactobacillus reuteri in polysaccharide-based bionanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, *347*(August 2024). https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122693

Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of Lactobacillus reuteri in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*, *9*(APR), 757. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757

Nath, A., Dutta, D., Kumar, P., & Singh, J. (2015). Review on Recent Advances in Value Addition of Jaggery based Products. *Journal of Food Processing & Technology*, *06*(04), 4–7. https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000440

Oluwatosin, S. O., Tai, S. L., & Fagan-Endres, M. A. (2022). Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic – towards a freeze dried Lactobacillus plantarum topical probiotic. *Biotechnol Rep*, *33*, e00696. https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00696

Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A.-J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(1), 36–60. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9

Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M. A., & Gruss, A. (2012). Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*(1), 37–58. https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101255

Pérez-Martínez, P., Ros, E., Pedro-Botet, J., Civeira, F., Pascual, V., Garcés, C., Solá, R., Pérez-Jiménez, F., & Mostaza, J. M. (2023). Functional foods and nutraceuticals in the treatment of hypercholesterolemia: Statement of the Spanish Society of Arteriosclerosis 2023. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis (English Edition)*, *35*, 248–261. https://doi.org/10.1016/j.artere.2023.09.003

Perez-Sanchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., & Balcazar, J. L. (2013). Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture*, *5*, 1–14. https://doi.org/10.1111/raq.12033

Pimentel, T. C., Gomes da Cruz, A., & Deliza, R. (2016). Sensory Evaluation: Sensory Rating and Scoring Methods. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 744–749). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00617-6

Qiao, F., Wang, S., He, J., Hung, W., Ma, X., Gong, P., Li, J., Sun, T., De Souza, C., Zhang, L., & Lin, K. (2024). Investigating the role of membrane lipid composition differences on spray drying survival in Lactobacillus bulgaricus using non-targeted Lipidomics. *Food Chem*, *459*(April), 140336. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140336

Qiu, L., Zhang, M., Tang, J., Adhikari, B., & Cao, P. (2019). Innovative technologies for producing and preserving intermediate moisture foods: A review. *Food Research International*, *116*, 90–102. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.055

Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of Lactobacillus plantarum (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *60*(2), 773–780. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062

Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Hayat, H. F., Hussain, N., Sarwar, S., Aslam, H., Nadeem, A., & Shi, J. (2019). Characterization, the Antioxidant and Antimicrobial Activity of

Exopolysaccharide Isolated from Poultry Origin Lactobacilli. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*(4), 1132–1142. https://doi.org/10.1007/S12602-018-9494-8

Ramírez, H. (2018). *DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE CHOCOLATE EDULCORADO CON PANELA Y RELLENO CON NUEZ DE NOGAL (Juglans neotropica)*. UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS.

Rasane, P., Jha, A., & Sharma, N. (2015). Predictive modelling for shelf life determination of nutricereal based fermented baby food. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(8), 5003–5011. https://doi.org/10.1007/s13197-014-1545-x

Rezaei, M., & Netz, R. R. (2021). Water evaporation from solute-containing aerosol droplets: Effects of internal concentration and diffusivity profiles and onset of crust formation. *Physics of Fluids*, *33*(9). https://doi.org/10.1063/5.0060080

Rios-Aguirre, S., & Gil-Garzón, M. A. (2021). Microencapsulación por secado por aspersión de compuestos bioactivos en diversas matrices: una revisión. *TecnoLógicas*, *24*(51), e1836. https://doi.org/10.22430/22565337.1836

Rodriguez, G., Polo, S., Riveros, M., & Buitrago, A. (2019). *La Agroindustria Panelera Impulsando El Desarrollo Rural En Colombia* (p. 66). Fedepanela - AGROSAVIA.

Saavedra–Leos, M. Z., Leyva-Porras, C., Alvarez-Salas, C., Longoria-Rodríguez, F., López-Pablos, A. L., González-García, R., & Pérez-Urizar, J. T. (2018). Obtención de polvos de jugo de naranja-maltodextrina sin colapso estructural basado en la temperatura de transición vítrea y grado de polimerización. *CYTA J Food*, *16*(1), 61–69. https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1337048

Sanchez, N., Cobo, M., Rodríguez-Fontalvo, D., Ruiz-Pardo, R. Y., & Roedl, A. (2024). Unlocking sustainable solutions: Harnessing residual biomass from Colombia's non-centrifugal sugar chain for green market deployment. *Bioresource Technology Reports*, *26*(May), 101858. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101858

Santos-Rocha, S. J., Mendoza-Ortiz, C., Tobon-Gonzalez, J., Ríos-Estepa, R., & Orozco-Sánchez, F. (2024). Oxygen Transfer Effect on the Growth of Limosilactobacillus reuteri ATCC 53608 and on Its Metabolic Capacity. *Current Microbiology*, *81*(11), 362. https://doi.org/10.1007/s00284-024-03822-6

Sarabandi, K., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., & Mohammadi, A. (2019). Application of gum Arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source. *International Journal of Biological Macromolecules*, *140*, 59–68. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.133

Shah, B. R., Li, B., Al Sabbah, H., Xu, W., & Mráz, J. (2020). Effects of prebiotic dietary fibers and probiotics on human health: With special focus on recent advancement in their encapsulated formulations. *Trends Food Sci Technol*, *102*(June), 178–192. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.010

Shrivastav, P., Verma, A. K., Walia, R., Parveen, R., & Singh, K. A. (2016). Jaggery : a Revolution in the Field of Natural Sweeteners. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, *3*(3), 198–202.

Siemons, I., Politiek, R. G. A., Boom, R. M., van der Sman, R. G. M., & Schutyser, M. A. I. (2020). Dextrose equivalence of maltodextrins determines particle morphology development during single sessile droplet drying. *Food Research International*, *131*, 108988. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108988

Silva Gonzáles, J. (2020). El negocio de la panela se transforma. *LatinPymes*, 18–20.

Singh, N., Kumar, D., Raisuddin, S., & Sahu, A. P. (2008). Genotoxic effects of arsenic: Prevention by functional food-jaggery. *Cancer Letters*, *268*(2), 325–330. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.04.011

SIPA. (2023). *Departamentos paneleros: producción de panela - Colombia*.

Solís-Fuentes, J. A., Hernández-Ceja, Y., Hernández-Medel, M. del R., García-Gómez, R. S., Bernal-González, M., Mendoza-Pérez, S., & Durán-Domínguez-de-Bazúa, M. del C. (2019). Quality improvement of jaggery, a traditional sweetener, using bagasse activated carbon. *Food Biosci*, *32*(July). https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100444

Sørensen, H. M., Rochfort, K. D., Maye, S., MacLeod, G., Brabazon, D., Loscher, C., & Freeland, B. (2022). Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Health Benefits towards Functional Food. *Nutrients* , *14*(14), 1–33. https://doi.org/10.3390/NU14142938

Stevens, M. J. A., Vollenweider, S., Meile, L., & Lacroix, C. (2011). 1,3-Propanediol dehydrogenases in Lactobacillus reuteri: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. *Microbial Cell Factories*, *10*(61). https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-61

Thatoi, H., Mohapatra, P. K. Das, Mohapatra, S., & Mondal, K. C. (2020). Microbial Fermentation and Enzyme Technology. In *Microbial Fermentation and Enzyme Technology*. CRC Press. https://doi.org/10.1201/9780429061257

Tovar, I. M., & Parra, L. C. (2020). *ESTUDIO DE PREFACTIBILIDAD PARA LA PRODUCCIÓN DE PANELA BAJA EN QUÍMICOS SABORIZADA EN EL MUNICIPIO DE CAMPAMENTO ANTIOQUIA Y COMERCIALIZACIÓN DEL PRODUCTO EN EL VALLE DE ABURRÁ* (Issue July).

Tufarelli, V., & Laudadio, V. (2016). AN OVERVIEW ON THE FUNCTIONAL FOOD CONCEPT: PROSPECTIVES AND APPLIED RESEARCHES IN PROBIOTICS, PREBIOTICS AND SYNBIOTICS. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, *4*(3). https://doi.org/10.18006/2016.4(3S).273.278

Tyagi, S. K., Kamboj, S., Himanshu, Tyagi, N., Narayanan, R., & Tyagi, V. V. (2022). Technological advancements in jaggery-making processes and emission reduction potential via clean combustion for sustainable jaggery production: An overview. *Journal of Environmental Management*, *301*(September 2021). https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113792

UPRA. (2023). *Análisis situacional de la cadena agroindustrial de la panela en Colombia*.

Urrutia-Baca, V. H., Escamilla-García, E., de la Garza-Ramos, M. A., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., & Urbina-Ríos, C. S. (2018). In Vitro Antimicrobial Activity and Downregulation of Virulence Gene Expression on Helicobacter pylori by Reuterin. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *10*(2), 168–175. https://doi.org/10.1007/s12602-017-9342-2

Verma, P., Shah, N. G., & Mahajani, S. M. (2019a). Why jaggery powder is more stable than solid jaggery blocks. *LWT - Food Science and Technology*, *110*(April), 299–306. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.093

Verma, P., Shah, N. G., & Mahajani, S. M. (2019b). Why jaggery powder is more stable than solid jaggery blocks. *LWT - Food Science and Technology*, *110*(April), 299–306. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.093

Verma, P., Shah, N., & Mahajani, S. (2019c). Effect of sodium hydrosulphite treatment on the quality of non-centrifugal sugar: Jaggery. *Food Chemistry*, *299*(June). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125043

Vinderola, G., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Wrigth, A. V. (2019). *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Fuctional Aspects* (Fifth). CRC Press.

Witt, T., & Stokes, J. R. (2015). Physics of food structure breakdown and bolus formation during oral processing of hard and soft solids. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 3, pp. 110–117). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.06.011

Yang, C., Liu, L., Majaw, J. K., Liang, L., & Chen, Y. (2021). Efficacy of Lactobacillus reuteri supplementation therapy for Helicobacter pylori eradication: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Medicine in Microecology*, 100036. https://doi.org/10.1016/J.MEDMIC.2021.100036

Yin, M., Chen, M., Yuan, Y., Liu, F., & Zhong, F. (2024). Encapsulation of Lactobacillus rhamnosus GG in whey protein isolate-shortening oil and gum Arabic by complex coacervation: Enhanced the viability of probiotics during spray drying and storage. *Food Hydrocoll*, *146*(July 2023), 109252. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109252

Yoha, K. S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2020). Effect of encapsulation methods on the physicochemical properties and the stability of Lactobacillus plantarum (NCIM 2083) in synbiotic powders and in-vitro digestion conditions. *J Food Eng*, *283*, 110033. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2020.110033

Zanoelo, M., Barbosa-Dekker, A. M., Dekker, R. F. H., Pereira, E. A., & da Cunha, M. A. A. (2024). Microencapsulation of roasted mate tea extractives with lasiodiplodan (a (1 → 6)-β-D-glucan) and maltodextrin as combined coating materials: A strategic tool to stabilize and protect the bioactive components. *International Journal of Biological Macromolecules*, *275*, 133615. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133615

Zhang, F., Lu, Y., Zhu, S., Han, F., Wen, G., Tang, P., & Hou, Z. (2024). Mathematical model and numerical investigation of the influence of spray drying parameters on granule sizes of mold powder. *Particuology*, *85*, 280–295. https://doi.org/10.1016/j.partic.2023.06.017

Zhang, S., Ni, D., Xu, W., Zhang, W., & Mu, W. (2023). Characterization of a processive inulosucrase from Lactobacillus mulieris for efficient biosynthesis of high-molecular-weight inulin. *Enzyme Microb Technol*, *164*(November 2022), 110186. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110186

Zhao, H., Zhang, F., Chai, J., & Wang, J. (2020). Effect of lactic acid bacteria on Listeria monocytogenes infection and innate immunity in rabbits. *Czech Journal of Animal Science*, *65*(1), 23–30. https://doi.org/10.17221/247/2019-CJAS

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782–2858. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107

Zhou, L., Huang, Y., Wang, D., Yuan, T., Song, G., Gong, J., Xiao, G., Kim, S. A., & Li, L. (2024). Microencapsulation of Lactobacillus sakei and Lactobacillus rhamnosus in whey protein isolate and sodium hyaluronate for potential food-grade probiotic delivery system. *Food Biosci*, *61*(May), 104784. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104784

Zimmermann, J. A., Sirini, N., Oliveroa, C. R., Renna, M. S., Signorinic, M. L., Zbrun, M. V., Frizzo, L. S., & Soto, L. P. (2023). Macroencapsulation of Limosilactobacillus reuteri DSPV002C as nutritional supplement for piglets : conditions. *Revista Argentina de Microbiología*, *xxxx*, 12. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ram.2023.07.005

2. Capítulo 2. Caracterización preliminar de *Limosilactobacillus reuteri*

2.1 Resumen

El presente capítulo describe el proceso de caracterización preliminar de *Limosilactobacillus reuteri* con el fin de garantizar su viabilidad y funcionalidad para aplicaciones. La experimentación se llevó a cabo en el laboratorio del Grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS, Universidad de Nariño. Se inició con la reconstitución de la cepa en medio MRS, seguida por la siembra, repique y conservación en condiciones estériles, verificando pureza y morfología mediante tinción de Gram. La activación de la cepa fue optimizada mediante un ajuste de inoculo, siguiendo ecuaciones de dilución bacteriana. Se realizaron pruebas fisiológicas para confirmar características fenotípicas de *L. reuteri*, incluyendo producción de gas en tubos Durham, prueba de catalasa y evaluación de exopolisacáridos (EPS) a distintas temperaturas y tiempos. Además, se analizó la resistencia térmica de la cepa a 37 °C y 45 °C, determinando diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento bacteriano, con mayor viabilidad observada a 37 °C. El análisis estadístico incluyó pruebas T de Student, verificación de supuestos de normalidad y homocedasticidad. Los resultados indican que *L. reuteri* es una bacteria gram positiva, catalasa negativa, productora de gas y EPS.

2.2 Introducción

La aplicación de Bacterias Acido Lácticas (BAL), en matrices alimentarias ha cobrado creciente importancia en el desarrollo de alimentos funcionales, entre ellas *Limosilactobacillus reuteri,* BAL que ha sido ampliamente estudiada por su capacidad probiótica, incluyendo la producción de compuestos bioactivos, así como la habilidad para colonizar el tracto gastrointestinal humano (Mu *et al*., 2018; Vinderola *et al*., 2019). Estos productos derivados del metabolismo microbiano y características propias de las BAL enmarcan a *L. reuteri* como un probiótico, además, en investigaciones se demuestra el beneficio conferido para la salud al ser suministrado en matrices alimentarias (Marco *et al*., 2021; Zhou *et al*., 2024).

Se han realizado investigaciones sobre la identificación y selección de microorganismos como probióticos, estudios que tienen en cuenta metodologías para el aislamiento, identificación y caracterización de bacterias potenciales mediante el empleo de herramientas moleculares, microbiológicas, bioquímicas y tecnológicas, como los enunciados por El-Enshasy & Yang (2021) y Hutkins (2019). De esta forma, *L. reuteri* es una BAL clasificada como un microorganismo Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS), con amplio respaldo científico por su papel en la promoción de la salud humana (Santos-Rocha *et al*., 2024; Zheng *et al*., 2020). En neonatos, facilita la digestión de la leche materna y alimentos sólidos, refuerza la barrera intestinal, modula positivamente la respuesta inmunológica y favorece el desarrollo de células T reguladoras. Estas acciones contribuyen a una reducción de la inflamación y de la permeabilidad intestinal (Bian *et al*., 2011; Santos-Rocha *et al*., 2024).

La actividad probiótica de *L. reuteri* incluye la producción de ácidos orgánicos, etanol, exopolisacáridos (EPS) y reuterina, compuestos que influyen en la microbiota intestinal y ejercen efectos antimicrobianos, antivirales y antifúngicos. Gracias a ello, puede inhibir microorganismos patógenos como *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Salmonella*, *Candida*, entre otros (Mu *et al*., 2018; Santos-Rocha *et al*., 2024). Es un anaerobio facultativo capaz de utilizar oxígeno como aceptor de electrones en presencia de hemo y menaquinona, aunque posee una cadena de transporte incompleta (Pedersen *et al*., 2012). Además, utiliza tanto la vía de Embden-Meyerhof como la vía fosfocetolasa, con una producción fermentativa compuesta por lactato, etanol o acetato (Mu *et al*., 2018). *L. reuteri* presenta resistencia a ambientes ácidos, lo que facilita su supervivencia gástrica y su uso como aditivo funcional en alimentos. Se aísla comúnmente del yeyuno, íleon y heces de animales, y se emplea para mejorar la salud gastrointestinal y las propiedades sensoriales de productos fermentados (El-Enshasy & Yang, 2021; Rajoka *et al*., 2019b; Urrutia-Baca *et al*., 2018). Por lo tanto, en este capítulo se describe la experimentación preliminar realizada para la reactivación, propagación y caracterización de *L. reuteri*.

2.3 Metodología

2.3.1 Ubicación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio del Grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS ubicado en el bloque de laboratorios de docencia de la Universidad de Nariño Sede Torobajo, Pasto - Nariño.

2.3.2 Experimentación preliminar

Reconstitución, siembra y conservación de *Limosilactobacillus reuteri*

Se siguieron las instrucciones del fabricante para la reconstitución de *L. reuteri* en un medio específico (MRS). Después de 24 horas de reconstitución, se verificó el crecimiento y desarrollo de la cepa y se procedió a realizar el repique en cajas de agar MRS comercial y en tubos con caldo MRS, para luego ser incubados por 24 horas a 37°C. Actividades que se llevaron a cabo en cámara de flujo laminar tipo II para evitar la contaminación del medio. Luego se confirmó pureza observando morfología macroscópica y microscópica mediante coloración de gram.

Los repiques de *L. reuteri* se realizaron en cajas con agar MRS con azul de anilina, se incubaron por 24 horas a 37°C. Después de este tiempo, se realizó tinción de gram (verificar morfología y posibles contaminaciones). El procedimiento se repitió cada 12 días para mantener una viabilidad adecuada de las cepas (Jurado-Gámez *et al*., 2013).

El cultivo del inoculo se realizó antes de cada prueba, constó de 4 pasos (**Tabla 2-1**) y se fermentó cada 15 horas de acuerdo con su cinética de fermentación Jurado-Gámez *et al*. (2023): 1). Se inoculó una asada del cultivo láctico en un Erlenmeyer con 40 mL de caldo MRS (37°C/15 horas). 2). Se transfirieron 4 mL del recipiente 1 en 40 mL de caldo MRS (37°C/15 horas)). 3). Se transfirieron 10 mL del caldo 2 en 90 mL de caldo MRS (37°C/15horas). (4) Lectura de densidad óptica en espectrofotómetro a 540nm para determinar la población bacteria y ajustarla a la mayor escala de McFarland. Para determinar la DO en espectrofotómetro se tomó 1 mL del caldo 4 y se adicionó a 9 mL de agua peptonada.

Tabla 2-1: Ajuste de inoculo para *Limosilactobacillus reuteri.*

Paso	mL de caldo MRS	mL de inoculo	Acción
1	40	-	Inocular desde medio solido (1 a 2 asadas)
2	40	4	Inocular 4 mL de *L. retueri*
3	90	10	Inocular 9 mL de *L. reuteri*
4	-	1	Lectura DO para prueba

Fuente: autor.

Según Crueger & Crueger (1993), el porcentaje de inóculo se ajustó al 10% v/v, para iniciar la fermentación. Después de este tiempo se calculó el número de bacterias por mL. Del caldo MRS comercial con el inóculo se tomó 1 mL y se vertieron en 9 mL de agua peptonada. Cuando se presentó mayor población de la establecida, se adicionó caldo MRS estéril, teniendo en cuenta las ecuaciones Ec. 1, Ec. 2 y Ec. 3 propuestas por Guerrero *et al*. (2002) y Montes *et al*. (2003).

Se encuentra entonces X_1 (Ec. 1):

$$X_1 = \left(\frac{M_2 * V_1}{M_1}\right) \qquad \text{Ec. 1}$$

Se encuentra entonces V_2 (Ec. 2):

$$V_2 = V_1 - X_1 \qquad \text{Ec. 2}$$

Finalmente se obtiene el valor de X_2 (Ec. 3):

$$X_2 = \left(\frac{V_3 * V_1}{V_1}\right) \qquad \text{Ec. 3}$$

El valor de X_2, es la cantidad que se debe agregar para ajustar la población.

M_1= población o densidad celular que se debe ajustar.

M_2= 0,125 densidad óptica equivalente a 1.50 x 10^8 UFC/mL. Densidad utilizada primera fermentación.

V_1= 1 mL volumen proveniente del inóculo total (10/90).

X_1= cantidad que contiene M_2.

V_2= lo que se agrega a 1 mL para ajustar a 1.50 x 10^8 UFC/mL.

V_3= 100 mL cantidad total del inóculo.

X_2= cantidad de caldo MRS comercial estéril que se agrega a V_3 para ajustar la población el valor de M_2.

Producción de gas

Para verificar la producción de gas a partir de glucosa se utilizó el método descrito por Cai *et al*. (1999). Se preparó caldo MRS enriquecido con 5% de glucosa anhidra y se inoculó con *L.reuteri* en tubos con campana Durham. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 37°C en una incubadora MEMMERT In 55 Single Display. La prueba se interpretó como positiva con la presencia de gas en el interior del tubo Durham (Dahl *et al*., 1989).

Actividad de catalasa

Se tomó una asada de cultivo láctico, se colocó sobre un portaobjetos limpio y se añadió dos gotas de peróxido de hidrógeno (30%). La no formación de burbujas después de la adición del peróxido de hidrógeno se interpretó como prueba negativa para catalasa (Cai *et al*., 1999).

Producción de Exopolisacáridos

Se cultivó *L.reuteri* en Caldo MRS + sacarosa (5%) a 37 °C por 15 horas. Luego, se utilizaron discos de papel filtro estéril (5 mm) impregnados con 5 µL de cultivo láctico en placas Petri con agar MRS. El proceso de incubación se realizó a tres temperaturas y tres tiempos diferentes (28ºC/7 días, 37ºC/48 horas y 42ºC/24 horas). La producción de EPS se evaluó mediante la formación de colonias mucoides alrededor de los discos, se tomaron de 3 a 5 asadas y se mezcló en 2 mL de alcohol absoluto (99 %), donde la precipitación corroboró la presencia de EPS (Paulo *et al*., 2012).

Resistencia a diferentes niveles de temperatura

Se realizó la prueba a 37 °C y 45 °C por 24 horas en agar MRS. Para el recuento bacteriano se seleccionaron cajas Petri con crecimientos de 30 y 300 UFC/mL y valores de dilución iguales o superiores a 10^7 UFC/mL (Cai *et al*., 1999).

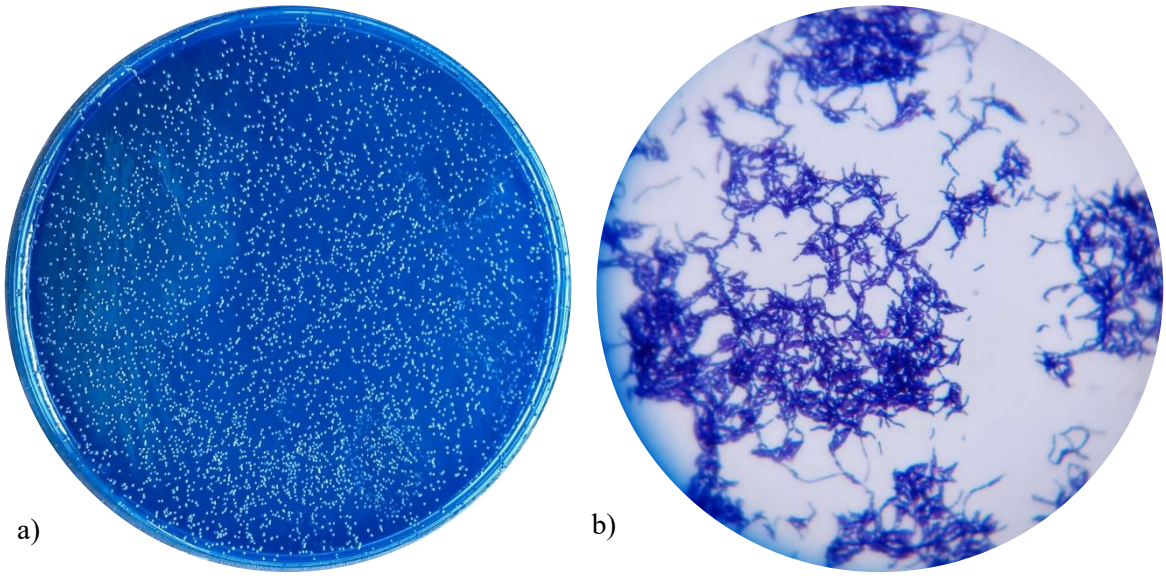
2.3.3 Análisis estadístico

Los datos se recopilaron en Microsoft Excel. Los estadísticos descriptivos y T-Student para prueba de resistencia a diferentes niveles de temperatura (significancia del 95 %) se construyeron en el software estadístico Minitab® 19.1. Se evaluaron supuestos de normalidad y homocedasticidad.

2.4 Resultados

La cepa probiótica fue reconstituida, cultivada y se realizó tinción de gram para verificar características morfológicas correspondiente a *L. reuteri*. En la **Figura 2-1** se observa la morfología de la BAL en estudio, presenta tinción gram positiva, estructura en forma de bastón alargado con extremos redondeados y distribución en cadenas pequeñas y aisladas.

Figura 2-1: a). Colonias de *Limosilactobacillus. reuteri* en agar con azul de anilina. b). Tinción de gram para *L Limosilactobacillus reuteri* con objetivo 100X.



La prueba actividad de catalasa fue negativa, mientras que la producción de gas y exopolisacáridos fue positiva (**Tabla 2-2**).

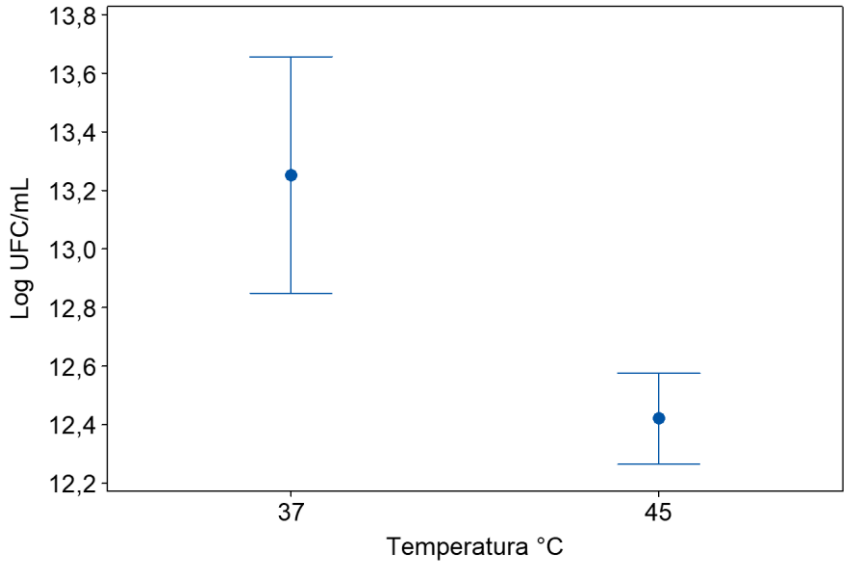
Tabla 2-2: Producción de Exopolisacáridos por *Limosilactobacillus reuteri.*

Temperatura/Tiempo	28 °C/7 días	37 °C/48 horas	42 °C/24 horas
Producción EPS	Positiva	Positiva	Positiva
EPS = Exopolisacáridos			

Por otra parte, la resistencia a diferentes niveles de temperatura indicó crecimientos diferenciados para cada temperatura establecida (**Figura 2-2**). Para 37 °C 13.253 ± 0.193 Log UFC/ mL y para 45 °C 10.419 ± 0.074 Log UFC/ mL. La prueba T-Student aplicado al crecimiento bacteriano en

diferentes temperaturas indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0.05$) (Anexo A). La prueba sugiere que el crecimiento de *L. reuteri* es mayor a 37 °C en comparación con 45 °C ($p<0.05$).

Figura 2-2: Resistencia a diferentes niveles de temperatura de *Limosilactobacillus. reuteri*.



2.5 Discusión

2.5.1 Reconstitución, siembre y conservación de *Limosilactobacillus reuteri*

Mu *et al*. (2018) y Ju *et al*. (2023), clasifica a *L. reuteri* en el género *Limosilactobacillus,* comprendido por un grupo de bacterias heterogéneas anaerobias facultativas, con crecimiento en presencia limitada de oxígeno que se encuentra de forma natural en sistemas gastrointestinales y genitourinario de humanos y animales. La caracterización morfológica de *L. reuteri* concuerda con Bian *et al*. (2011) y Ju *et al*. (2023), quienes describen a *L. reuteri* como una bacteria productora de ácido láctico gram positiva, con forma de bastones alargados individuales o en grupo, de extremos redondeados, con un tamaño entre 0.7-0.1 a 2.0-3.0 µm. Descripción que coincide con Bian *et al*. (2011), Vinderola *et al*. (2019) y Ahmad *et al*. (2022), autores que complementan la caracterización de a *L reuteri* como una bacteria no formadora de esporas, productora de ácido láctico y heterofermentativa estricta, también conocida como vía de la pentosa fosfato por el uso de

carbohidratos disponibles para producir ácido láctico, CO_2 y etanol o acetato (Bian *et al*., 2011; Vinderola *et al*., 2019).

Ju *et al*. (2023), demostraron que *L. reuteri* produce EPS tipo alternano con peso molecular promedio de $9.3x10^6$ Da, en cantidades suficientes para usar como prebiótico. Jurado-Gámez *et al*. (2023), reportan una producción positiva de EPS por *L. reuteri* en diferentes temperaturas y tiempos de fermentación (28 °C/7 días, 35 °C/48 horas y 42 °C/24 horas). Asimismo, Mu *et al*. (2018), reconoce la producción e importancia de EPS en *L reuteri*, sobre todo en la formación de biopelículas y adherencia epitelial, permitiendo inhibir la adhesión intestinal de patógenos como *E. coli* y la comunicación entre bacterias.

Sánchez *et al*. (2015), evaluaron el crecimiento de cepas de *Lactobacillus* spp asiladas de del tracto intestinal de terneros neonatos, cultivaron las BAL en caldo MRS a 30, 37, y 45 °C durante 24 - 48 horas, el mayor rendimiento de células viables fue a 37 °C con crecimiento de 9,3 a 10 Log UFC/mL. De igual forma, Divyashree *et al*. (2024), aislaron *Lactobacillus* de masa fermentada a base de "mijo y cereales múltiples", cultivaron las cepas en diferentes temperaturas 4, 10, 37 y 45 °C durante 24 horas, presentándose crecimiento en todas las temperaturas, sin embargo, la mayor población bacteriana se centró en 37 °C, determinada como la temperatura óptima para el crecimiento. Igual en esta investigación, donde la mayor cantidad de UFC se agrupó en los 37°C.

Por otra parte, Hadinia *et al*. (2022), evaluaron el efecto de la temperatura de fermentación de *L. fermentum* y *L. acidophilus* en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), y determinaron que a temperaturas mayores de 42 °C el crecimiento bacteriano es menor, así como la producción de AGCC, sin embargo, a 30 °C se producen AGCC a pesar de tener un crecimiento bacteriano menor. Asimismo, Jurado-Gámez *et al*. (2023), evaluaron el crecimiento de *L. reuteri* en dos temperaturas diferentes, 37 y 40 °C con crecimientos de $1.95x10^{13}$ y $2.16x10^{12}$ UFC/mL respectivamente, indicando un crecimiento mayor a 37 °C. La temperatura de incubación se define de acuerdo con el objetivo de la investigación o la industria, la importancia recae en la maximización de producción de biomasa o los metabolitos secundarios producto de la fermentación.

Freire *et al*. (2021), y Sánchez *et al*. (2015), enumeran los procesos para la caracterización e identificación fenotípica para las BAL de acuerdo con características fisiológicas y bioquímicas, en función de: medios de cultivo selectivos (caldo o agar MRS), tinción de gram positiva, crecimiento

en diferentes temperaturas para su clasificación dependiendo del crecimiento optimo (mesófilas: 30 – 37 °C / termófilas: 42 – 50 °C), producción de catalasa negativa y producción de gas positiva (CO_2) (positiva homofermentativa / negativa heterofermentativa). Propiedades verificadas en la presente investigación que coincidieron con estudios previos.

2.6 Conclusiones y recomendaciones

2.6.1 Conclusiones

La caracterización preliminar *Limosilactobacillus reuteri* confirmó su identidad como una Bacteria Ácido Láctica gram positiva, catalasa negativa y productora de exopolisacáridos (EPS). Presentó crecimiento a diferentes temperaturas, siendo óptima la incubación a 37 °C, con mayor concentración de unidades formadoras de colonia (UFC), en concordancia con estudios previos. La producción constante de EPS en distintas condiciones de fermentación refuerza su potencial probiótico, especialmente en la formación de biopelículas, adhesión epitelial y control biologico de patógenos.

2.6.2 Recomendaciones

Se recomienda emplear *L. reuteri* en procesos fermentativos a 37 °C para maximizar la producción de biomasa y EPS, optimizando su funcionalidad como probiótico. Además, se sugiere continuar con estudios orientados a la evaluación de la estabilidad de sus metabolitos en condiciones simuladas de gastrointestinales y en diferentes matrices alimentarias, con miras a su inclusión en productos funcionales de alto valor agregado.

2.7 Bibliografía

Ahmad, W., Nasir, A., Sattar, F., Ashfaq, I., Chen, M. H., Hayat, A., Rehman, M. ur, Zhao, S., Khaliq, S., Ghauri, M. A., & Anwar, M. A. (2022). Production of bimodal molecular weight levan by a Lactobacillus reuteri isolate from fish gut. *Folia Microbiologica*, *67*(1), 21–31. https://doi.org/10.1007/S12223-021-00913-W/METRICS

Bian, L., Molan, A.-L., Maddox, I., & Shu, Q. (2011). Antimicrobial activity of Lactobacillus reuteri DPC16 supernatants against selected food borne pathogens. *World Journal of*

Microbiology and Biotechnology, *27*(4), 991–998. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0543-z

Cai, Y., Puangpen, S., Premsuda, S., & Benno, Y. (1999). Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *45*(4), 177–184. https://doi.org/10.2323/JGAM.45.177

Crueger, W., & Crueger, A. (1993). *Industrial microbiology manual.* Acribia.

Dahl, T. A., Midden, W. R., & Hartman, P. E. (1989). Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of Bacteriology*, *171*(4), 2188–2194. https://doi.org/10.1128/jb.171.4.2188-2194.1989

Divyashree, S., Ramu, R., & Sreenivasa, M. Y. (2024). Evaluation of new candidate probiotic lactobacillus strains isolated from a traditional fermented food- multigrain-millet dosa batter. *Food Biosci*, *57*(December 2023), 103450. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103450

El-Enshasy, H. A., & Yang, S.-T. (2021). Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms. In *Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms* (1st ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781351027540

Freire, T. T., Silva, A. L. T. e, Ferreira, B. K. O., & Santos, T. M. dos. (2021). Lactic acid bacteria its characteristics and importance: review. *Research, Society and Development*, *10*(11), e513101119964–e513101119964. https://doi.org/10.33448/RSD-V10I11.19964

Guerrero, M., Guzmán S, S., Yandar B, N., & Pazos M, A. (2002). Efecto inhibitorio de Lactobacillus Acidophilus SOBRE EL ENTEROPATOGENO Vibrio Cholerae 01 OGAWA, in vitro. *Universidad y Salud*, *1*(3), 8–14. https://revistas.udenar.edu.co/index.php/usalud/article/view/314/pdf

Hadinia, N., Edalatian Dovom, M. R., & Yavarmanesh, M. (2022). The effect of fermentation conditions (temperature, salt concentration, and pH) with lactobacillus strains for producing Short Chain Fatty Acids. *LWT - Food Science and Technology*, *165*(June), 113709. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113709

Hutkins, R. (2019). *Microbiology and Technology of Fermented Food* (Wiley Blac, Vol. 2). John Wiley & Sons, Inc.

Ju, J. H., Jeon, S. G., Heo, S. Y., Kim, J. S., Jo, M. H., Kim, M. S., Kim, C. H., & Oh, B. R. (2023). Synbiotics production using Lactobacillus reuteri EC01, a strain that produces alternan-type exopolysaccharide. *LWT - Food Science and Technology*, *182*(April), 114814. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114814

Jurado-Gámez, H. A., Cerón-Córdoba, J. F., & Bolaños-Bolaños, J. (2023). Effect of microencapsulated Lactobacillus reuteri under simulated gastric conditions and its inhibition

on Listeria monocytogenes. *Revista de Ciencias Agrícolas*, *40*(1), e1202. https://doi.org/10.22267/rcia.20234001.202

Jurado-Gámez, H., Ramírez, C., & Aguirre, D. (2013). Cinética de fermentación de Lactobacillus plantarum en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. *Veterinaria y Zootecnía*, *7*(2), 37–53.

Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *18*, 196–208. https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5

Montes C, A., Santacruz B, A., Sañudo D, J., & Pazos M, A. (2003). Efecto in vitro de Lactobacillus casei subsp rhamnosus sobre el crecimiento de un aislado de Heicobacter pylori. *Revista Del Centro de Estudios En Salud*, *1*(4), 5–12. https://revistas.udenar.edu.co/index.php/usalud/article/view/302/pdf

Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of Lactobacillus reuteri in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*, *9*(APR), 757. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757

Paulo, E. M., Vasconcelos, M. P., Oliveira, I. S., Affe, H. M. de J., Nascimento, R., de Melo, I. S., Roque, M. R. de A., & de Assis, S. A. (2012). An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Food Science and Technology*, *32*(4), 710–714. https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000094

Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Hayat, H. F., Hussain, N., Sarwar, S., Aslam, H., Nadeem, A., & Shi, J. (2019). Characterization, the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Exopolysaccharide Isolated from Poultry Origin Lactobacilli. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*(4), 1132–1142. https://doi.org/10.1007/S12602-018-9494-8

Sánchez, L., Omura, M., Lucas, A., Pérez, T., & Ferreira, C. de L. (2015). Cepas de Lactobacillus spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Rev. Salud Animal*, *37*(2), 94–104. http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v37n2/rsa04215.pdf

Santos-Rocha, S. J., Mendoza-Ortiz, C., Tobon-Gonzalez, J., Ríos-Estepa, R., & Orozco-Sánchez, F. (2024). Oxygen Transfer Effect on the Growth of Limosilactobacillus reuteri ATCC 53608 and on Its Metabolic Capacity. *Current Microbiology*, *81*(11), 362. https://doi.org/10.1007/s00284-024-03822-6

Urrutia-Baca, V. H., Escamilla-García, E., de la Garza-Ramos, M. A., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., & Urbina-Ríos, C. S. (2018). In Vitro Antimicrobial Activity and Downregulation of Virulence Gene Expression on Helicobacter pylori by Reuterin. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *10*(2), 168–175. https://doi.org/10.1007/s12602-017-9342-2

Vinderola, G., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Wrigth, A. V. (2019). *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Fuctional Aspects* (Fifth). CRC Press.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782–2858. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107

Zhou, L., Huang, Y., Wang, D., Yuan, T., Song, G., Gong, J., Xiao, G., Kim, S. A., & Li, L. (2024). Microencapsulation of Lactobacillus sakei and Lactobacillus rhamnosus in whey protein isolate and sodium hyaluronate for potential food-grade probiotic delivery system. *Food Biosci*, *61*(May), 104784. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104784

3. Capítulo 3. Optimizar el proceso de secado por aspersión para la obtención de microcápsulas de *Limosilactobacillus reuteri*

3.1 Resumen

En este capítulo se aborda la optimización del secado por aspersión para obtener microcápsulas de *Limosilactobacillus reuteri* utilizando una matriz binaria de maltodextrina (MD) e inulina (IN). Se aplicó un diseño factorial con dos factores: porcentaje de MD (5, 10 y 15 % p/v) y temperatura de entrada (110, 120 y 130 °C), y cuatro variables respuesta: rendimiento (%), humedad (%), actividad de agua (a_W) y viabilidad (Log UFC/g). Los ensayos se realizaron en un secador Labplant SD-Basic con velocidad de alimentación de 6.3 mL/min, y el producto obtenido se caracterizó mediante SEM para evaluar morfología y tamaño de partícula. La eficiencia de encapsulación (EE %) se determinó por separación y recuento de células libres, y la estabilidad se siguió durante 64 días midiendo viabilidad, humedad y a_W.

El ANOVA indicó que tanto la temperatura como la concentración de MD afectan significativamente todas las variables respuesta, incluidas interacciones y términos cuadráticos. El punto óptimo para maximizar rendimiento (57.25 %) y viabilidad (10.22 Log UFC/g), y minimizar humedad (4.69 %) y a_W (0.247) se alcanzó a 130 °C y 10 % MD, con una deseabilidad global de 0.76. Las microcápsulas exhibieron morfología esférica, superficie lisa y diámetro medio de 6.09 ± 0.62 µm. La EE fue 96.12 ± 0.25 % y la viabilidad después de secado 96.72 ± 1.96 % (8.78 Log UFC/g). Durante el almacenamiento, la viabilidad se mantuvo estable ($p>0.05$), aunque humedad y a_W aumentaron ligeramente ($p<0.05$), sin comprometer la integridad del probiótico. Estos resultados validan el proceso de secado por aspersión optimizado como una estrategia eficaz para microencapsular *L. reuteri*.

3.2 Introducción

La microencapsulación mediante secado por aspersión constituye una técnica consolidada en la industria alimentaria y farmacéutica para proteger compuestos sensibles, mejorar su estabilidad y permitir una liberación controlada (Laureanti *et al*., 2023; Mohamadzadeh *et al*., 2025). En la aplicación de probióticos, donde la viabilidad celular durante el procesamiento y almacenamiento es crítica, esta tecnología ofrece una solución eficiente para preservar BAL (El-Enshasy & Yang, 2021). En este sentido, la selección de materiales pared adecuados, tales como maltodextrina (MD) e inulina (IN), y el ajuste de parámetros operativos, particularmente temperatura de entrada y concentración de material encapsulante resultan determinantes para alcanzar un producto microencapsulado con altos rendimientos, baja humedad residual y a_W reducida, manteniendo simultáneamente la viabilidad probiótica (Badin *et al*., 2023; González *et al*., 2020; Kent & Doherty, 2014).

El secado por aspersión implica atomizar una solución, convertirla en partículas finas y someterlas a un flujo de aire caliente, evaporando rápidamente el agua y generando microcápsulas sólidas. La temperatura de entrada condiciona la velocidad de secado: niveles elevados aceleran la evaporación, reducen la exposición térmica y promueven un mayor rendimiento, aunque pueden aproximarse al umbral de degradación de componentes termolábiles(Qiao *et al*., 2024; Rajam & Anandharamakrishnan, 2015). Por otra parte, la maltodextrina, un polímero de glucosa con enlaces α-(1-4), forma una matriz vítrea durante la atomización que limita la migración de agua y protege macromoléculas frente al estrés térmico (Badin *et al*., 2023; Lacerda *et al*., 2016) y la inulina un fructano β(2-1) aporta capacidad de retención de humedad superficial y efectos prebióticos, pero puede incrementar la viscosidad de la solución de alimentación, afectando negativamente la eficiencia de secado y el rendimiento (Jackson *et al*., 2022; Kheto *et al*., 2023) .

El presente capítulo describe la optimización del proceso de secado por aspersión para *L. reuteri*. Donde se implementó un diseño factorial 3×3 con tres bloques, donde las concentraciones de MD (5, 10 y 15 % p/v) y temperaturas de entrada (110, 120 y 130 °C) fueron evaluadas en términos de rendimiento (%) del polvo, humedad residual (%), actividad de agua (aW) y viabilidad (Log UFC/g).

3.3 Metodología

3.3.1 Optimización del secado por aspersión para la obtención de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado

Se microencapsuló de acuerdo con los métodos descritos por Montes-Ramírez (2013) y Rodríguez-Barona *et al*. (2016). Las colonias de la cepa se recolectaron con centrifugación (HERMLE Z446K) 5000 rpm por 15 minutos a 4°C y se lavó dos veces con NaCl al 85% (Qiao *et al*., 2024).

Se prepararon 3 soluciones de 1500 mL, a cada solución se adicionó inulina al 10% w/v (100 g) y maltodextrina (MD) (18-22 ED) en tres concentraciones diferentes 5% w/v (50g), 10% w/v (100g) y 15% w/v (150g), la cantidad de agua destilada varío de acuerdo con el porcentaje de los materiales pared. Para el proceso de secado por aspersión se utilizó el secador Labplant SD-Basic (atomizador de 0.5 mm) a tres temperaturas de entrada diferentes, 110 °C, 120 °C y 130°C con temperatura de salida de 70 ± 1 °C y una velocidad de alimentación de 6.3 mL/min (Barajas-Álvarez *et al*., 2022). El polvo microencapsulado se almacenó en bolsas Flex up Papel/ PET Metalizado/PEBD 132 µm OTR < 2 cc/(m^2*24hr*atm) WVTR <2 g/(m^2*24hr*atm) (ALICO S.A.S., Medellín, Colombia).

Para optimizar el proceso de microencapsulación se evaluaron los efectos de los factores maltodextrina (MD) y temperatura (temp), con el fin de maximizar rendimiento y viabilidad, y minimizar humedad% y a_W.

3.3.2 Caracterización con Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Las imágenes de las microcápsulas se tomaron con el microscopio electrónico de barrido marca JEOL JSM 6490 LV, con fuente de emisión termoiónica, sistema de microanálisis EDS referencia INCA PentaFETx3 Oxford Instruments. Detectores SEI, BES y LVD, con resolución de 3 nm a 30 kV y magnificación máxima de 30000 X, por el Centro de Microscopia Avanzada, Universidad de Antioquia. Las imágenes se analizaron con el software Image Processing & Analysis in Java (ImageJ 1.53t).

3.3.3 Eficiencia de la microencapsulación

Según lo descrito por Gonzales-Cuello *et al*. (2015), se tomaron 2 g de material microencapsulado y se diluyeron en 18 mL de agua destilada. Luego, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min para separar las células libres de *L. reuteri*. Posteriormente, se determinó la concentración bacteriana en el sobrenadante y se calculó la Eficiencia de Encapsulación (*EE %*) (Ec. 4).

$$EE\ (\%) = \left(\frac{A - B}{A}\right) \times 100 \qquad \text{Ec. 4}$$

Donde *A* es la concentración bacteriana antes de la microencapsulación y *B* es la concentración encontrada en el sobrenadante después de microencapsular.

3.3.4 Estudio de supervivencia y estabilidad

Con el fin de evaluar el efecto de los materiales microencapsulantes (inulina y maltodextrina), en la viabilidad de los microrganismos encapsulados, se siguió la metodología establecida por Montes-Ramírez (2013), y Rodríguez-Barona *et al*. (2016). Se emplearon criterios de estabilidad, como la viabilidad de *L. reuteri* durante el tiempo de almacenamiento (62 días) (> 10^9 UFC/g), y se realizó una caracterización del material microencapsulado, que incluyó viabilidad (UFC/g), humedad (%), actividad de agua (a_W), solubilidad (%), humectabilidad (min) e higroscopicidad (%).

Viabilidad

De acuerdo con lo propuesto por Rodríguez-Barona *et al*. (2016), se rehidrató 1 g de polvo microencapsulado en 9 mL de agua peptonada (pH 7.2±2), se homogenizó en vortex por 1 min y se dejó reposar durante 30 min. Se inoculó 100 µL de dilución en superficie sobre medio MRS con azul de anilina y se llevó a incubación a 37°C por 48 horas. Los recuentos se expresarán como UFC/g en base seca para cada condición experimental (Semyonov *et al*., 2010). El porcentaje de viabilidad para cada muestra se estimó con la ecuación de viabilidad (Ec. 5).

$$Viabilidad\ (\%) = \left(\frac{No}{N}\right) \times 100 \qquad \text{Ec. 5}$$

Donde, *No* es el número de bacterias antes del proceso y *N* es el número de bacterias por g de solución después de la etapa de secado.

Humedad %

Para determinar la humedad se tomaron 2 g de material microencapsulado y se analizaron en el determinador de Humedad KERN DBS 60-3 (Balingen – Germany), a una temperatura de 105 °C con una Resolución: 0,001 g (0.01%). El resultado se expresó en porcentaje base seca (%).

Actividad de agua a_W

La a_W se determinó usando el equipo lector Termohigrometro Hygrolab Rotronic (Nürnberg-Alemania).

Solubilidad %

La solubilidad se determinó de acuerdo con lo expuesto por Cano-Chauca *et al*. (2005), se disolvió 1 g de muestra en 100 mL de agua destilada que se mantuvo a 30±2°C, 120 rpm por 5 min. Luego se tomó una alícuota de 25 mL del líquido sobrenadante y se transfirió a una caja de Petri previamente pesada, se dejó en una estufa a 105°C por 5 h hasta que alcanzó peso constante. Los sólidos recuperados se pesan después del secado (*mf*) y se estimó el porcentaje de solubilidad con la diferencia de pesos mediante la ecuación de solubilidad % (Ec. 6):

$$Solubilidad\ \% = \left(\frac{mi - mf}{mi}\right) \times 100\% \qquad \text{Ec. 6}$$

Donde *mi* es el peso inicial de la muestra y *mf* es el peso después del secado.

Humectabilidad min

El tiempo de humectación del microencapsulado se determinó por el método de humectación estática descrito por Freudig *et al*. (1999), Ceballos *et al*. (2012) y Rodríguez-Barona *et al*. (2016). Consistió en tomar un beaker de 100 mL con dimensiones de 5 cm x 7 cm. Se colocó 1 g de microencapsulado sobre un portaobjetos (recubierto con papel aluminio) ubicado encima del beaker, luego se retiró para que la muestra entrara en contacto con el agua. El tiempo de humectación se expresó en minutos (min) como el tiempo que tarda en sumergirse completamente 1 g de la muestra de polvo depositada suavemente sobre 100 mL de agua a una temperatura de 20°C.

Higroscopicidad g/100 g

La higroscopicidad se determinó de acuerdo con lo propuesto por Fritzen-Freire *et al*. (2012). Para ello se tomó 1 g de polvo microencapsulado, se ubicó sobre una malla de poro fino para evitar la

fuga del material. Este montaje se colocó sobre un recipiente de vidrio hermético con solución saturada de NaCl (75,3% de HR) a 25°C. Después de 1 semana, se pesaron las muestras.

3.3.5 Evaluación de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en el tiempo

Se tomaron como variables críticas de estabilidad: viabilidad (Log UFC/g), humedad (%) y a_W, a las cuales se les realizó un seguimiento por 64 dias bajo condiciones ambientales controladas, 15°C y HR de 86%, se tomaron datos los dias 1, 12, 24 y 64 (Asfaq & Chand, 2020; Aydın *et al*., 2024; Fennema *et al*., 2017). Empaques bolsas Flex up Papel/ PET Metalizado/PEBD 132 µm OTR < 2 cc/(m^2*24hr*atm) WVTR <2 g/(m^2*24hr*atm) (ALICO S.A.S., Medellín, Colombia).

3.3.6 Análisis estadístico

Los datos se recopilaron en Microsfot Excel. Las variables respuesta cuantitativas se construyeron en el software estadístico Minitab® 19.1. Para la optimización de la microencapsulación se diseñó en Sthatgraphics un diseño factorial multinivel con 2 factores (temperatura: maltodextrina), 3 bloques, y 4 variables respuestas (rendimiento %, humedad %, actividad de agua a_W y viabilidad Log UFC/mL). Para el análisis de los datos de la evaluación de *L. reuteri* microencapsulado en el tiempo (viabilidad, humedad y a_W) se utilizó R-Studio, con un modelo de regresión lineal y cuadrático con la variable Log UFC/g y un modelo cuadrático para humedad y a_W. Se evaluaron supuestos de normalidad y homocedasticidad.

3.4 Resultados

3.4.1 Optimización del secado por aspersión para la obtención de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado

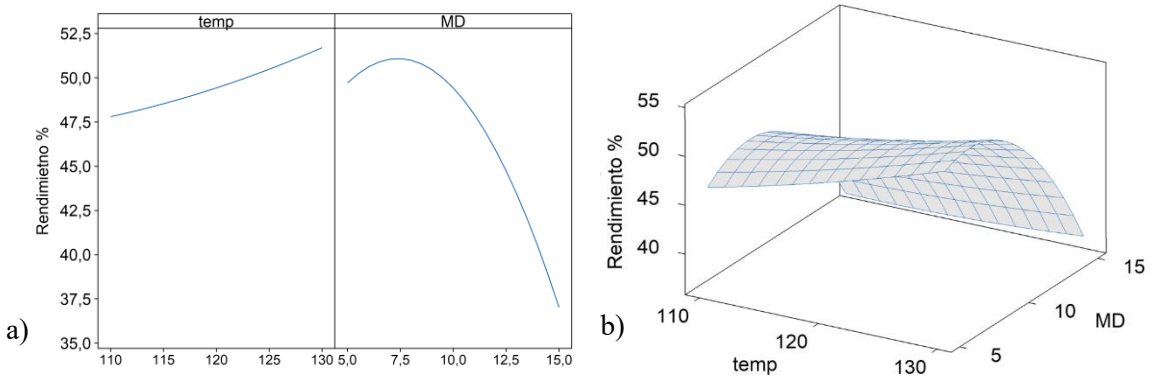
En el Anexo B1 se presentan los estadísticos descriptivos para las variables respuesta: rendimiento %, actividad de agua a_w y viabilidad Log UFC/g. Se evaluó el efecto de los factores temperatura °C, y maltodextrina % (MD), sobre las variables respuestas.

El ANOVA (Anexo B.1) para rendimiento indicó que los factores temp (F=93.50) y MD (F=986.66), junto a las interacciones temp:MD (F=37.15) y el efecto cuadrático MD:MD (F=301.05), tienen diferencias significativas ($p<0.05$). En la **Figura 3-1**, la gráfica de efectos principales y la gráfica

superficie de respuesta reflejan la relación entre temp y MD, donde, a medida que aumenta temp (de 110 °C a 130 °C), el rendimiento tiende a incrementarse, por otra parte, alta MD (de 5 % a 10%), reducen el rendimiento, comportamiento que coincide con el coeficiente positivo 3.9 para temp y negativo -12.689 para MD (Anexo B.1).

La grafica superficie respuesta (**Figura 3-1**) muestra una curvatura pronunciada entre la región de alta temp (130 °C), y baja MD (<10%), correspondiente al valor óptimo de rendimiento 57.249 % a 130 °C y 6.76 % MD (**Tabla 3-1**), combinación que maximiza el rendimiento. En contraste, se observa que a baja temp (< 120 °C), y alta MD (>10%), se obtienen rendimientos mínimos (**Figura 3-1**).

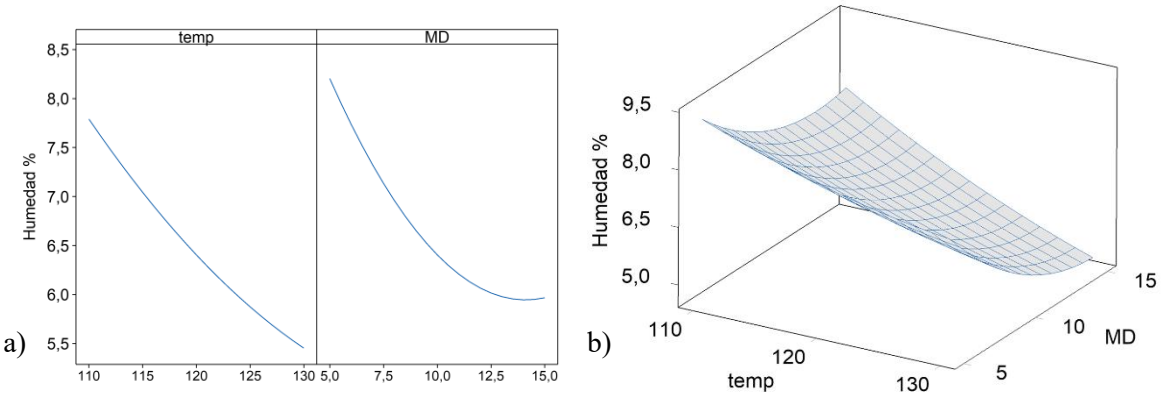
Figura 3-1: a) Grafica de efectos principales para rendimiento (%). b) Grafica superficie de respuesta estimada para rendimiento (%). temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %.



El ANOVA (Anexo B.1) para humedad mostró que los factores temp (F=18.6) y MD (F=17.04) tienen diferencias significativas (p<0.05). En la **Figura 3-2**, la gráfica de efectos principales y la gráfica superficie de respuesta relacionan temp y MD, altos niveles temp (>120 °C) y MD (>10%) disminuyen la humedad, tendencia indicada por los coeficientes negativos (-2.33 temp y -2.23 MD).

La gráfica superficie de respuesta (**Figura 3-2**), indica una superficie curvatura leve, que coincide con la ausencia de términos cuadráticos significativos (p>0.05), y con una depresión al incrementar los niveles de temp (>120 °C) y MD (>10%), comportamiento que incide al valor óptimo de humedad 4.687 % a temp 130 °C y 15 % MD, condiciones que minimizan la variable respuesta (**Tabla 3-1**).

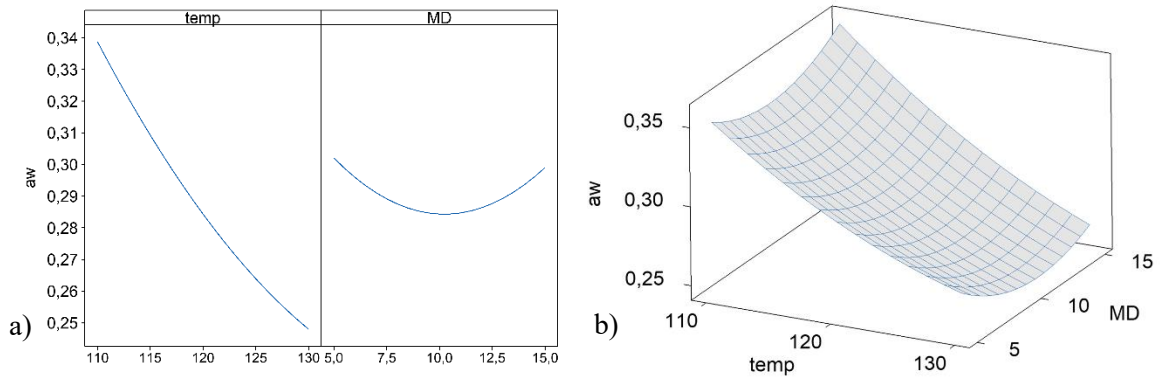
Figura 3-2: a). Grafica de efectos principales para humedad (%). b) Grafica superficie de respuesta estimada para humedad (%). temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %.



El ANOVA (Anexo B.1) para a_W indicó diferencias significativas para temp (F=186.11) y MD:MD (F=7.89) ($p<0.05$). En la **Figura 3-3**, el grafico de efectos principales y el grafico superficie de respuesta para a_W corresponde a los factores temp y MD, donde, altos niveles de temp (>120 °C), disminuye a_W (Coeficiente negativo -0.091). El cuadrático MD:MD tiende a disminuir a_W con 10 % MD y a incrementar con 5% y 15% MD (coeficiente 0.032).

La grafica superficie de respuesta (**Figura 3-3**), muestra una superficie con curvatura suave, efecto relacionado con la diferencia significativa en el término cuadrático MD:MD ($p<0.05$), de tal forma que, se deprime entre la zona alta de temp y un valor intermedio de MD, así, el punto óptimo para a_W coincide con 0.247 a temp 130 °C y 10.97 % MD, combinación que minimiza a_W.

Figura 3-3: a). Grafica de efectos principales para a_W. b). Grafica superficie de respuesta estimada para a_W. temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %.



El ANOVA (Anexo B.1) para viabilidad (Log UFC/g), presentó diferencias significativas para MD (F=6.02) ($p<0.05$). En la **Figura 3-4**, la gráfica de efectos principales y la gráfica de superficie de respuesta para viabilidad, relaciona los factores temp y MD, así, se evidencia que los niveles de temp no tienen efectos significativos en la viabilidad ($p>0.05$), por otra parte, MD presentó una viabilidad mayor con 11.93 % MD y tiende a disminuir con las concentraciones mínimas (5 %) y máximas (15 %) (coeficiente -1.052). El valor óptimo de viabilidad es 10.22 Log UFC/g a 130 °C y 11.93 % MD, condiciones que maximizan la viabilidad del producto (**Tabla 3-1**).

Figura 3-4: a). Grafica de efectos principales para viabilidad (Log UFC/g). b). Grafica superficie de respuesta estimada para viabilidad (Log UFC/g). temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %.

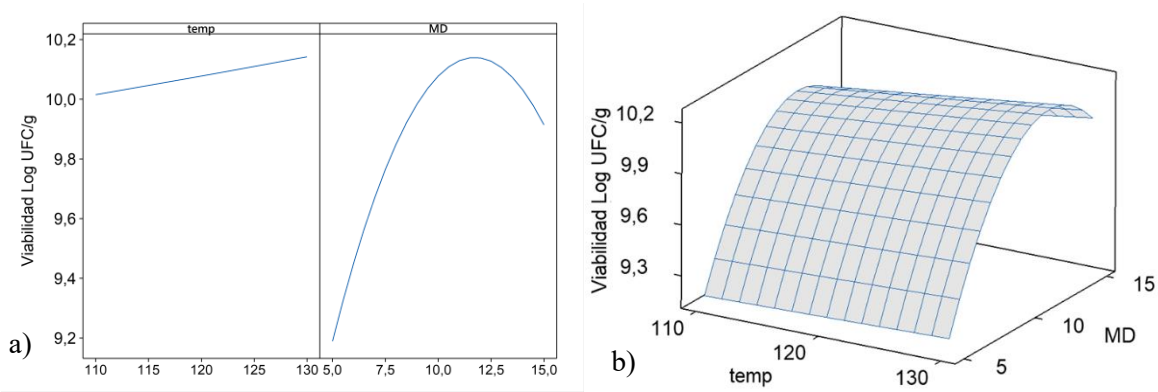


Tabla 3-1: Combinación de los niveles de factores para optimización correspondiente a cada variable respuesta (Rendimiento, humedad, a_W, viabilidad).

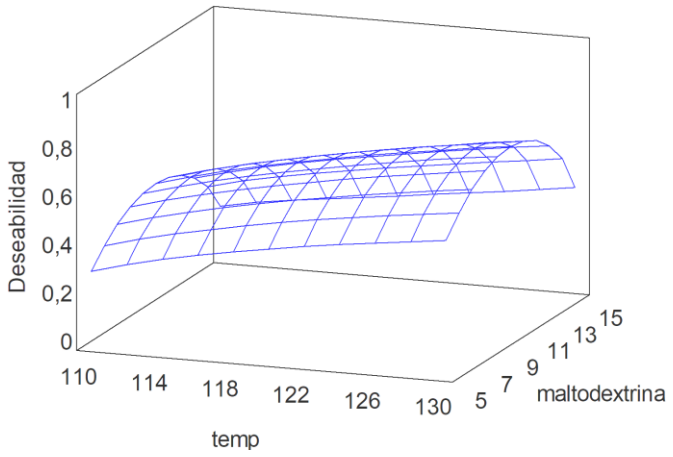
Rendimiento % Val. Opt[3] = 57.249				Humedad % Val. Opt[3] = 4.687			
Factor	Bajo	Alto	Óptimo	Factor	Bajo	Alto	Óptimo
temp[1]	110.0	130.0	130.0	temp[1]	110.0	130.0	130.0
MD[2]	5.0	15.0	6.76	MD[2]	5.0	15.0	15.0
a_w Val. Opt[3] = 0.247				Viabilidad Log UFC/g Val. Opt[3] = 10.22			
Factor	Bajo	Alto	Óptimo	Factor	Bajo	Alto	Óptimo
temp[1]	110.0	130.0	130.0	temp[1]	110.0	130.0	130.0
MD[2]	5.0	15.0	10.97	MD[2]	5.0	15.0	11.93
[1]temp = Temperatura °C; [2]MD = Maltodextrina %; [3]Val. Opt. = Valor óptimo							

La optimización de múltiples respuestas requiere ajustar previamente modelos de superficie respuesta para cada variable y/o parámetros de interés, a los cuales se les asigna criterios de optimización, "maximizar" para rendimiento (%), y viabilidad (Log UFC/g), y "minimizar" para humedad (%), y a_W. Finalmente, la combinación de los diferentes niveles correspondientes a cada factor experimental (temp y MD), permitió alcanzar el óptimo de las variables de interés (**Tabla 3-2** y **Figura 3-5**). En la **Figura 3-5** se presenta gráficamente la región de mayor deseabilidad (0.760), donde, la combinación temp 130 °C y 10.0 % MD, maximiza rendimiento % y viabilidad en Log UFC/g, y minimiza humedad y actividad de agua.

Tabla 3-2: Optimización de múltiples respuestas en la microencapsulación de *Limosilactobacillus reuteri*.

Factor/Variable	Bajo	Alto	Óptimo	Respuesta
temp[1]	110.0	130.0	130.0	-
MD[2]	5.0	15.0	10.0	-
Rendimiento %	35.303	55.437	Maximizar	51.869
Humedad %	4.220	10.120	Minimizar	5.484
Aw	0.221	0.380	Minimizar	0.248
Viabilidad Log UFC/g	8.322	11.093	Maximizar	10.133
[1]temp = Temperatura °C; [2]MD = Maltodextrina %				

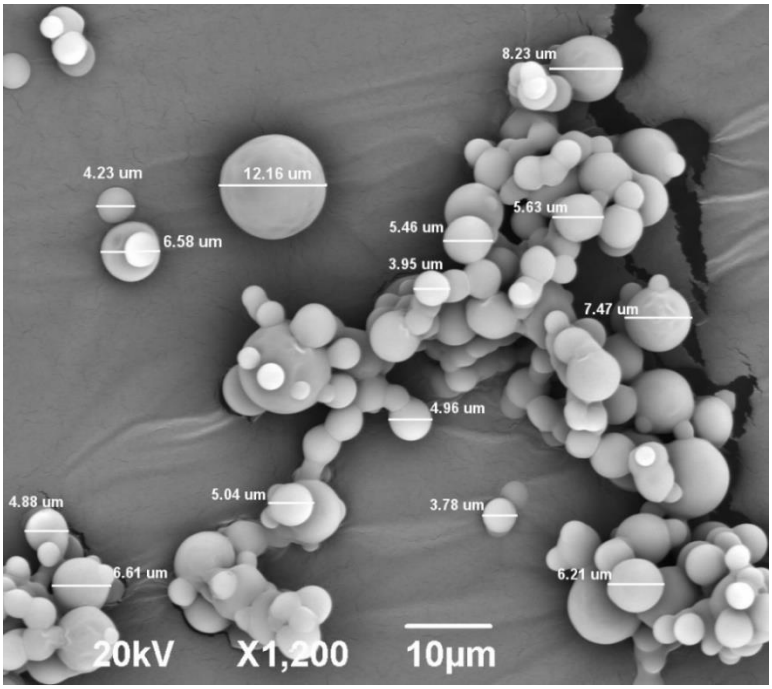
Figura 3-5: Superficie respuesta para optimización. Deseabilidad vs temperatura y maltodextrina.



3.4.2 Caracterización con Microscopia Electrónica de Barrido - MEB

En la **Figura 3-6** se presentan las microcápsulas obtenidas por MEB de *L. reuteri* ME con inulina y maltodextrina al 10% (w/v). Las partículas indican una morfología esférica, distribución de tamaño heterogénea, con un rango entre 3.78 a 12.16 µm y un promedio 6.085 ± 0.621 µm. La superficie de las capsulas es lisa, sin rupturas o colapsos, con algunas estructuras aglomeradas. Imagen tomada 2 meses después del proceso de microencapsulación.

Figura 3-6: Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) de *Limosilactobacillus reuteri* ME con inulina y maltodextrina al 10% (w/v).



3.4.3 Eficiencia de la microencapsulación y estudio de supervivencia y estabilidad

La caracterización del microencapsulado obtenido mediante secado por aspersión dio como resultados iniciales: eficiencia de encapsulación (EE %) 96.12 ± 0.245, Viabilidad 8.781±0.178 Log UFC/g (96.720 ± 1.961 %), humedad 3.120 ± 0.057 %, a_W 0.255 ± 0.003, solubilidad 3.620 ± 0.127 %, humectabilidad 3.620 ± 0.127 min e higroscopicidad 1.344 ± 0.024 g/100 g. La viabilidad se presentó en Log UFC/g y %.

3.4.4 Evaluación de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en el tiempo

En el Anexo B1 se presenta el estadístico descriptivo de los parámetros de caracterización de *L. reuteri* microencapsulado en el tiempo, viabilidad (Log UFC/g), humedad (%) y a_W. En la **Figura 3-7:a** se observan las medias de viabilidad expresadas en Log UFC/g de *L. reuteri* microencapsulado evaluado en el tiempo. Se observa una tendencia decreciente en el tiempo, con una disminución desde 8.781 ± 0.398 (Día 1) hasta 8.181 ± 0.549 (Dia 64), sin embargo, los intervalos de confianza se superponen, sugiriendo ausencia de diferencias significativas.

Se generaron diagramas de dispersión de UFC/g y Log UFC/g en función del tiempo, se observó que la dispersión de datos disminuyó con Log UFC, es decir, un modelo con mejor ajuste (Anexo B.1). Tanto el modelo lineal, como el modelo cuadrático aplicado a la viabilidad (Log UFC/g) no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) (**Tabla 3-3** y Anexo B.1), por tanto, la viabilidad de *L. retueri* ME no se afectó significativamente en el periodo de almacenamiento (64 días, 15 °C, 86 %HR) (Anexo B.2).

En la **Figura 3-7:b** se grafican las medias de humedad (%) de *L. reuteri* ME en el tiempo (días), donde se evidencia una tendencia creciente en la fase inicial explicada por el termino lineal (0.0839), seguido por una desaceleración de esta, expuesta por el termino cuadrático negativo (-0.0005), el modelo ajustado tiene diferencias significativas ($p<0.05$) (**Tabla 3-3** y Anexo B.3). El valor de humedad incrementó de 3.120 ± 0.127 % (Día 1) a 6.212 ± 0.033 % (Dia 64) ($p<0.05$).

En la **Figura 3-7:c** se grafican las medias de a_W de *L. reuteri* ME en el tiempo. Se observa una tendencia creciente en el tiempo, de 0.255 ± 0.006 (Días 1) a 0.418 ± 0.007 (Días 62), continuado por una disminución en el comportamiento de a_W conforme avanza el tiempo (-0.00001), el modelo ajustado presentó diferencias significativas ($p<0.05$) (**Tabla 3-3** y Anexo B.4).

Figura 3-7: Evaluación en el tiempo (64 días) de *Limosilactobacillus. reuteri* microencapsulado: a) viabilidad Log UFC/g. b) humedad %. c) actividad de agua (a_W) (64 días).

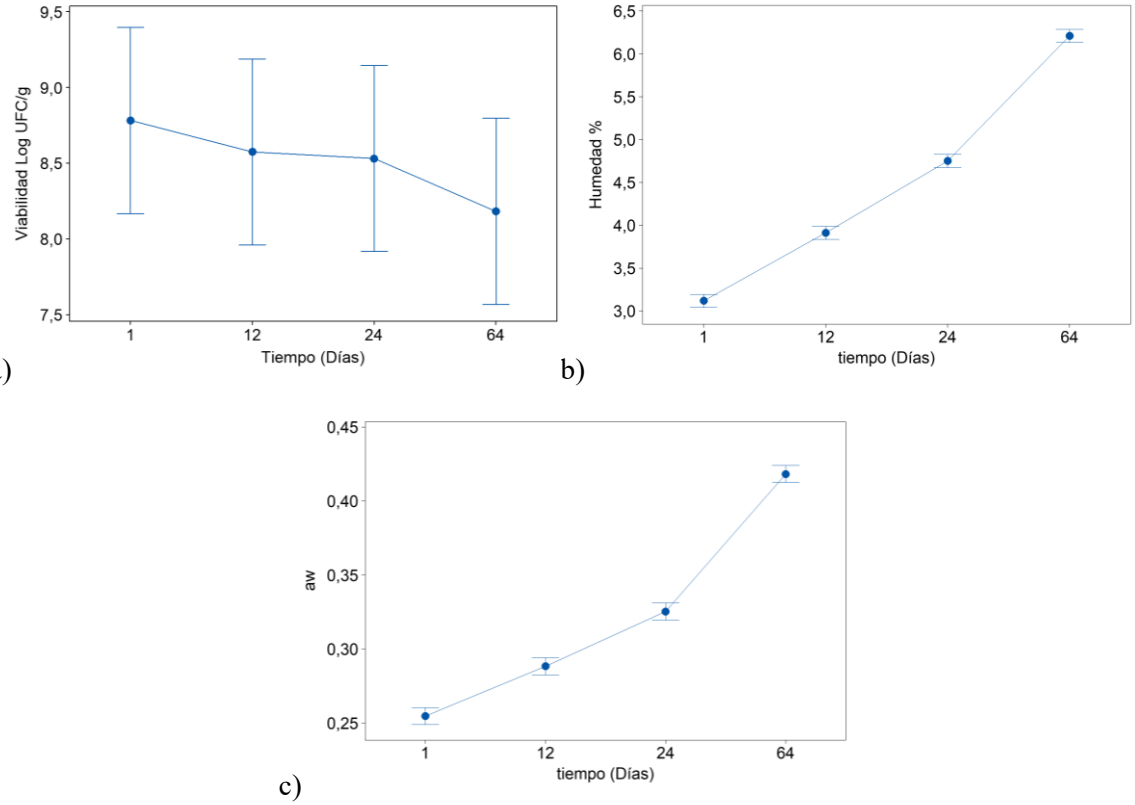


Tabla 3-3: Modelos ajustados para las variables evaluadas en el tiempo.

Variable	Modelo ajustado	Intercepto	x (Dias)	x^2 (Días)	Valor p*	R^2
Log UFC/g	Lineal	9.773	-0.0129	-	0.0534	0.1187
	Cuadrático	9.974	-0.0387	0.000376	0.1038	0.1446
Humedad %	Cuadrático	3.021	0.0839	-0.000532	<0.001*	0.9956
a_W	Cuadrático	0.251	0.0034	-0.0000115	<0.001*	0.9920
*Significancia p<0.05.						

3.5 Discusión

3.5.1 Optimización del secado por aspersión para la obtención de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado

Laureanti *et al*. (2023), evaluaron dos métodos para microencapsular compuestos y extractos bioactivos, secado por aspersión y liofilización, usando como material encapsulante maltodextrina (MD) y goma arábiga (GA), los rendimientos bajos de la microencapsulación respondieron a la liofilización con MD:GA (73.84 ± 0.44 %), mientras los rendimientos altos fueron producto del secado por aspersión con MD (81.33 ± 0.44 %), diferencia sujeta a la viscosidad causada por la GA en la solución de alimentación. En la presente investigación, tanto temp como MD influyen en el rendimiento del microencapsulado, el efecto negativo de MD se explica en consecuencia de la viscosidad generada en la solución de alimentación, una mayor concentración de MD dificulta la atomización y reduce la eficiencia de secado, igual al resultado reportado Fredes *et al*. (2018).

Minj & Anand (2022) usaron el secado por aspersión para microencapsular *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* en una matriz compuesta por MD (5 y 10 % p/v) e hidrolizado de proteína de suero (WPH 5% p/v), obtuvieron en la matriz encapsulante MD:WPH un rendimiento de 84.47 ± 0.02% con recuentos de 8.98 ± 0.02 Log UFC/g, mayores a los comparados con el material pared WPH con 37.94 ± 0,17% y un recuento en placa de 4.03 ± 0,02 Log UFC/g, diferencia atribuida a MD, que mejora la resistencia térmica de la proteína del suero. Por otra parte, obtienen valores de humedad de 0.91 ± 0.08 % y 0.64 ± 0.14 %, producto de la temperatura de entrada (200 °C), que permite evaporación y reducción rápidamente el agua, efecto que se transmite a a_W.

El incremento en el rendimiento con temperaturas altas (130 °C) coincide con la teoría de evaporación acelerada, que favorece la formación de partículas secas antes de que ocurra el colapso estructural, fenómeno explicado por Gharsallaoui *et al*. (2007). Sin embargo, altas temperaturas (>130 °C) podrían alcanzar un límite térmico crítico y degradar componentes termolábiles, aspecto no explorado en este estudio. Por otra parte, Oluwatosin *et al*. (2022), evaluaron el efecto de inulina y maltodextrina (MD) (10 % p/v), como materiales encapsulantes de *L. plantarum* por liofilización, sus resultados indicaron contenido de humedad de 4.08 ± 0.49 % (inulina) y 3.09 ± 1.57 % (MD). De igual forma, Fredes *et al*. (2018), estudiaron el secado por aspersión para microencapsular antocianinas con los materiales pared MD y aislado de proteína de soya, donde obtuvieron

rendimiento de 64.1 ± 0.01 %, a_W 0.3 ± 0.01 y humedad de 6.4 ± 0.02 %, valores y fenómenos próximos a los obtenidos en esta investigación.

Los fructanos de tipo inulina, debido a su estructura química (fructosa β 2-1) (Fennema *et al*., 2017), presentan capacidad de retención de humedad, durante el secado, esto genera una rápida evaporación superficial que induce una capa rígida que obstruye la difusión del agua, afectando la distribución de humedad (Kingwatee *et al*., 2015), fenómeno que incrementa a_W en el producto. Sin embargo, la maltodextrina, un polímero de glucosa con enlaces α (1-4) (Fennema *et al*., 2017), forma una matriz vítrea durante la encapsulación, esta estructura reduce la movilidad del agua, minimizando la a_W y protegiendo componentes sensibles (Arepally *et al*., 2023; Gutiérrez *et al*., 2014). Así, su baja higroscopicidad no solo mejora la estabilidad química, sino también propiedades físicas como fluidez y solubilidad (Samakradhamrongthai *et al*., 2022). Fennema *et al*. (2017), mencionan que el grado de equivalente dextrosa (ED) de maltodextrinas determina su funcionalidad y propiedades, de tal forma que maltodextrinas con ED menor a 20, son ideales para evitar apelmazamiento y mejorar estabilidad de polvos. Para esta investigación se utilizó maltodextrina con 18-22 ED.

La viabilidad (Log UFC/g) tendió a reducirse por altas concentraciones de MD, efecto explicado por el incremento de la viscosidad, reduciendo la difusión de nutrientes y generando estrés mecánico, proceso explicado por Peighambardoust *et al*. (2011). Por otra parte, Santivarangkna *et al*. (2008) reportaron desnaturalización de ribosomas y/o proteínas y daño de pared celular que pueden causar la muerte, con temperaturas de secado por aspersión mayores a 65 °C, sin embargo, en la presente investigación, la temperatura presentó buena viabilidad, producto de MD como protector termo-osmótico, actuando como barrera física y reduciendo la desnaturalización de proteínas celulares.

Shokri *et al*. (2015), estudiaron el modelo estadístico para la optimización del secado por aspersión de *B. bifidum*, donde establecieron como factores e incidencia: temperatura de entrada, concentración de MD y presión de aire, sobre las variables respuesta supervivencia (maximizar) y humedad (minimizar). Determinaron que temperatura de entrada tiene el mayor efecto en el modelo, para finalmente lograr supervivencia de 28.38% y humedad de 4.05 % con 111.5 °C, 6 % MD y presión de 4.5 bar, además, indicaron que la humedad se minimizó a mayor temperatura y mayor MD, similar a la interacción en la presente investigación (óptimo temp 130 °C y 10 % MD). Del mismo modo, Mohamadzadeh *et al*. (2025), optimizaron el proceso de extrusión para microencapsular *L. reuteri* con el fin de mejorar eficiencia, viabilidad de secado y viabilidad a jugos

intestinales simulados, donde establecieron 91.60 % de inulina y 8.40 % de pectina como materiales pared y lograron eficiencia de 97.57 %, viabilidad después del secado de 99.37 % (10.466 Log UFC/mL) y viabilidad a jugos intestinales de 91.74 %, viabilidad levemente superior a la obtenida en la presente investigación.

3.5.2 Caracterización con Microscopia Electrónica de Barrido - MEB

Marefati *et al*. (2021), encapsularon *L. reuteri* con emulsiones dobles agua/aceite/agua y obtuvieron tamaños de partícula de 14.9 ± 0.3 µm, formando una barrera física que limita la migración de las bacterias hacia la fase externa y manteniendo la integridad estructural durante frente a condiciones adversas. Por otra parte, Rajam & Anandharamakrishnan (2015) con el método de secado por aspersión microencapsularon *L. plantarum* con los materiales pared fructooligosacáridos (FOS), aislado de proteína de suero (WPI), y proteína de suero desnaturalizado (DWPI), como resultado, el tamaño de partícula fue diferente para cada mezcla de material pared y su concentración, así: FOS 15.44 – 23.89 µm y FOS:WPI 7.34 – 8.97 µm, además, indicaron que un mayor contenido de material pared en la solución de alimentación desarrolla el tamaño de capsula por el aumento de la viscosidad.

De igual forma, (Kurozawa *et al*., 2009), mediante el secado por aspersión, evaluaron maltodextrina (MD) y goma arábiga (GA) como agentes encapsulantes, donde, el diámetro de las partículas incrementó con el aumento de la concentración de MD o GA en la solución de alimentación, relacionado con el incremento de la viscosidad. Los diámetros reportados por los autores van desde 8.9 ± 0.1 (10 - 20% MD) a 13.4 ± 0.1 (30 % MD) y 7.1 ± 0.1 (10 % GA) a 19.2 ± 0.2 (30 % GA).

La mayoría de los microencapsulados de secados por aspersión exhiben una superficie externa redondeada, con una pared continua, sin grietas o fisuras aparentes. Este tipo de estructura ofrece protección al núcleo al proporcionar baja permeabilidad a los gases, por tanto, la ausencia de grietas, irregularidades o fisuras en la microestructura son esenciales para determinar un buen proceso de microencapsulación (Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015). Por otra parte, la presencia de aglomerados se relaciona con la higroscopicidad adquirida, efecto de la humedad que actúa como plastificante facilitando la formación de puentes entre las partículas durante su almacenamiento (Kurozawa *et al*., 2009). De acuerdo con, Walz *et al*. (2018), tras dos minutos en contacto directo con el agua, la superficie de un microencapsulado con inulina presenta desgarros y las partículas se aglomeran.

Badin *et al*. (2023) y Siemons *et al*. (2020), evaluaron las propiedades superficiales de maltodextrina, donde destacaron que el Equivalente Dextrosa (ED) y el proceso de secado por aspersión influye en la morfología final de las partículas del producto final, demostraron que MD con ED mayor a 21 forman gotas de secado con capas viscosas susceptibles a deformaciones superficiales, arrugadas y aglomerados, por otra parte, MD con ED menores a 20 forman rápidamente la capa exterior durante el proceso de sacado y desarrollan partículas con superficie lisa y estable. La descripción grafica de las microcápsulas obtenido en la presente investigación hacen referencia a un proceso que permite formación de partículas estables en el tiempo con base en la morfología descrita y el tiempo de almacenamiento.

3.5.3 Eficiencia de la microencapsulación y estudio de supervivencia y estabilidad.

Lorenzoni *et al*. (2018), determinaron el efecto de goma arábica (GA), inulina, treholosa y hi-mize como materiales encapsulantes de *L. acidophilus* con el secado por aspersión, los mejores porcentajes de eficiencia de microencapsulación (EE %) se reportaron con inulina y con la matriz binaria inulina: hi-maize (Almidón resistente de maíz: Ingredion, São Paulo, Brasil) con valores de 93.12 ± 0.93 % y 94.26 ± 0.74 % respectivamente, también determinaron la viabilidad de encapsulación, siendo los tratamientos con mayor recuentos de células viables, inulina y la matriz binaria inulina: hi-mize con 11.38 ± 0.11 UFC/g y 11.50 ± 0.09 Log UFC/g.

Al igual, Roselen *et al*. (2019), estudiaron la microencapsulación con secado por aspersión de *Lactoccoccus lactis* Subsp. *Lactis* con los materiales pared inulina (10 % w/v) y suero (12 % w/v), alcanzaron un valor de 94.64 % para EE y 13.74 Log UFC/g de células viables que al comparar con la carga inicial corresponde al 94.61 % de supervivencia. Del mismo modo, Rodríguez-Barona *et al*. (2016), reportan viabilidad para *L. casei* y *L. rhamnosus* de 96.67 ± 0.47 % y 84.04 ± 0.47 % respectivamente, en microencapsulados con inulina y maltodextrina. Resultados atribuidos a la sinergia entre la capacidad de retención de agua de la inulina y los materiales encapsulantes usados.

La EE% (96.12 ± 0.24 %) y la viabilidad (96.72 ± 1.96 % - 8.78 ± 0.17 Log UFC/g), en este estudio, son un indicador que refleja la capacidad del proceso y del material encapsulante para proteger las células probióticas durante procedimientos que implican estrés térmico y desecación

(Anandharamakrishnan & Isauria, 2015; Barbosa-Cánovas *et al*., 2021). Además, indican la idoneidad de la matriz binaria inulina-maltodextrina y un buen ajuste en las condiciones para el microencapsulado, (Akbarbaglu *et al*., 2021).

De acuerdo con Fennema *et al*. (2017), el bajo contenido de humedad (3.12 ± 0.05 %) y a_W (0.255 ± 0.003) obtenidos en el presente estudio, son aceptables para garantizar estabilidad microbiológica, química y minimizar las reacciones de degradación que puede afectar el producto. En este sentido, Fredes *et al*. (2018), para el secado por aspersión de compuestos bioactivos reportaron valores de a_W 0.3 ± 0.01, humedad 6.4 ± 0.03 %, higroscopicidad 39.4 ± 0.03 % y solubilidad 70.4 ± 0.01 %. Asimismo, Rodríguez-Barona *et al*. (2016), para un microencapsulado con inulina y maltodextrina reportaron valores de humedad 0.7 ± 0.04 %, a_W 0.06 ± 0.06, higroscopicidad 15.65 ± 0.57 g H_2O/100 g, solubilidad 98.99 ±0.70 % y humectabilidad 1.97 ± 0.08 min.

Los valores de a_W menores a 0.3 previene la actividad metabólica de células bacterianas, alargando vida útil y viabilidad de probióticos encapsulados (Santivarangkna *et al*., 2008). El material pared MD:IN, indican que mientras la inulina forma una matriz amorfa que inmoviliza el agua, la maltodextrina reduce la movilidad molecular (Fritzen-Freire *et al*., 2012).

La solubilidad determinada (99.01 ± 0.02 %), sugiere una dispersión completa en medios acuosos, comportamiento que concuerda con el estudio realizado por Soukoulis *et al*. (2014), donde evaluó la microencapsulación con MD (ED 18-20) y presentó solubilidades superiores a 95 %, resultados atribuido al bajo peso molecular de MD y sus propiedades hidrofílicas. Por otra parte, como lo describe Paim *et al*. (2016), la inulina puede modular la liberación del probiótico como se observó en encapsulados de *Bifidobacterium* con inulina, donde la estructura retardó la liberación celular en jugo gástrico simulado. En complemento, Santos *et al*. (2024), mencionan que un menor contenido de agua resultó en una mayor solubilidad del polvo, comportamiento explicado por las fuerzas de atracción entre las moléculas de soluto MD:IN y las moléculas de solvente (agua), que son favorecidas en muestras con menor contenido de agua, facilitando la disolución y dispersión de los componentes solubles.

Según Bhandari *et al*. (2013), el tiempo de humectabilidad obtenido (3.62 ± 0.12 min), refleja propiedades típicas de polvos con alta porosidad y tamaño de partícula homogénea. Este fenómeno sugiere que inulina incrementa la densidad de la matriz, formando una estructura que impide la

penetración de agua, pero manteniendo una dispersión eficiente. No obstante, como lo menciona Stępień & Grzyb (2023), con humectabilidades rápidas se podría comprometer la integridad de las microcápsulas en ambientes húmedos.

La higroscopicidad o capacidad de adsorción de agua (1.34 ± 0.02 %), según Santos *et al*. (2024), a mayor absorción aumenta la tendencia a la aglomeración de las microcápsulas, que puede comprometer su calidad y conducir a la degradación de las sustancias activas durante el almacenamiento, la naturaleza hidrofílica del material encapsulante se debe a las propiedades de la maltodextrina, las formulaciones con menor contenido de maltodextrina tendrían una capacidad de retención de humedad reducida. Reportaron valores de higroscopicidad que van desde 6.29 ± 0.11 % a 3.09 ± 0.10 %. Según Sablania *et al*. (2023), cuando el contenido de agua del alimento en polvo es bajo, existe una diferencia significativa en la concentración de agua entre el polvo y el aire circundante. Como resultado, las moléculas de agua del aire circundante son atraídas por el polvo, llenando los espacios vacíos entre las partículas y formando una capa de humedad alrededor del polvo, lo que resulta en una mayor higroscopicidad.

Las temperaturas de transición vítrea (T_g) de los materiales empleados maltodextrina (140 °C) (Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015) e inulina (120 - 140 °C) (Kawai *et al*., 2011) superan la temperatura de salida del secado (70 °C), lo que asegura que la matriz se encuentre en estado vítreo al finalizar el proceso. En este estado, la matriz reduce la movilidad molecular y crea una red estructural que minimiza los efectos negativos del agua disponible (Fritzen-Freire *et al*., 2012).

3.5.4 Evaluación de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado en el tiempo

La ausencia de diferencias significativas en la viabilidad de *L. reuteri* microencapsulado en el tiempo, sugiere que la matriz MD:IN protege el probiótico bajo las condiciones de almacenamiento evaluadas, características atribuidas a la matriz vítrea. La maltodextrina forma una estructura que encapsula las células, mientras que la inulina actúa como un agente que estabiliza la a_W (Fritzen-Freire *et al*., 2012; Kheto *et al*., 2023).

Rajam & Anandharamakrishnan (2015), reportaron estabilidad mayor a 8 Log UFC/g después de 60 dias de almacenamiento a 25 °C, gracias a la barrera física del material encapsulante compuesto por

aislado de proteína de suero, aislado de proteína de suero desnaturalizado y fructooligosacáridos. Por otra parte, Santos *et al*. (2025) reportan viabilidades que varían desde 8,02 a 6,01 Log UFC/g a 8 °C, y desde 4.00 a 2.00 Log UFC/mL a 25 °C para *L. rhamnosus* encapsulado (proteína de guisante, pectina y harina de tapioca) con secado por aspersión y almacenados por 49 dias. En este sentido, Abd-Talib *et al*. (2013), observaron una disminución en la viabilidad en microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión de *L. plantarum* B13 (8.11 a 5.48 Log UFC/mL) y *L. plantarum* B18 (7.51 a 2.6 Log UFC/mL), transcurridas dos semanas de almacenamiento a 25 °C, efecto causado por los niveles de alta humedad, factor que determina la viabilidad del probiótico durante el almacenamiento. En la presente evaluación, la viabilidad presentó una tendencia decreciente gráficamente, pero sin diferencias significativas, atribuido, a la estabilidad de la capsula formada y el empaque usado para almacenamiento.

El empaquetado del *L. reuteri* se dio en bolsas PET Metalizado/PEBD, a pesar de ello, tanto humedad como a_W presentaron diferencias significativas en el periodo de evaluación ($p<0.05$), comportamiento que refleja una saturación progresiva de los sitios de unión de agua en la matriz. El empaque usado evitó la plastificación de la matriz encapsulante por efecto de la humedad ambiental, ya que ofrece una barrera alta al oxígeno (OTR < 2 $cm^3/(m^2 \cdot 24h \cdot atm)$) y al vapor de agua (WVTR < 2 $g/(m^2 \cdot 24h \cdot atm)$), debido al aluminio vaporizado que bloquea la difusión de gases y humedad (Robertson, 2013), el empaque contribuyó a la estabilidad observada en *L. reuteri* microencapsulado, al actuar como barrera complementaria a la protección intrínseca de la matriz MD:IN.

El modelo de humedad sugiere que la tasa de adsorción disminuyó hacia el dias 64, indicando un equilibrio entre la humedad absorbida por el polvo y la retenida por la matriz MD:IN. Las bolsas PET Metalizado/PEBD, permitieron que se alcance el equilibro interno del empaque sin superar el límite critico (a_W 0.6) (Fennema *et al*., 2017; Fritzen-Freire *et al*., 2012; Kheto *et al*., 2023).

3.6 Conclusiones y recomendaciones

3.6.1 Conclusiones

El análisis de superficie de respuesta indicó que las condiciones óptimas, 130 °C de temperatura de entrada y 10 % de MD, permitieron alcanzar un rendimiento de 51.9 %, una viabilidad de

10.13 Log UFC/g, una humedad de 5.48 % y una a_W de 0.248. La caracterización morfológica por MEB corroboró la formación de partículas esféricas, con tamaños medios de 6.1 µm y paredes bien estructuradas. Durante 64 días de almacenamiento (15 °C, 86 % HR), la viabilidad probiótica se mantuvo estable (sin diferencias significativas, $p>0.05$).

De esta forma, la optimización del secado por aspersión para la obtención de microcápsulas de *Limosilactobacillus reuteri*, utilizando una matriz binaria de maltodextrina e inulina, mostró una alta viabilidad de *L. reuteri*, evidenciando su capacidad para proteger células probióticas frente a condiciones de estrés térmico y deshidratación. Además, el análisis morfológico por Microscopía Electrónica de Barrido reveló la formación de microcápsulas con una estructura esférica y superficie lisa.

3.6.2 Recomendaciones

Para reforzar la robustez del proceso, se sugiere explorar la zona térmica crítica por encima de 130 °C, evaluando los límites de estabilidad de componentes sensibles y la posible degradación de la viabilidad probiótica. Es necesario validar el desempeño del microencapsulado en escalas piloto y evaluar su comportamiento funcional en matrices alimentarias específicas, incluyendo estudios sensoriales y de liberación controlada bajo condiciones de digestión simulada.

3.7 Bibliografía

Abd-Talib, N., Hamidah Mohd-Setapar, S., Kamal Khamis, A., Nian-Yian, L., & Aziz, R. (2013). Survival of encapsulated probiotics through spray drying and non-refrigerated storage for animal feeds application. *Agricultural Sciences*, *04*(05), 78–83. https://doi.org/10.4236/as.2013.45B015

Akbarbaglu, Z., Peighambardoust, S. H., Sarabandi, K., & Jafari, S. M. (2021). Spray drying encapsulation of bioactive compounds within protein-based carriers; different options and applications. In *Food Chemistry* (Vol. 359). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129965

Anandharamakrishnan, C. ., & Ishwarya, S. Padma. (2015). *Spray drying techniques for food ingredient encapsulation*. Wiley-Blackwell, IFT Press.

Arepally, D., Sudharshan Reddy, R., Coorey, R., & Goswami, T. K. (2023). Modelling inactivation kinetics of free and encapsulated probiotic cells in millet biscuit under different baking conditions. *Food Res Int*, *174*, 113573. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113573

Asfaq, & Chand, K. (2020). Effect of Moisture Absorber and High-Density Polyethylene Bags on Shelf Life of Edible Coated Jaggery Cubes During Storage. *Sugar Tech*, *22*(6), 1130–1137. https://doi.org/10.1007/s12355-020-00849-4

Aydın, A., Yüceer, M., Ulugergerli, E., & Caner, C. (2024). Improving food security as disaster relief using intermediate moisture foods and active packaging technologies. *Applied Food Research*, *4*(1). https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100378

Badin, R., Gaiani, C., Desobry, S., Prakash, S., Bhandari, B., & Burgain, J. (2023). *Food Hydrocolloids Dynamic investigation of maltodextrins surface properties by environmental atomic force microscopy*. *145*(July). https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109081

Barajas-Álvarez, P., González-Ávila, M., & Espinosa-Andrews, H. (2022). Microencapsulation of Lactobacillus rhamnosus HN001 by spray drying and its evaluation under gastrointestinal and storage conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *153*, 112485. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112485

Barbosa-Cánovas, G. V, Board, A., Hartel, R. W., Peleg, M., Rahman, S., University, Q., & Rao, O. M. A. (2021). *Food Powders Properties and Characterization* (E. Ermiş, Ed.). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48908-3

Bhandari, B., Bansal, N., Zhang, M., & Schuck, P. (2013). *Handbook of food powders* (B. Bhandari, N. Bansal, M. Zhang, & P. Schuck, Eds.; 1st ed.). Woodhead Publishing. www.woodheadpublishing.com

Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., & Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *6*(4), 420–428. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003

Ceballos, A. M., Giraldo, G. I., & Orrego, C. E. (2012). Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *J Food Eng*, *111*(2), 360–365. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2012.02.010

El-Enshasy, H. A., & Yang, S.-T. (2021). Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms. In *Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms* (1st ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781351027540

Fennema, O., Damodaran, S., & Parkin, K. (2017). *Fennema´s Food Chemistry* (Fifth). Taylor & Francis Group. https://lccn.loc.gov/2016027062

Fredes, C., Becerra, C., Parada, J., & Robert, P. (2018). The Microencapsulation of Maqui (Aristotelia chilensis (Mol.) Stuntz) Juice by Spray-Drying and Freeze-Drying Produces Powders with Similar Anthocyanin Stability and Bioaccessibility. *Molecules*, *23*(5), 1227. https://doi.org/10.3390/molecules23051227

Freudig, B., Hogekamp, S., & Schubert, H. (1999). Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, *4–6*(38), 525–532. https://www.infona.pl//resource/bwmeta1.element.elsevier-33e81bfd-56c5-3670-897d-8ebf9cea4cb8

Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Res Int*, *45*(1), 306–312. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.09.020

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. In *Food Research International* (Vol. 40, Issue 9, pp. 1107–1121). https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004

Gonzales-Cuello, R., Perez-Mendoza, J., & Morón-Alcazar, L. (2015). Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de Lactobacillus delbrueckii sometido a Jugos Gástricos Simulados. *Información Tecnológica*, *26*(5), 11–16. https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000500003

González, E., Gómez-Caravaca, A. M., Giménez, B., Cebrián, R., Maqueda, M., Parada, J., Martínez-Férez, A., Segura-Carretero, A., & Robert, P. (2020). Role of maltodextrin and inulin as encapsulating agents on the protection of oleuropein during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem*, *310*, 125976. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125976

Gutiérrez, L. F., Arias, S., Garzón, D., López Velasco, D. M., & Osorio Alturo, A. (2014). Transición vítrea en alimentos: sistemas binarios agua-carbohidratos. *Revista Vector*, *9*, 21–28. http://vector.ucaldas.edu.co/downloads/Vector9_4.pdf

Jackson, P. P., Wijeyesekera, A., Theis, S., van Harsselaar, J., & Rastall, A. R. (2022). Food for thought! Inulin-type fructans: Does the food matrix matter? *J Funct Foods*, *90*(January), 104987. https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104987

Kawai, K., Fukami, K., Thanatuksorn, P., Viriyarattanasak, C., & Kajiwara, K. (2011). Effects of moisture content, molecular weight, and crystallinity on the glass transition temperature of inulin. *Carbohydrate Polymers*, *83*(2), 934–939. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.001

Kent, R. M., & Doherty, S. B. (2014). Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *FRIN*, *64*, 567–576. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.029

Kheto, A., Bist, Y., Awana, A., Kaur, S., Kumar, Y., & Sehrawat, R. (2023). Utilization of inulin as a functional ingredient in food : Processing , physicochemical characteristics , food applications , and future research directions. *Food Chemistry Adv*, *3*(March), 100443. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100443

Kingwatee, N., Apichartsrangkoon, A., Chaikham, P., Worametrachanon, S., Techarung, J., & Pankasemsuk, T. (2015). Spray drying Lactobacillus casei 01 in lychee juice varied carrier materials. *LWT*, *62*(1), 847–853. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.007

Kurozawa, L. E., Park, K. J., & Hubinger, M. D. (2009). Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. *Journal of Food Engineering*, *94*(3–4), 326–333. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.03.025

Lacerda, E. C. Q., Calado, V. M. D. A., Monteiro, M., Finotelli, P. V., Torres, A. G., & Perrone, D. (2016). Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 500–510. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.093

Laureanti, E. J. G., Paiva, T. S., de Matos Jorge, L. M., & Jorge, R. M. M. (2023). Microencapsulation of bioactive compound extracts using maltodextrin and gum arabic by spray and freeze-drying techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, *253*(September), 126969. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126969

Lorenzoni, G., Araújo, M. De, José, A., Queiroz, L., Jacob, E., Smanioto, J., Marlon, É., Flores, D. M., Bona, C. De, Ragagnin, C., & Menezes, D. (2018). Inulin, hi-maize , and trehalose as thermal protectants for increasing viability of Lactobacillus acidophilus encapsulated by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *89*(May 2017), 128–133.

Marefati, A., Pitsiladis, A., Oscarsson, E., Ilestam, N., & Bergenståhl, B. (2021). Encapsulation of Lactobacillus reuteri in W1/O/W2 double emulsions: Formulation, storage and in vitro gastro-intestinal digestion stability. *LWT - Food Science and Technology*, *146*, 111423. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111423

Minj, S., & Anand, S. (2022). Development of a spray-dried conjugated whey protein hydrolysate powder with entrapped probiotics. *J. Dairy Sci.*, *105*(3), 2038–2048. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20978

Mohamadzadeh, M., Fazeli, A., Vasheghani-Farahani, E., & Shojaosadati, S. A. (2025). Viability and stability evaluation of microencapsulated Lactobacillus reuteri in polysaccharide-based bionanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, *347*(August 2024). https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122693

Montes-Ramírez, L. M. (2013). *Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (Lactobacillus casei ATCC 393 y Lactobacillus rhamnosus ATCC 9469)*. https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/11893

Oluwatosin, S. O., Tai, S. L., & Fagan-Endres, M. A. (2022). Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic – towards a freeze dried Lactobacillus plantarum topical probiotic. *Biotechnol Rep*, *33*, e00696. https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00696

Paim, D. R. S. F., Costa, S. D. O., Walter, E. H. M., & Tonon, R. V. (2016). Microencapsulation of probiotic jussara (Euterpe edulis M.) juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *74*, 21–25. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.022

Peighambardoust, S. H., Golshan Tafti, A., & Hesari, J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(5), 215–224. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.009

Qiao, F., Wang, S., He, J., Hung, W., Ma, X., Gong, P., Li, J., Sun, T., De Souza, C., Zhang, L., & Lin, K. (2024). Investigating the role of membrane lipid composition differences on spray drying survival in Lactobacillus bulgaricus using non-targeted Lipidomics. *Food Chem*, *459*(April), 140336. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140336

Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of Lactobacillus plantarum (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *60*(2), 773–780. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062

Robertson, G. L. . (2013). *Food packaging : principles and practice* (3rd ed.). CRC Press.

Rodríguez-Barona, Sneyder., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebioticos. *Información Tecnológica*, *27*(6), 135–144. https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014

Roselen, M. D., Weber, F., Diaz de Oliverira, P., Rochedo, F., Scherer, R., Fiorentini, A. M., Padilha da Silva, W., & Pieniz, S. (2019). Symbiotic microencapsulation of Lactococcus lactis subsp. lactis R7 using whey and inulin by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *115*(July), 108411. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108411

Sablania, V., Basak, S., & Bosco, S. J. D. (2023). Effect of spray drying on physical, structural, and functional properties of Murraya koenigii leaf extract. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *17*(5), 4672–4683. https://doi.org/10.1007/s11694-023-01992-8

Samakradhamrongthai, R. S., Maneechot, S., Wangpankhajorn, P., Jannu, T., & Renaldi, G. (2022). Polydextrose and guar gum as a fat substitute in rice cookies and its physical, textural, and sensory properties. *Food Chemistry Adv*, *1*(May), 100058. https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100058

Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(1), 1–13. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x

Santos, N. C., Almeida, R. L. J., Albuquerque, J. C., de Andrade, E. W. V., Gregório, M. G., Santos, R. M. S., Rodrigues, T. J. A., Carvalho, R. de O., Gomes, M. M. de A., Moura, H. V., de Figueiredo, D. V. P., Araújo, M. A., Lima, V. R. do N., & Mota, M. M. de A. (2024). Optimization of ultrasound pre-treatment and the effect of different drying techniques on antioxidant capacity, bioaccessibility, structural and thermal properties of purple cabbage. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, *201*, 109801. https://doi.org/10.1016/j.cep.2024.109801

Santos, N. C., Almeida, R. L. J., Monteiro, S. S., de Lima, T. L. B., da Silva Lúcio, A., Nogueira, L. P. da S., Paiva, Y. F., Gregório, M. G., Brito, A. C. de O., da Silva, L. A., de Figueiredo, D. V. P., Silva, R. dos S., Mota, M. M. de A., Pasquali, M. A. de B., de Sousa, S., & Rocha, A. P. T. (2025). Microencapsulating Lacticaseibacillus rhamnosus GG by spray drying using pea protein, pectin, and tapioca flour: Probiotic viability, digestibility and thermal stability. *Food and Bioproducts Processing*, *150*, 207–216. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2025.01.011

Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of Lactobacillus paracasei by spray freeze drying. *Food Research International*, *43*(1), 193–202. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.028

Shokri, Z., Reza Fazeli, M., Ardjmand, M., Mohammad Mousavi, S., & Gilani, K. (2015). Factors affecting viability of Bifidobacterium bifidum during spray drying. *DARU Journal Of Pharmaceutical Sciences*, *23*(7).

Siemons, I., Politiek, R. G. A., Boom, R. M., van der Sman, R. G. M., & Schutyser, M. A. I. (2020). Dextrose equivalence of maltodextrins determines particle morphology development during single sessile droplet drying. *Food Research International*, *131*, 108988. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108988

Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Impact of Milk Protein Type on the Viability and Storage Stability of Microencapsulated Lactobacillus acidophilus NCIMB 701748 Using Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(5), 1255–1268. https://doi.org/10.1007/S11947-013-1120-X/TABLES/7

Stępień, A., & Grzyb, K. (2023). Comparison of critical storage parameters of the powders containing soy protein isolate and inulin, based on the concepts: Water activity and Temperature of glass transition. *International Journal of Biological Macromolecules*, *230*, 123174. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123174

Walz, M., Hirth, T., & Weber, A. (2018). Investigation of chemically modified inulin as encapsulation material for pharmaceutical substances by spray-drying. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *536*, 47–52. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.07.072

4. Capítulo 4. Determinar la supervivencia del microencapsulado de *Limosilactobacillus reuteri* bajo condiciones gastrointestinales *in vitro*

4.1 Resumen

En el presente capítulo se determinó la supervivencia de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales *in vitro*, simulando las fases oral, gástrica e intestinal. Para ello, 5 g del microencapsulado se reconstituyeron en fluido oral simulado (1:1 p/p) y se prepararon soluciones stock salival, gástrica e intestinal. En cada etapa digestiva: oral (amilasa 75 U/mL, $CaCl_2$ 1,5 mM, pH 7), gástrica (pepsina 2000 U/mL, lipasa 60 U/mL, $CaCl_2$, 0.15 mM, pH 3) e intestinal (pancreatina 100 U/mL, sales biliares 10 mM, $CaCl_2$, 0.6 mM, pH 7), el sustrato resultante se sembró en agar MRS para cuantificar viabilidad (UFC/g). El análisis estadístico incluyó pruebas de normalidad (Shapiro–Wilk), homogeneidad de varianzas (Levene), ANOVA y comparaciones múltiples de Tukey (R-Studio). Los resultados indicaron un incremento significativo ($p<0.05$) de la viabilidad desde la fase bucal (8.118 ± 0.314 Log UFC/g) hasta la fase intestinal (10.335 ± 0.434 Log UFC/g), indicando una capacidad protectora y de liberación controlada de la matriz encapsulante.

4.2 Introducción

La administración efectiva de probióticos en alimentos funcionales depende críticamente de la capacidad de las cepas microbianas para sobrevivir al tránsito gastrointestinal, donde enfrentan desafíos físicos, químicos y enzimáticos que pueden comprometer su viabilidad y, por ende, su efecto en el hospedador (Brodkorb *et al*., 2019). *Limosilactobacillus reuteri*, reconocido por sus propiedades probióticas inmunológicas, antimicrobianas y la síntesis de metabolitos bioactivos, requiere estrategias de protección para garantizar que una proporción significativa de células alcance el intestino delgado y grueso viables (Bian *et al*., 2011; Mu *et al*., 2018). La microencapsulación por

secado por aspersión, mediante matrices de inulina y maltodextrina, es un proceso que permite preservar la integridad celular ante el estrés térmico, osmótico y mecánico del procesamiento, así como frente a las condiciones adversas del medio gastrointestinal (Akbarbaglu *et al*., 2021; Rodríguez-Barona *et al*., 2016).

La simulación *in vitro* gastrointestinal, es un modelo que permite evaluar la supervivencia de *L. reuteri* microencapsulado. Cada fase digestiva incorpora factores críticos: en la fase oral, la amilasa y la presencia de $CaCl_2$ modulan la hidrólisis de las paredes encapsulantes; en la fase gástrica, la pepsina y la lipasa someten a la cápsula a un ambiente ácido y proteolítico; finalmente, en la fase intestinal, la pancreatina y las sales biliares simulan el estímulo de liberación final en un medio alcalino y emulsificante (Meldrum & Yakubov, 2024; Witt & Stokes, 2015; Zimmermann *et al*., 2023). El presente capitulo determinó la supervivencia de *L. reuteri* para la formulación de matrices alimentarias con adición de probióticos.

4.3 Metodología

4.3.1 Condiciones gastrointestinales *in vitro*

De acuerdo con la metodología descrita por Brodkorb *et al*. (2019), para simular condiciones gastrointestinal *in-vitro*, se reconstituyeron 5 g de microencapsulado en una proporción 1:1 (p/p) con fluido oral simulado, garantizando una dispersión homogénea de las partículas en la fase líquida inicial. A continuación, se prepararon soluciones stock salivales, gástricas e intestinales. Para determinar la estabilidad del microencapsulado en cada fase se inoculó 100 µL en cajas Petri con agar MRS y azul de anilina y se incubó a 37°C por 48 horas, se utilizaron perlas de vidrio estériles para distribuir en la superficie de las cajas Petri. Finalmente se realizó el recuento en placa y se determinaron como resistentes crecimientos superiores o iguales a 30 y 300 UFC/g Fase oral

En la fase oral, el microencapsulado reconstituido se mezcló con solución salival en proporción 1:1 (p/p), incorporando 1.5 mM de $CaCl_2$ para estabilizar la matriz polimérica y prevenir la agregación prematura de las cápsulas. Se adicionaron 75 U/mL de amilasa salival, enzima clave responsable de iniciar la hidrólisis de polisacáridos superficiales, y 0.225 mL de agua destilada, completando un volumen total de 5 g de muestra en 5 mL de medio. La mezcla se incubó en agitación constante (2 min, 37 °C, pH 7), para finalmente realizar recuento en placa.

4.3.2 Fase gástrica

Posteriormente, el sustrato proveniente de la fase oral (10 mL) se combinó a un ratio 1:1 (v/v) con fluido gástrico, al cual se añadió 0.15 mM de $CaCl_2$ para mantener la estabilidad coloidal y 2000 U/mL de pepsina junto a 60 U/mL de lipasa gástrica, enzimas responsables de la degradación proteica y lipídica, respectivamente. Tras ajustar el pH a 3.0 empleando 0.4 mL de HCl 5 M, la muestra se incubó 2 h a 37 °C y 60 rpm, finalmente se realizó recuento en placa.

Cantidades:

- 10 mL de sustrato desde fase oral.
- 8 mL de solución con electrólitos con factor 1.25.
- 0.005 mL de CaCl2 (0.3 M).
- 0.667 mL pepsina.
- 0.48 mL lipasa gástrica.
- 0.448 mL agua destilada.
- 0.4 mL HCl (5 M) para ajustar pH (mL).

4.3.3 Fase intestinal

En la fase intestinal, se mezclaron 20 mL del producto gástrico con solución intestinal en proporción 1:1 (v/v), añadiendo 10 mM de sales biliares para emular la función emulsificante de la bilis y 0.6 mM de $CaCl_2$ para conservar la integridad de la matriz. Se incorporaron 100 U/mL de tripsina en forma de pancreatina y se ajustó el pH a 7.0 mediante 0.8 mL de NaOH 5 M. La incubación se realizó bajo agitación (60 rpm, 2 h, 37 °C), para finalmente realizar recuento en placa.

Cantidades:

- 20 mL desde fase gástrica.
- 8 mL de solución con electrólitos con factor 1.25.
- 0.04 mL de $CaCl_2$.
- 5 mL pancreatina.
- 3 mL sales biliares.
- 3.16 mL agua destilada.
- 0.8 mL NaOH 5M.

4.3.4 Análisis estadístico

Los datos se recopilaron en Microsoft Excel. Posteriormente, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas utilizando el test de Levene. Se aplico ANOVA. Los tratamientos considerados correspondieron a tres fases de condiciones gastrointestinales, con cinco réplicas para cada fase. Finalmente, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey para identificar las diferencias significativas entre los grupos evaluados. El software estadístico usado fue R-Studio.

4.4 Resultados

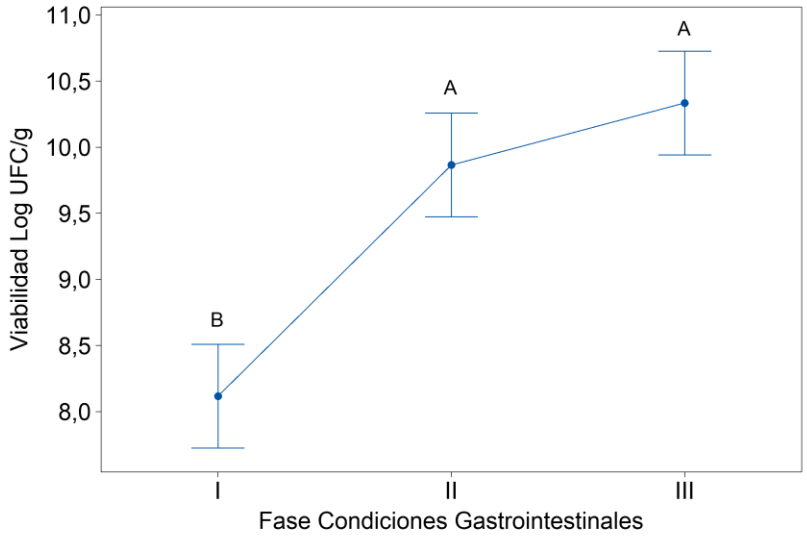
4.4.1 Condiciones Gastrointestinales *in-vitro*

El ANOVA (**Tabla 4-1**), indicó diferencias significativas ($p<0.05$). En la **Figura 4-1** se graficaron los valores medios y desviaciones estándar de la viabilidad de *L. reuteri* ME expresado en Log UFC/g, donde se grafican los valores 8.118 ± 0.314, 9.866 ± 0.447, 10.335 ± 0.434 Log UFC/g para las fases I (oral), II (gástrica) y III (intestinal) respectivamente. Se evidencia un incremento bacteriano progresivo en los valores de viabilidad en cada fase de las condiciones evaluadas.

Tabla 4-1: ANOVA para pruebas gastrointestinales *in vitro.*

	Gl	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Fase	2	13.660	6.830	42.11	<0.00001
Residuales	12	1.946	0.162		
*Significancia p<0.05					

Figura 4-1: Intervalos de viabilidad expresados en Log UFC/g de *L reuteri* microencapsulado frente a condiciones gastrointestinales.



Fase: I = fase bucal. II = fase gástrica. III = fase intestinal. Letras diferentes presentan diferencias significativas ($p<0.05$).

La prueba de Tukey indicó dos agrupaciones para la viabilidad de *L. reuteri* ME sometido a las fases gastrointestinales *in-vitro,* la fase II y III no tienen diferencias significativas entre ellas ($p>0.05$). Sin embargo, tienen diferencias significativas frente a la fase I ($p<0.05$). El resultado permite confirmar que las condiciones simuladas en cada fase gastrointestinal tienen un efecto significativo en la viabilidad del microorganismo microencapsulado, encontrando en la fase intestinal la mayor expresión de UFC/g.

4.5 Discusión

Los resultados de viabilidad de *L. reuteri* microencapsulado (ME) bajo condiciones gastrointestinales simuladas presentan un incremento progresivo en los valores de Log UFC/g desde la fase oral (8.118 ± 0.434), hasta la fase intestinal (10.335 ± 0.314), con diferencias significativas entre las fases ($p<0.05$). Este comportamiento, donde la viabilidad aumenta tras la exposición a condiciones digestivas adversas, sugiere que la matriz MD:IN no solo protege al probiótico, sino que

también modula su liberación controlada en respuesta a los cambios fisicoquímicos del tracto gastrointestinal (TGI).

En la Fase I, la exposición (2 min) y el pH neutro (7.0) no comprometen la integridad de la microcápsula formada a 130 °C. La MD, altamente soluble, puede generar una capa superficial retrasando la hidrólisis enzimática inicial, mientras que la IN actúa como barrera física contra la actividad de la α-amilasa (75 U/mL), que teóricamente, degradaría la MD (Brodkorb *et al*., 2019). La viabilidad en esta Fase I (8.118 ± 0.434 Log UFC/g) puede deberse a una liberación parcial de células no encapsuladas.

En la Fase II, el incremento a 9.866 ± 0.447 Log UFC/g ($p<0.05$), indica una liberación de la BAL encapsulada en ambientes ácidos, sugiriendo que la pared formada MD:IN protege el microencapsulado, evitando la pérdida por desnaturalización (pepsina, pH 3.0) de las proteínas de superficie bacteriana (Akbarbaglu *et al*., 2021).

En la Fase III la viabilidad incrementó a 10.335 ± 0.314 Log UFC/g, valores que sugieren una liberación controlada del probiótico microencapsulado. El ambiente de las condiciones intestinales simuladas, compuesto por sales biliares y pancreatina, degradan selectivamente la MD, liberando células viables encapsuladas en el núcleo de la matriz, similar a lo nombrado por Soukoulis *et al*. (2014).

Rajam & Anandharamakrishnan (2015), evaluaron el efecto de materiales pared (fructooligosacáridos - FOS y aislado de proteína de suero - DWPI) sobre la viabilidad de *L. plantarum* bajo condiciones gastrointestinales *in vitro* con un modelo estático (gástrico e intestinal), observaron la mayor viabilidad de las BAL encapsulada con la matriz FOS:DWPI, resultado explicado por la naturaleza soluble de las cápsulas de FOS y la capacidad protectora de DWPI. De igual forma, Marefati *et al*. (2021), sometieron a *L. reuteri* microencapsulado a digestión gástrica *in-vitro*, donde el número de UFC disminuyó de 6.69 ± 0.07 a 6.53 ± 0.07 Log UFC/mL, mientras que, las muestras control disminuyeron de 6.25 ± 0.36 a 4.70 ± 0.08 Log UFC/mL, en la digestión intestinal *in vitro* los recuentos de *L. reuteri* encapsulada disminuyeron de 6,53 ± 0,07 a 4,64 ± 0,06 Log UFC/mL y las muestras control de 4.70 ± 0.08 a 2.69 ± 0.06 Log UFC/mL. Los resultados mostraron que el proceso de microencapsulación de *L. reuteri* con MD:IN como material

encapsulante proporcionan protección en el intestino y retrasan la liberación durante toda la digestión.

Santos *et al*. (2025), evalúan la viabilidad de *L. rhamnosus* encapsuladas con secado por aspersión y sometidas a digestión *in vitro*, el recuento antes de la digestión para los tratamientos fue de 5.5 a 6.04 Log UFC/g, que disminuyeron entre 4.94 a 4.63 Log UFC/g en la fase gástrica y entre el 4.24 a 4.00 Log UFC/g en la fase de intestinal, mencionaron que en todas las muestras, la fase intestinal provocó una reducción más pronunciada en la viabilidad en comparación con la fase gástrica, causado por el estrés en el cambio de pH acido - básico (2.5 a 8.0) y la acción de enzimas digestivas, eventualidad opuesta a la presentada en la presente investigación, donde el mayor crecimiento se presentó en la fase intestinal.

De acuerdo con lo mencionado por Yao *et al*. (2020), Marefati *et al*. (2021) y Santos *et al*. (2025), las sales biliares actúan como agentes emulsificantes, mejoran la accesibilidad de las enzimas digestivas a la matriz encapsulante y expresan propiedades antibacterianas actuando como detergentes que alteran las membranas celulares, al formar micelas, las sales biliares modifican la interfaz de la maltodextrina, facilitando la acción de la α amilasa al aumentar la superficie de contacto entre la enzima y el sustrato. Finalmente, se pone en acción el efecto prebiótico de la inulina, se fermenta parcialmente en el intestino, generando ácidos grasos de cadena corta que estimulan el metabolismo probiótico (Kheto *et al*., 2023).

4.6 Conclusiones y recomendaciones

4.6.1 Conclusiones

La determinación de la supervivencia del microencapsulado *Limosilactobacillus reuteri* bajo condiciones gastrointestinales *in-vitro* demostró un incremento progresivo en la viabilidad, pasando de 8.118 ± 0.434 Log UFC/g en la fase oral a 9.866 ± 0.447 Log UFC/g en la fase gástrica, alcanzando 10.335 ± 0.314 Log UFC/g en la fase intestinal. Este comportamiento sugiere que, bajo condiciones gastrointestinales *in vitro*, la matriz MD:IN no solo preserva la integridad celular, sino que facilita una liberación controlada en el ambiente intestinal.

4.6.2 Recomendaciones

Se recomienda evaluar variaciones en la composición de la matriz encapsulante para optimizar la liberación bacteriana, y determinar su efecto sobre la viabilidad durante digestiones gastrointestinales simuladas.

4.7 Bibliografía

Akbarbaglu, Z., Peighambardoust, S. H., Sarabandi, K., & Jafari, S. M. (2021). Spray drying encapsulation of bioactive compounds within protein-based carriers; different options and applications. In *Food Chemistry* (Vol. 359). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129965

Bian, L., Molan, A.-L., Maddox, I., & Shu, Q. (2011). Antimicrobial activity of Lactobacillus reuteri DPC16 supernatants against selected food borne pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(4), 991–998. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0543-z

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., … Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1

Kheto, A., Bist, Y., Awana, A., Kaur, S., Kumar, Y., & Sehrawat, R. (2023). Utilization of inulin as a functional ingredient in food : Processing , physicochemical characteristics , food applications , and future research directions. *Food Chemistry Adv*, *3*(March), 100443. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100443

Marefati, A., Pitsiladis, A., Oscarsson, E., Ilestam, N., & Bergenståhl, B. (2021). Encapsulation of Lactobacillus reuteri in W1/O/W2 double emulsions: Formulation, storage and in vitro gastro-intestinal digestion stability. *LWT - Food Science and Technology*, *146*, 111423. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111423

Meldrum, O. W., & Yakubov, G. E. (2024). Journey of dietary fiber along the gastrointestinal tract: role of physical interactions, mucus, and biochemical transformations. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2390556

Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of Lactobacillus reuteri in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*, *9*(APR), 757. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757

Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of Lactobacillus plantarum (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *60*(2), 773–780. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062

Rodríguez-Barona, Sneyder., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebioticos. *Información Tecnológica*, *27*(6), 135–144. https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014

Santos, N. C., Almeida, R. L. J., Monteiro, S. S., de Lima, T. L. B., da Silva Lúcio, A., Nogueira, L. P. da S., Paiva, Y. F., Gregório, M. G., Brito, A. C. de O., da Silva, L. A., de Figueiredo, D. V. P., Silva, R. dos S., Mota, M. M. de A., Pasquali, M. A. de B., de Sousa, S., & Rocha, A. P. T. (2025). Microencapsulating Lacticaseibacillus rhamnosus GG by spray drying using pea protein, pectin, and tapioca flour: Probiotic viability, digestibility and thermal stability. *Food and Bioproducts Processing*, *150*, 207–216. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2025.01.011

Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Impact of Milk Protein Type on the Viability and Storage Stability of Microencapsulated Lactobacillus acidophilus NCIMB 701748 Using Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(5), 1255–1268. https://doi.org/10.1007/S11947-013-1120-X/TABLES/7

Witt, T., & Stokes, J. R. (2015). Physics of food structure breakdown and bolus formation during oral processing of hard and soft solids. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 3, pp. 110–117). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.06.011

Yao, M., Xie, J., Du, H., McClements, D. J., Xiao, H., & Li, L. (2020). Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(2), 857–874. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12532

Zimmermann, J. A., Sirini, N., Oliveroa, C. R., Renna, M. S., Signorinic, M. L., Zbrun, M. V., Frizzo, L. S., & Soto, L. P. (2023). Macroencapsulation of Limosilactobacillus reuteri DSPV002C as nutritional supplement for piglets : conditions. *Revista Argentina de Microbiología*, *xxxx*, 12. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ram.2023.07.005

5. Capítulo 5. Evaluar la estabilidad durante el almacenamiento de una panela granulada adicionada con *Limosilactobacillus reuteri*

5.1 Resumen

El presente capítulo evaluó la estabilidad durante el almacenamiento de panela granulada adicionada con *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado (ME) y biomasa libre (BM). El jugo de caña, obtenido en Sandoná (Nariño) y concentrado a 89 °Brix, se granuló por batido a 50 °C y se incorporaron probióticos en tres niveles (5 %, 10 %, 15 % ME) y 5 % BM, más un control sin adición. Los productos empaquetados en bolsas Doypack (PET-PA-PE, OTR <70 cc/m²·día·atm; WVTR <10 g/m²·día·atm) se almacenaron a 15 °C y 85 % HR. Se monitorearon la viabilidad (UFC/g), humedad (%), actividad de agua (a_W), solubilidad (%), humectabilidad (min) y coordenadas CIEL*a*b* a los días 0, 15, 30 y 45, empleando modelos mixtos con estructuras de covarianza optimizadas por BIC.

Los tratamientos con ME presentaron un incremento significativo de viabilidad hasta el día 30 ($p<0.05$), seguido de una leve disminución al día 45. Las formulaciones con ME mostraron humedad estable (2.36 – 5.50 %) y a_W inferior a 0.62. La solubilidad disminuyó ligeramente en el tiempo, más pronunciado en BM, y la humectabilidad se prolongó gradualmente, indicando mayor resistencia al contacto con agua. Las coordenadas L* aumentaron con ME, mientras a* y b* tendieron a reducirse, reflejando cambios cromáticos atribuibles a la matriz maltodextrina-inulina. Análisis bromatológico y microbiológico cumplieron con la normatividad ICONTEC, y la prueba sensorial de ordenamiento reveló mayor aceptación en concentraciones bajas de ME.

5.2 Introducción

La creciente demanda de alimentos funcionales ha impulsado el desarrollo de productos que combinan la nutrición tradicional con beneficios probióticos, orientados a mejorar la salud gastrointestinal y el bienestar general del consumidor (Essa *et al*., 2023; Karasawa & Mohan, 2018). Sin embargo, la incorporación exitosa de estas cepas en matrices alimentarias depende de su supervivencia durante el procesamiento, el almacenamiento y el tránsito gastrointestinal, etapas críticas en las que los microorganismos pueden perder viabilidad y, por ende, eficacia funcional (Fennema *et al*., 2017; Rasane *et al*., 2015).

La panela granulada, derivada de la evaporación y cristalización del jugo de caña de azúcar, es un ingrediente de amplia tradición y consumo en Colombia, con alto valor nutricional y presencia de compuestos fenólicos y minerales (Gupta *et al*., 2023). En el departamento de Nariño, la producción de panela sustenta gran parte de la economía familiar campesina, implementándose métodos artesanales y tecnificados en trapiches locales (Beltrán Martínez, 2020b; N. F. Ramírez *et al*., 2014; UPRA, 2023b). La innovación mediante la adición de probióticos microencapsulados aporta valor agregado, permitiendo desarrollar un alimento funcional que combine las características de la panela con los beneficios de *L. reuteri*.

La microencapsulación por secado por aspersión, empleando matrices de inulina y maltodextrina, constituye una estrategia eficaz para proteger las células probióticas de los rigores térmicos y osmóticos del proceso, y de las variaciones de humedad durante el almacenamiento (Akbarbaglu *et al*., 2021; Rodríguez-Barona *et al*., 2016) En este capítulo se evaluó la estabilidad de panela granulada adicionada con *L. reuteri*, comparando tres concentraciones de microencapsulado (5 %, 10 %, 15 % ME), biomasa libre (5 % BM) y un control sin adición.

5.3 Metodología

5.3.1 Inclusión de *Limosilactobacillus reuteri* en panela granulada

El jugo de caña se obtuvo de un trapiche del municipio de Sandoná, Nariño. Se transportó hasta la ciudad de Pasto y se procesó en el laboratorio del Grupo de Investigación Probiotec Forapis de la Universidad de Nariño.

El jugo de caña con 22 °Brix se filtró, se vertió en un recipiente y se inició con el calentamiento. Cuando alcanzó los 120 °C con una concentración de 89 °Brix, se vertió en un recipiente y se empezó con el proceso de batido por 20 min para obtener granulación (Morales-Ramos *et al*., 2017).

Durante el batido, cuando la temperatura disminuyó a 50 °C, se adicionó *L. reuteri* en dos formas, microencapsulado (ME) y biomasa (BM). El microencapsulado se obtuvo mediante el secado por aspersión utilizando como matriz encapsulante maltodextrina (DE 18–22) (10 % p/v) e inulina (10 % p/v). El secado se realizó en el equipo Labplant SD-Basic (boquilla de 0,5 mm) a una temperatura de entrada de 130 °C y de salida de 70 ± 1 °C, con velocidad de alimentación de 6,3 mL/min.

Se incluyó *L. reuteri* ME al 5%, 10% y 15%; biomasa 5% (BM) y un tratamiento control sin adición de probiótico, de esta forma se asignaron los tratamientos tto 1, tto 2, tto 3, tto 4 y tto 5 respectivamente. Finalmente, los tratamientos se dejaron enfriar para empacar en bolsas Doypack PET-(PA-PE) 120 µm OTR < 70 cc/(m^2*24hr*atm) y WVTR < 10 g/(m^2*24hr*atm), y almacenar en condiciones ambientales controladas (15 °C, 85% HR) (Morales-Ramos *et al*., 2017).

5.3.2 Viabilidad UFC/g

De acuerdo con lo propuesto por Rodríguez-Barona *et al*. (2016), se rehidrató 1 g de panela granulada en 9 mL de agua peptonada (pH 7.2±2), se homogenizó en vortex por 1 min y se dejó reposar durante 30 min. Luego se inoculó un volumen de 100 µL de dilución en superficie sobre medio MRS con azul de anilina y se llevó a incubación a 37°C por 48 horas. Los recuentos se expresaron como UFC/g para cada condición experimental (Semyonov *et al*., 2010). El porcentaje de viabilidad para cada muestra se estimó con la ecuación de viabilidad % (Ec. 5. Pag 58).

5.3.3 Humedad %

Para determinar la humedad se tomaron 2 gramos de panela granulada y se analizaron en el determinador de Humedad KERN DBS 60-3 (Balingen – Germany) a una temperatura de 105 °C con una Resolución: 0,001 g. (0.01%).

5.3.4 Actividad de agua a_W

La a_W se determinó usando el equipo lector Termohigrometro Hygrolab Rotronic (Nürnberg-Alemania).

5.3.5 Solubilidad %

La solubilidad se determinó de acuerdo con lo expuesto por Cano-Chauca *et al*. (2005), se disolvió 1 g de muestra en 100 mL de agua destilada que se mantuvo a 30±2°C, 120 rpm por 5 minutos. Luego se tomó una alícuota de 25 mL del líquido sobrenadante, se transfirió a una caja de Petri previamente pesada y se dejó en una estufa a 105°C por 5 h hasta que alcanzó peso constante. Los sólidos recuperados se pesan después del secado (*mf*) y se estimó el porcentaje de solubilidad con la diferencia de pesos mediante la ecuación de solubilidad % (Ec. 6. Pag 49).

5.3.6 Humectabilidad min

El tiempo de humectación de la panela granulada se determinó utilizando el método de humectación estática descrito por, Ceballos *et al*. (2012) y Rodríguez-Barona *et al*. (2016). Para ello, se empleó un beaker de 100 mL con dimensiones de 5 cm x 7 cm. Se colocó 1 g de microencapsulado sobre un portaobjetos ubicado encima del beaker, luego se retiró para que la muestra entre en contacto con el agua. El tiempo de humectación se expresará en minutos y se determina como el tiempo que tarda en sumergirse completamente 1 g de la muestra depositada suavemente sobre 100 mL de agua a una temperatura de 20°C.

5.3.7 Coordenadas CIEL*a*b*

La lectura de las coordenadas CieL*a*b* se realizó con el colorímetro CR-5 D65 (KONICA MINOLTA, Sensing Americans).

5.3.8 Análisis bromatológico

La determinación bromatológica se realizó en Laboratorios de Productos Lácteos y en el Laboratorio de Procesos Agrícolas de la universidad nacional de Colombia Sede Medellín. Se realizó análisis bromatológico para dos tratamientos, tto 3 con el 15% *L. reuteri* ME y con tto 5 sin adición *L. reuteri* ME. Para lo cual se determinó: humedad, cenizas, azucares totales, azucares reductores, proteína, fosforo, calcio y potasio (**Tabla 5-1**). La determinación de azucares totales, fosforo, calcio y potasio,

fueron realizados por el Laboratorio de Análisis Químicos y Bromatológico, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Tabla 5-1: Métodos para análisis bromatológico realizado a panela granulada.

Análisis	Método	Referencia
Humedad %	Gravimétrico	KERN DBS 60-3
Cenizas %	Calcinación	AOAC 900.02
Azucares totales %*	Espectrofotométrico UV-VIS	MRE-001 V09:2018
Azucares reductores %	Colorimétrico, DNS	Bello *et al*. (2006)
Proteína %	Volumétrico/ Kjeldahl	AOAC (1990) 981.10
Fósforo mg/100 g *	Espectrofotométrico UV-VIS	PRE-009 V00:2018
Calcio mg/100 g *	Espectrometría de Absorción Atómica	PRE-010 V00:2018
Potasio mg/100 g *	Espectrometría de Absorción Atómica	PRE-010 V00:2018

5.3.9 Identificación de colorantes

La presencia de colorantes en la panela se determinó con el "Método A" mencionado por la NTC 1311 (ICONTEC, 2009). Se hirvió una solución de panela junto con una tira de lana virgen. La ausencia de tinción de la lana indicó la ausencia de colorantes en la panela.

5.3.10 Pruebas microbiológicas

De acuerdo con la NTC 1311 (ICONTEC, 2009) se determinaron mohos y levaduras. Adicional, se efectuaron las pruebas microbiológicas indicadas en la **Tabla 5-2**.

Tabla 5-2: Pruebas microbiológicas realizadas a panela granulada con adición de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado.

Pruebas microbiológicas	Método	Las pruebas microbianas Peel Plate son alternativas para las pruebas de organismos indicadores. Las validaciones de terceros confirman que el método es confiable: NCIMS, AOAC y MicroVal.
Mohos y Levaduras	Peel Plate YM Microbial Test (Yeast & Mold).	
E. coli y coliformes	Peel Plate EC Microbial Test (*E. coli* & *Coliform*).	
S. aureus	Peel Plate SA Microbial Test (*Staphylococcus aureus*).	
Aeróbicos contables	Peel Plate AC Microbial Test (Aerobic Count).	

Fuente: CHARM SCIENCES INC (2021).

5.3.11 Prueba sensorial – Aceptabilidad por ordenamiento

Se llevó a cabo una prueba de aceptabilidad por ordenamiento después de un periodo de almacenamiento de 45 días a 18°C y 74% de humedad relativa. Las muestras fueron presentadas a los panelistas en orden aleatorio, en un escenario sin distracciones y con luz blanca. Se solicitó a los participantes que ordenen las muestras de acuerdo con su nivel de aceptación, asignando un valor "1" para la muestra de mayor agrado, "2" a la siguiente, continuando sucesivamente hasta llegar a "5" para la muestra de menor agrado. Se aclaró que no estaba permitido repetir valores (**Tabla 5-3**).

La prueba fue aplicada a 90 panelistas no entrenados. Las muestras fueron codificadas con números aleatorios de tres dígitos para evitar sesgos, y se presentó un volumen de 30 mL de cada tratamiento en recipientes idénticos, homogéneos en tamaño y forma. Entre cada muestra, se recomendó a los panelistas tomar agua y esperar al menos 30 segundos para evitar interferencias sensoriales entre las evaluaciones. Los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Friedman (valor $p<0.05$).

Tabla 5-3: Ficha para prueba de aceptabilidad por ordenamiento.

Prueba de aceptabilidad por ordenamiento

Nombre: _____ **Fecha:** _____

Tipo de muestra: Panela granulada

Instrucciones:

1. Reciba la bandeja con las muestras y verifique que los recipientes estén correctamente codificados con un numero de tres dígitos.
2. Pruebe cada una de las muestras.
3. Clasifique las muestras según su nivel de agrado, asignando: "1" para la muestra de mayor aceptación, "2" para la de muestra de menor aceptación, "3" para la siguiente de menor aceptación y así sucesivamente para todas las muestras.
4. Entre cada muestra, tome un sorbo de agua y espere 30 segundos antes de continuar con la siguiente muestra

Nota: No asignar el mismo valor a dos muestras.

Código: _____ _____ _____ _____ _____

Nivel asignado: _____ _____ _____ _____ _____

5.3.12 Análisis estadístico

Para determinar la estructura de covarianza adecuada para la viabilidad, humedad, a_w, solubilidad, humectabilidad y coordenadas CIEL*a*b* se ajustaron tres modelos mixtos con diferentes estructuras de correlación: Modelo de Simétrico Compuesto (mod.SC), Modelo No Estructurado (mod.UN) y Modelo Autorregresivo de Primer Orden (mod.AR1), se compararon los modelos mediante el Criterio de Información Bayesiano (BIC). Luego, se realizó Análisis de Varianza (ANOVA) de medidas repetidas y se establecieron diferencias significativas ($p<0.05$). Se usó la prueba T-Student a los análisis bromatológicos de humedad, cenizas, azucares reductores y proteína (Minitab® 19.1). El análisis sensorial se analizó con la prueba no paramétrica de Friedman y con la prueba post hoc de Wilcoxon ($p<0.05$) (IBM SPSS Statistics® 2024).

5.4 Resultados

5.4.1 Viabilidad

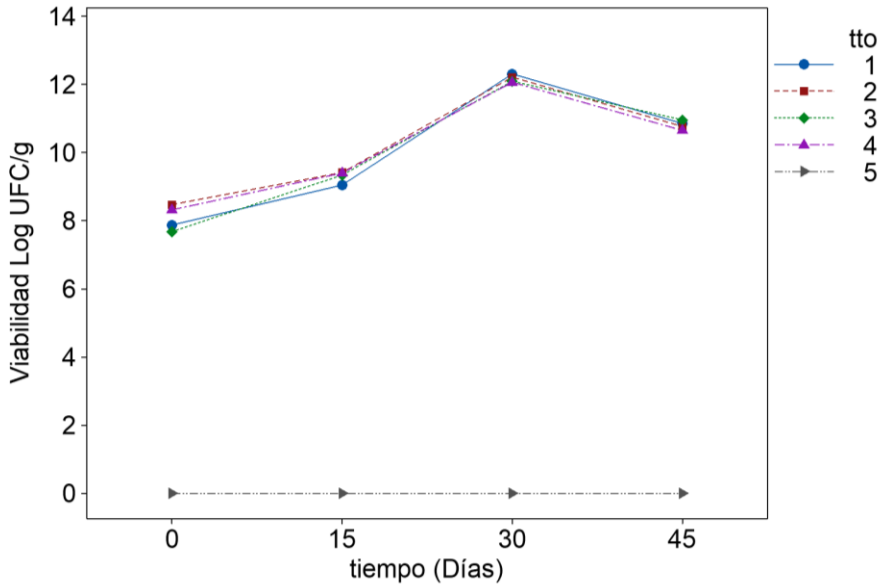
El tratamiento 5 no presentó crecimiento bacteriano. La comparación de tres estructuras de covarianza indicó que mod.AR1 al arrojar el menor BIC 281.0898, es el modelo que mejor se ajusta en comparación con Mod.SC (286.3170) y Mod.UN (282.7822) (Anexo C.2). Este resultado indica que la correlación entre mediciones disminuye sistemáticamente en el tiempo.

El ANOVA (Anexo C.3) realizado sobre Mod.AR1 indicó diferencias significativas del tto ($F=712.281$), tiempo ($F=156.976$) y tto:tiempo ($F=10.4751$) ($p<0.05$). Estas observaciones sugieren que la respuesta de viabilidad expresada en Log UFC/mL varía dependiendo del tratamiento, el tiempo evaluado y su interacción.

La **Figura 5-1** muestra el gráfico de interacción para las medias de viabilidad entre los tratamientos evaluados en el tiempo. Se observa diferencia significativa del tto 5 (control) frente y los demás, ya que este no incluye la adición de *L. reuteri* ME, como consecuencia, no se evidencia crecimiento bacteriano durante el transcurso del experimento en dicho tratamiento, por lo tanto, se procedió a repetir el análisis excluyendo los datos del tratamiento control.

Al excluir el tratamiento 5 (control) de la selección del modelo con la mejor estructura de covarianza el Mod.SC presentó el menor BIC 223.6521, por tanto, es el modelo que mejor se ajusta en comparación con Mod.UN (242.1581) y Mod.AR1 (230.8569), y supone correlación constante entre mediciones (Anexo C.4). En el ANOVA para Mod.SC (Anexo C.5), se observó que el efecto del tiempo ($F=164.333$) mostró diferencias significativas ($p<0.05$), caso contrario a tto:tiempo ($p>0.05$).

Figura 5-1: Interacción en el tiempo de medias de viabilidad (Log UFC/g) en panela granulada.

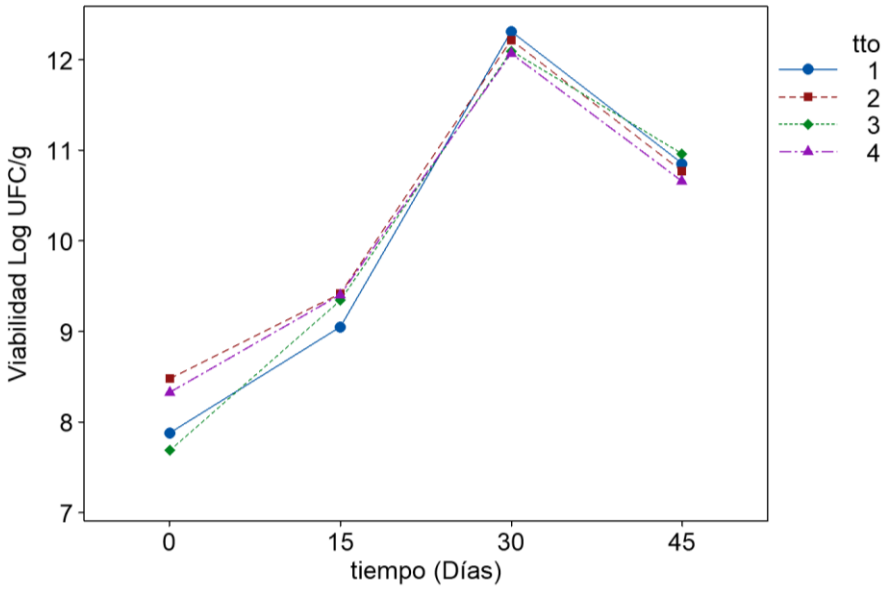


Tratamientos: tto 1 = 5% *L. reuteri* ME; tto 2 = 10% *L. reuteri* ME; tto 3 = 15% *L. reuteri* ME; tto 4 = 5% *L. reuteri* BM; tto 5 = Control.

En la **Figura 5-2** se presentan las medias de viabilidad de los tratamientos evaluados en el tiempo (tto 5 excluido). Se observa que la gráfica de viabilidad correspondiente a los tto 1, 2, 3 y 4 exhiben un comportamiento similar, caracterizado por un incremento gradual desde el día 0 hasta el día 30 (punto máximo), seguido de una disminución en el día 45.

Las pruebas de efectos principales (Anexo C.6) mostraron diferencias significativas entre los tiempos evaluados ($p<0.05$). La viabilidad de *L. reuteri* ME y en biomasa, incrementa desde el día 0 hasta el día 30 con diferencias significativas en cada punto ($p<0.005$). En el día 45 y con respecto al día 30 la viabilidad disminuye ($p<0.05$), pero aun es superior frente a los dias 0 y 15 de evaluación ($p<0.05$). La viabilidad (Log UFC/g) de *L. reuteri* ME y en BM agregado en panela granulada se ve afectado por el tiempo de almacenamiento, sin diferencias entre los tratamientos aplicados.

Figura 5-2: Interacción en el tiempo de medias de viabilidad (Log UFC/g) en panela granulada.



Tratamientos: tto 1 = 5% *L. reuteri* ME; tto 2 = 10% *L. reuteri* ME; tto 3 = 15% *L. reuteri* ME; tto 4 = 5% *L. reuteri* BM; tto 5 = Control se omite el tratamiento.

5.4.2 Humedad

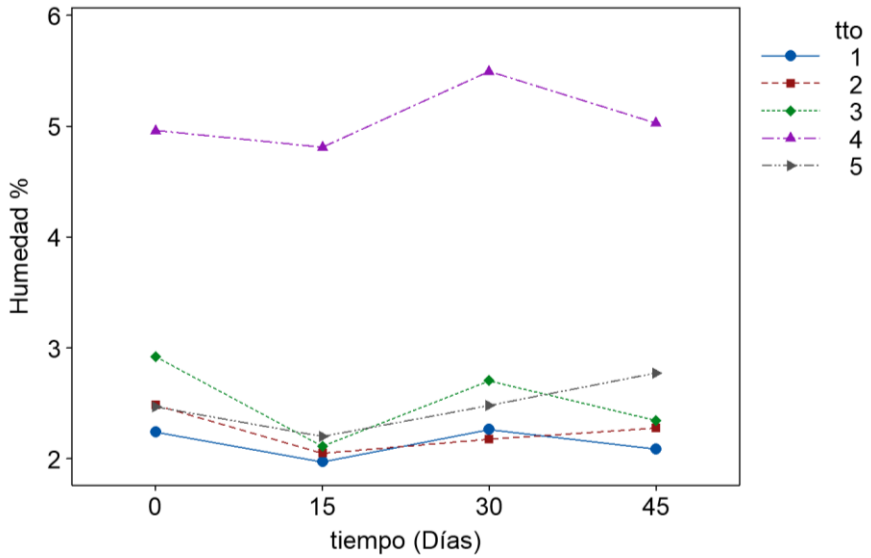
El ajuste de las tres estructuras de covarianza indicó que mod.AR1 tiene el menor BIC (-110.44), por lo tanto, es el modelo que mejor se ajusta, asume que la correlación disminuye con el tiempo (Anexo C.7). El ANOVA aplicado al mod.AR1 indicó que tanto tto (F=7678.18), como tiempo (F=477.29), y tto:tiempo (F=90.37), tienen diferencias significativas ($p<0.05$) (Anexo C.8). Las diferencias denotan que las formulaciones (tto) utilizadas para incluir el probiótico, el tiempo de evaluación y su interacción (tto:tiempo), influyen en la humedad de la panela granulada.

La **Figura 5-3** presenta la interacción de las medias de humedad % entre los tto evaluados en el tiempo. Se observan leves fluctuaciones en el periodo evaluado y no mantienen una tendencia clara de crecimiento o decrecimiento, interacción explicada por el cruce de líneas en los tratamientos 1, 2, 3 y 5.

La evaluación de efectos simples de tiempo en los tto indicó diferencias significativas ($p<0.05$) (Anexo C.9). El tto 4 presentó el valor más alto de humedad durante el periodo de evaluación. Para

el Día 0, el tto 4 (5% BM), presentó el valor de humedad más elevado, seguido por tto 3, tto 2, tto 5 y tto 1, con diferencias significativas ($p<0.05$), excepto entre las medias tto 2 - tto 5 ($p>0.05$).

Figura 5-3: Interacción en el tiempo de humedad (%) en panela granulada.



Tratamientos: tto 1 = 5% *L. reuteri* ME; tto 2 = 10% *L. reuteri* ME; tto 3 = 15% *L. reuteri* ME; tto 4 = 5% *L. reuteri* BM; tto 5 = Control.

En el día 15, el valor de a_W en los tto disminuyó, el tto 4 presentó el mayor valor de humedad, seguido por tto 5, 3, 2 y 1 sin diferencias significativas entre tto 1- tto 2; tto 2 - tto 3; tto 3 - 5 ($p>0.05$). Para día 30, los tratamientos presentaron leves incrementos de a_W con diferencia significativa ($p<0,05$). En el día 45 los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p<0.05$), excepto el tto 2 – tto 3 ($p>0.05$).

La adición de *L. reuteri* (microencapsulado o en biomasa) influyó en la humedad del producto, la biomasa incrementó la humedad, mientras que *L. reuteri* ME la estabilizó.

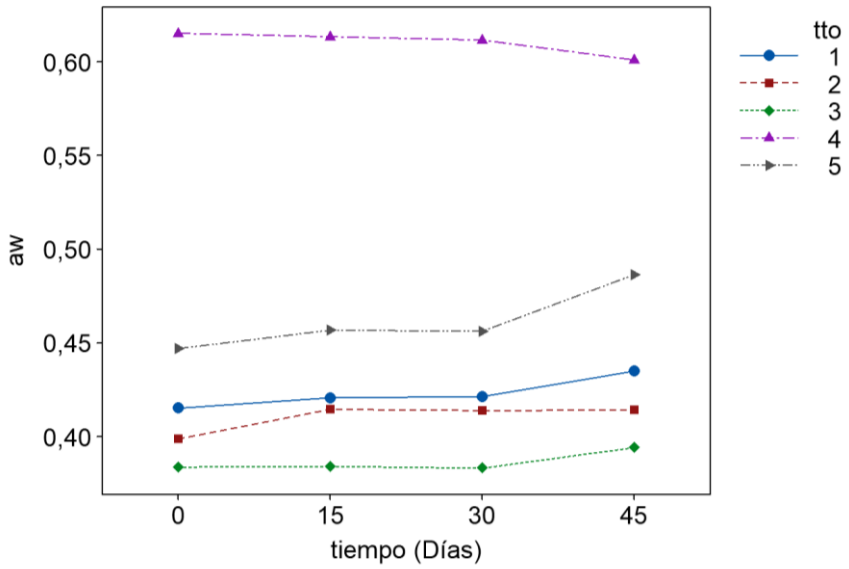
5.4.3 Actividad de agua - a_W

La comparación de los modelos para ajustar la estructura de covarianza indicó que mod.AR1 (BIC -617.05) tiene el mejor ajuste, asume que la correlación disminuye con el tiempo (Anexo C.10). El ANOVA sobre mod.AR1 (Anexo C.11) permitió identificar diferencias significativas de tto ($F=21299.9$), tiempo ($F=191.4$) e interacción tto:tiempo ($F=89.4$) ($p<0.05$). Las diferencias sugieren

que la formulación de la panela granulada, el tiempo evaluado y su interacción afectan la a_W del producto.

La comparación de medias de efectos principales en los tratamientos indicó diferencias significativas ($p<0.05$) (Anexo C.12). El tto 4 presenta la media más alta de a_W, seguido por tto 5, tto 1, tto 2 y tto 3 (**Figura 5-4**), tendencia que se mantiene en el tiempo. Estos valores sugieren que la adición de biomasa aumenta la a_W y el microencapsulado reduce estos valores en panela granulada.

Figura 5-4: Interacción en el tiempo de medias de a_w en panela granulada.



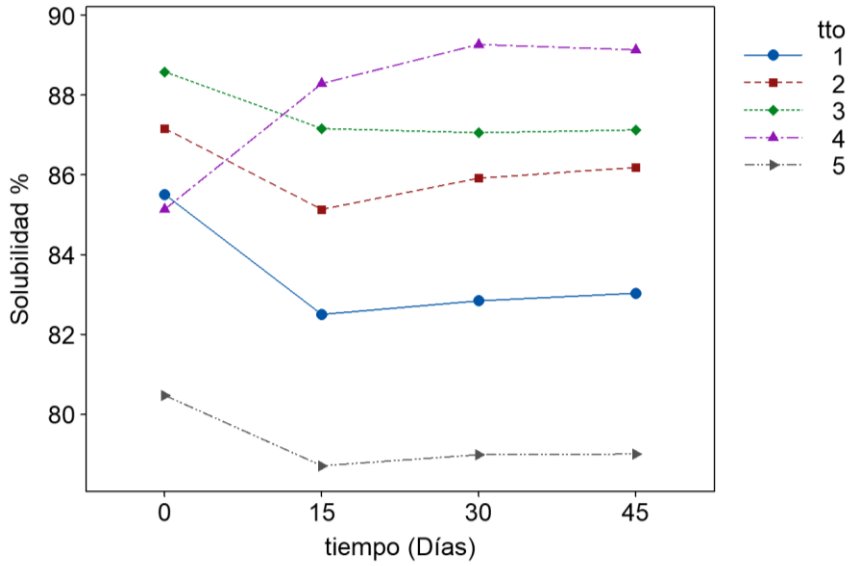
Tratamiento: tto 1 = 5% *L. reuteri* ME; tto 2 = 10% *L. reuteri* ME; tto 3 = 15% *L. reuteri* ME; tto 4 = 5% *L. reuteri* BM; tto 5 = Control.

5.4.4 Solubilidad %

La comparación de modelos para ajustar la estructura de covarianza indicó que mod.SC (BIC 249,3567) es el modelo de mejor ajuste, asume una estructura de covarianza constante entre los tiempos evaluados (Anexo C.13). El ANOVA sobre mod. SC (Anexo C.14) indicó diferencias significativas para tto ($F=1334.3$), tiempo ($F=17.3$) e interacción entre tto:tiempo ($F=33.1$) ($p<0.0001$). De acuerdo con estas diferencias, la solubilidad del microencapsulado depende del tratamiento, tiempo e interacción tto:tiempo.

En la **Figura 5-5** se presenta la interacción de medias para solubilidad (%). En general, se observa una disminución de solubilidad con el tiempo en los tratamientos tto 1, tto 2, tto 3 y tto 5, excepto en el tto 4 (5% BM) que tiende a incrementar los valores de solubilidad (%).

Figura 5-5: Interacción en el tiempo de solubilidad (%) en panela granulada.



Tratamientos: tto 1 = 5% *L. reuteri* ME; tto 2 = 10% *L. reuteri* ME; tto 3 = 15% *L. reuteri* ME; tto 4 = 5% *L. reuteri* BM; tto 5 = Control.

La evaluación de efectos simples (Anexo C.15) indicó diferencias significativas ($p<0.05$) en solubilidad (%) entre los tratamientos evaluados. En el tiempo inicial, el tto 3 presentó el valor más elevado seguido por tto 2, tto 1, tto 4 y tto 5, con diferencias significativas ($p<0.05$), excepto entre tto 1 y tto 4 ($p>0.05$). Para los dias tto 15, tto 30 y tto 45, el tto 4 presentó mayor solubilidad, seguido por tto 3, tto 2, tto 1 y tto 5 con diferencias significativas ($p<0.05$). Estas interacciones sugieren que la adición de *L. reuteri* en biomasa incrementa la solubilidad, al igual que la adición de *L. reuteri* ME frente al tto 5.

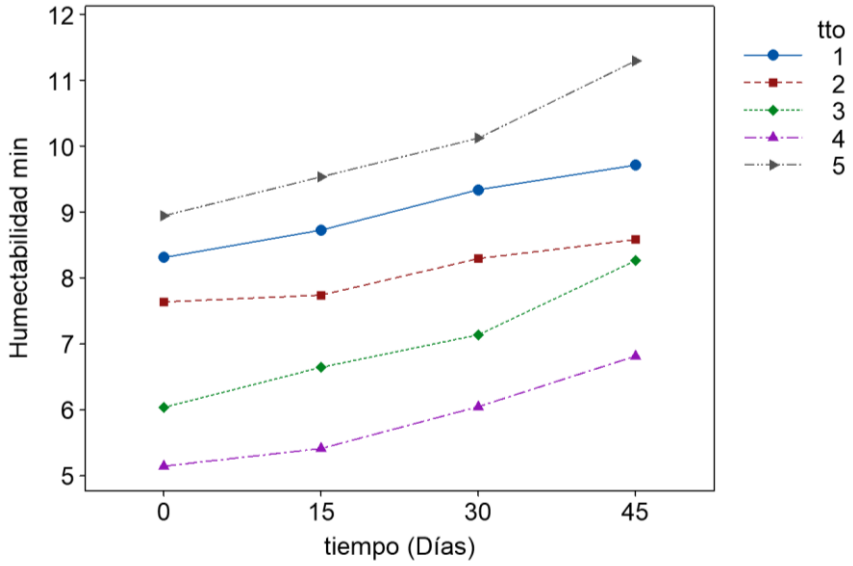
5.4.5 Humectabilidad

El ajuste de estructura de covarianza presentó el mod.AR1 (BIC 126.9743) como el modelo de mejor ajuste, asume que la correlación disminuye con el tiempo (Anexo C.16). El ANOVA sobre mod.AR1 (Anexo C.17) presenta diferencias significas, para tto (F=1124.22), tiempo (F=386.81) e

interacciones tto:tiempo (F=7.31) ($p<0.05$), descripción que siguiere que los factores mencionados y su interacción afecta la humectabilidad de la panela granulada.

En la **Figura 5-6** se presenta el grafico de interacción de medias para humectabilidad (min), se observa un incremento de la variable en el tiempo, tendencia presente para los tto evaluados. El tratamiento con menor tiempo de solubilidad es tto 4 (BM), mientras, el tratamiento con mayor tiempo de solubilidad es tto 5 (Control).

Figura 5-6: Interacción en el tiempo de humectabilidad (min) en panela granulada.



Tratamiento: tto 1 = 5% *L. reuteri* ME; tto 2 = 10% *L. reuteri* ME; tto 3 = 15% *L. reuteri* ME; tto 4 = 5% *L. reuteri* BM; tto 5 = Control.

Las pruebas de efectos simples (Anexo C.17) indicaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, donde, la mayor diferencia se presentó entre tto 4 - 5 ($p<0.05$). Además, se establecieron diferencias significativas con incrementos progresivos desde el día 0 hasta el día 45 para todos los tratamientos ($p<0.05$).

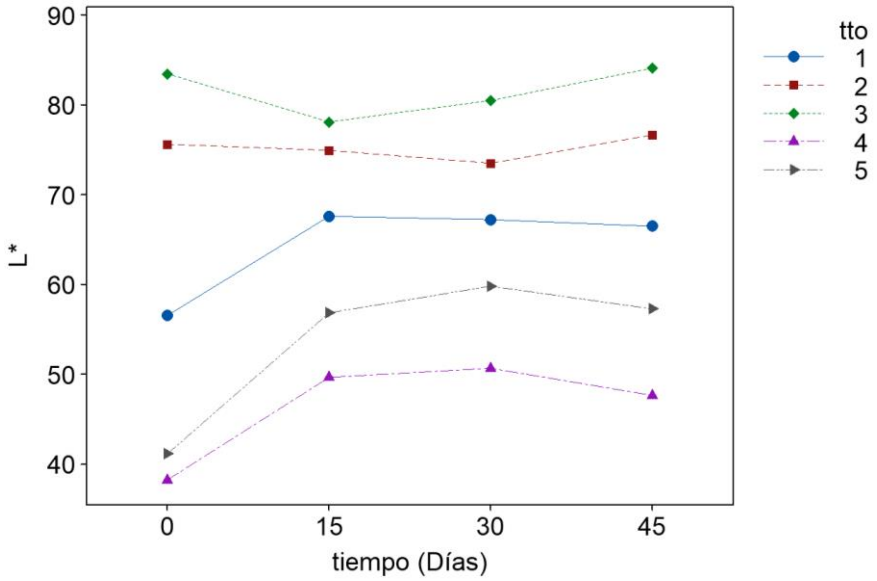
El resultado sugiere que la formulación de panela granulada con *L. reuteri* (ME o BM) incrementa los minutos de humectabilidad del producto final en el tiempo, pero es menor frente al tto control.

5.4.6 Coordenadas CIEL*a*b*

El ajuste de estructura de covarianza indicó el mod.AR1 (BIC 300.4860), como el modelo de mejor ajuste (Anexo C.19), asume que la correlación disminuye con el tiempo. El ANOVA para mod.AR1 (Anexo C.20), mostró diferencia significativa para tto (F=8097), tiempo (F=738.2) y la interacción tto:tiempo (F=231.9) ($p<0.05$). Resultado que propone efectos de tratamientos y tiempo en los valores de la coordenada L*.

La **Figura 5-7** corresponde al grafico de interacción de medias para la coordenada L*, no se contemplan tendencias generales de crecimiento o decrecimiento en el tiempo, sin embargo, se resalta que el tto 3 mostró valores elevados y el tto 4 valores menores.

Figura 5-7: Interacción en el tiempo de las coordenadas CIEL*a*b* - Coordenada L*.



Tratamiento: tto 1 = 5% *L. reuteri* ME; tto 2 = 10% *L. reuteri* ME; tto 3 = 15% *L. reuteri* ME; tto 4 = 5% *L. reuteri* BM; tto 5 = Control.

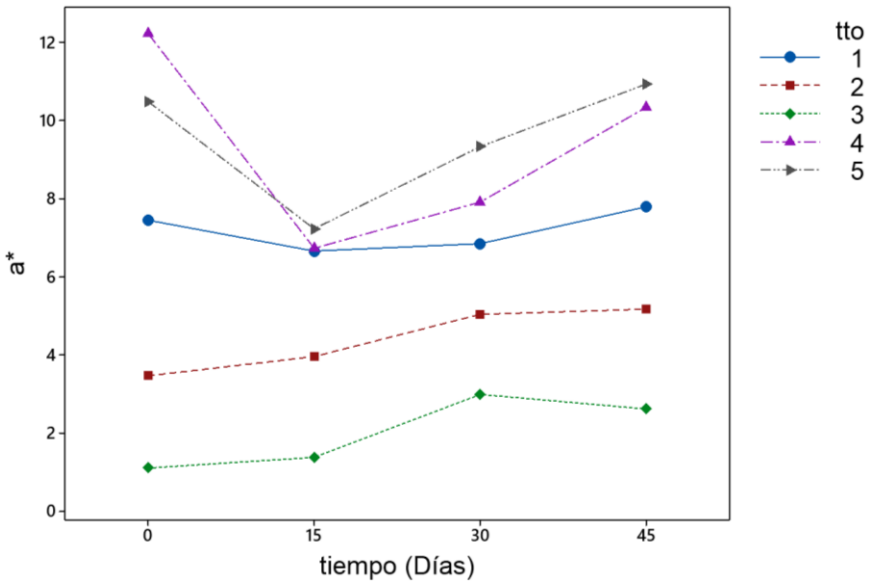
El análisis de efectos simples (Anexo C.21), indicó que para el tiempo 0 los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p<0.05$), donde el tto 3, presentó la media más alta, seguido por tto 2, tto 1, tto 4 y tto 5. Transcurrido el periodo de evaluación, el orden mencionado se mantuvo con diferencias significativas en los 4 puntos tomados. Adicionalmente, la evaluación de efectos principales de los tratamientos (Anexo C.22), confirmó diferencias significativas ($p<0.05$). Los

resultados sugieren que una mayor concentración de *L. reuteri* ME incrementa la media de la coordenada L* en comparación con el tto 5 (control) y el tto 4 (BM).

El ajuste de la estructura de covarianza para la coordenada a* presentó el mod.AR1 (204.5456) como el modelo que mejor ajusta los datos (Anexo C.23) asume que la correlación disminuye con el tiempo. El ANOVA aplicado para mod.AR1 (Anexo C.24), mostró diferencias significativas para tto (F=1409.485), tiempo (F=169.875), y su interacción tto:tiempo (F=58.44) ($p<0.05$), el análisis sugiere que tratamiento, tiempo y la interacción entre los dos factores, afectan la coordenada a*.

En la **Figura 5-8** se ilustra la interacción de las medias para la coordenada a*, donde, no se observan tendencias claras de las medias en el tiempo. Sin embargo, destacan tto 4 y 5 con los valores más altos en comparación con tratamientos 1, 2 y 3.

Figura 5-8: Interacción en el tiempo de las coordenadas CIEL*a*b* - Coordenada a*.



Tratamiento: tto 1 = 5% *L. reuteri* ME; tto 2 = 10% *L. reuteri* ME; tto 3 = 15% *L. reuteri* ME; tto 4 = 5% *L. reuteri* BM; tto 5 = Control.

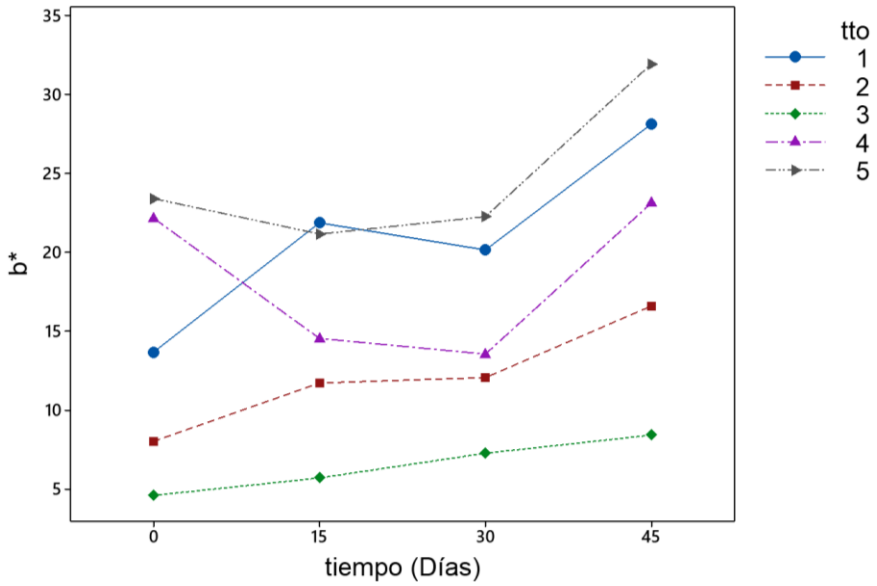
La evaluación de efectos simples (Anexo C.25), mostró diferencias significativas entre tto en el día 0, con el valor más alto registrado en el tto 4, seguido por tto 5, 1, 2 y 3 ($p<0.05$). Para el día 15, el tto 5 presentó el valor más alto, seguido por el 4 y 1, sin diferencias significativas entre ellos ($p>0.05$), pero si frente a tto 2 y tto 3 ($p<0.05$). En los días 30 y 45 se mantuvo el mismo orden con

diferencias significativas ($p<0.05$). Las medias de la coordenada a* para cada tratamiento indican que el tto 4 es el valor más elevado, seguido por tto 5, 1, 2 y 3 ($p<0.05$). Estos resultados indican que la biomasa añadida incrementa la media de a*, y el ME a mayores concentraciones reduce este valor.

El ajuste de la estructura de covarianza para la coordenada b* presentó el mod.AR1 (BIC 300.7990), como el modelo de mejor ajuste, asume que la correlación disminuye con el tiempo (Anexo C.26). El ANOVA aplicado al mod.AR1 (Anexo C.27), indicó que tanto tto ($F=1561.647$) como el tiempo ($F=820.408$) y su interacción tto:tiempo ($F=137.086$) tienen diferencia significativa ($p<0.05$). Esto indica que la coordenada b* varía significativamente según el tto aplicado, el tiempo de almacenamiento y la interacción entre ambos factores.

La **Figura 5-9** presenta el grafico de interacción de medias para la coordenada b*. En esta figura no se observan tendencias claramente definidas y las líneas correspondientes a cada tto presentan intersecciones. No obstante, los tto 5 y 1 tienen valores más elevados, mientras que el tto 3 tiene el valor más bajo frente a los demás tto.

Figura 5-9: Interacción en el tiempo de las coordenadas CIEL*a*b* - Coordenada b*



Tratamiento: tto 1 = 5% *L. reuteri* ME; tto 2 = 10% *L. reuteri* ME; tto 3 = 15% *L. reuteri* ME; tto 4 = 5% *L. reuteri* BM; tto 5 = Control.

La evaluación de efectos simples (Anexo C.28) indicó diferencias significativas ($p<0.05$) en la coordenada b* entre los tto en el tiempo. En el tiempo 0 el tto 5 presentó el valor más alto de la coordenada b*, seguido por tto 4, tto 1, tto 2 y tto 3, con diferencias significativas ($p<0.05$).

En el día 15, los tto 5 y 1 mostraron los valores más altos de b*, sin diferencia significativa entre sí ($p>0.05$), pero con diferencias significativas frente a tto 4, tto 2 y tto 3 ($p<0.05$). Para los dias 30 y 45 se mantuvieron las diferencias significativas entre los tto ($p<0.05$), el tto 5 presentó el valor b* más alto, seguido por tto 1, tto 4, tto 2 y tto 3. Estos resultados sugieren que entre los tratamientos con adición de *L. reuteri* ME, una mayor concentración reduce la media de b*.

5.4.7 Análisis bromatológico

En la **Tabla 5-4** se presentan los resultados del análisis bromatológico realizado a tto 3 con 15% de *L. reuteri* ME y tto 5 (control). Datos que se comparan con los valores de la NTC 1311, norma que establece los requisitos y los ensayos que debe cumplir la panela destinada para el consumo humano. Los tto estudiados cumplen con los requisitos establecidos en la NTC 1311 para todos los compuestos determinados en la investigación.

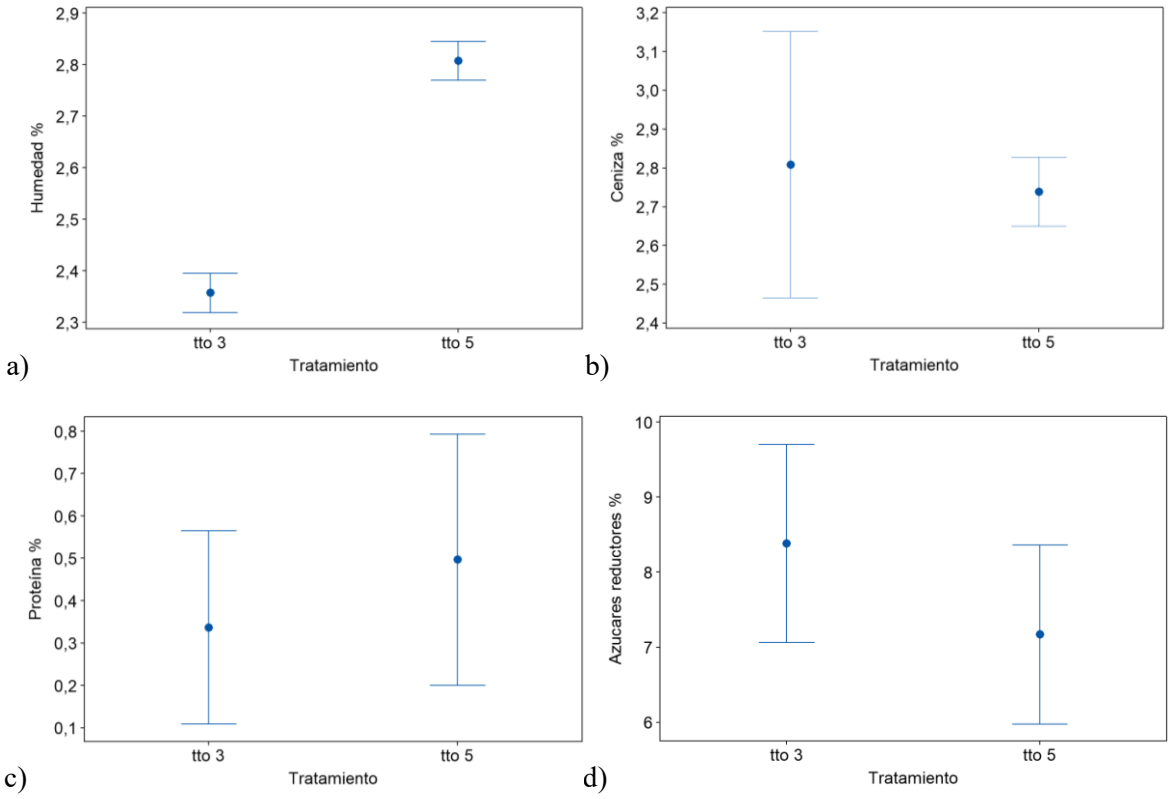
Tabla 5-4: Análisis bromatológico de panela granulada con adición de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado (15%) y control.

Análisis	Resultados		Requisitos NTC 1311
	tto 3 *L reuteri* ME	tto 5 Control	
Humedad %	2.36±0.01[a]	2.80±0.01[b]	Max 5.0
Cenizas %	2.81±0.13[c]	2.74±0.04[c]	Min 1.0
Azucares totales %	80.94	79.59	Max 93.0
Azucares reductores %	8.38±0.53[c]	7.17±0.48[c]	Min 5.0
Proteína (N x 6.25) %	0.34±0.05[c]	0.49±0.12[c]	Min 0.2
Potasio mg/100 g	1020	910	Min 100.0
Calcio mg/100 g	150	140	Min 10.0
Fosforo mg/100 g	867	760	Min 5.0

Letras diferentes en filas indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

La prueba T-Student aplicada a los análisis bromatológicos indica diferencia significativa entre tto para humedad % ($p<0.05$) (**Figura 5-10**). Sin embargo, no muestra diferencias significativas para cenizas, azucares reductores y proteína los tratamientos ($p>0.05$) (**Tabla 5-4** y Anexo C.28)

Figura 5-10: Intervalos de los tratamientos evaluados tto 3 y tto 5: a) humedad %. b) ceniza %. c) Proteína% y d) Azucares reductores %.



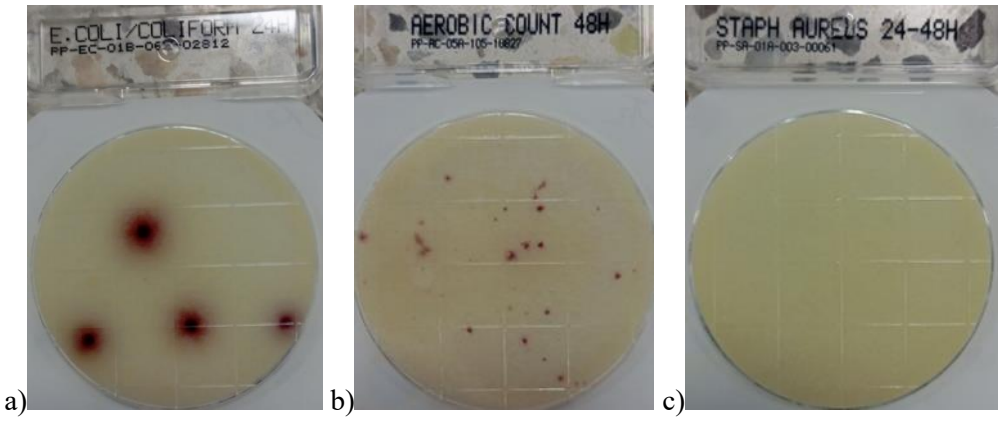
5.4.8 Identificación de colorantes y pruebas microbiológicas

En la **Tabla 5-5** se presentan resultados para identificación de colorantes y pruebas microbiológicas para tto 3 y 5, siendo negativos para colorantes, *E. coli*, *S. aureus* y recuentos bajos para mohos y levaduras, coliformes y aeróbicos contables (**Figura 5-11**).

Tabla 5-5: Análisis de identificación de colorantes y pruebas microbiológicas.

Pruebas	Resultado	
	tto 3 *L. reuteri* ME	tto 5 Control.
Colorantes	Ausencia	Ausencia
Mohos y Levaduras	24 UFC/g	37 UFC/g
Coliformes	63 UFC/g	84 UFC/g
E. coli	Negativo	Negativo
S. aureus	Negativo	Negativo
Aeróbicos contables	243 UFC/mL	210 UFC/mL

Figura 5-11: Pruebas microbiológicas Peel Plate EC Microbial: a). Test *E. coli* & Coliform, b). Test Aeróbicos contables, c). Test *Staphylococcus aureus*.



a) b) c)

5.4.9 Prueba sensorial – Aceptabilidad por ordenamiento

En la **Tabla 5-6** se presenta el resumen de estadísticos descriptivos y la sumatoria total para cada tratamiento asignado por los panelistas. En orden ascendente, los tratamientos tto 1 y tto 5 tienen la menor puntuación, seguido por tto 4, tto 2 y tto 3. La prueba de Kolmogórov-Smirnov indica que tratamientos no cumplen con el puesto para normalidad, por lo tanto, se aplicó la prueba de Friedman (Anexo C.29).

En la Anexo C.31 se presenta el resumen de la prueba de Friedman, los resultados indicaron diferencias significativas en la aceptación sensorial entre los tratamientos ($p<0.05$). El estadístico

post hoc de Wilcoxon presentó diferencias significativas entre tres subconjuntos de tto ($p<0.05$) (**Tabla 5-6** y Anexo C.32). a) tto 1 y tto 5 tienen alta aceptación. b) tto 4 y 2 aceptación media. c) tto 3 menor aceptación.

Tabla 5-6: Media, mediana y sumatoria de niveles asignados a cada tratamiento.

Tratamiento	Media	Sumatoria total	Aceptación
tto 1[a]	2,3	207	Alta
tto 2[b]	3,3	297	Media
tto 3[c]	4	360	Baja
tto 4 [b]	3,1	280	Media
tto 5[a]	2,3	206	Alta

5.5 Discusión

5.5.1 Evaluación de estabilidad durante el almacenamiento de una panela granulada adicionada con *Limosilactobacillus reuteri*

Los resultados de viabilidad de *L. reuteri* microencapsulado (ME) en panela granulada muestran un comportamiento dinámico durante los 45 días de almacenamiento (15 °C, 85% HR, bolsas Doypack PET-(PA-PE)). Los tratamientos con *L. reuteri* ME (tto 1: 5%, tto 2: 10%, tto 3: 15%) y biomasa (tto 4: 5%), presentaron un incremento significativo en la viabilidad desde el día 0 hasta el día 30, seguido de una ligera disminución hacia el día 45 (Figura 13). Patrón que sugiere el secado por aspersión con el material pared MD:IN como estrategia de protección durante el almacenamiento y como conservante de la actividad metabólica del probiótico en el producto.

La humedad de la panela granulada se mantuvo en niveles seguros (2.242 ± 0.047 a 5.500 ± 0.026 %), y la a_W permaneció por debajo de 0.615 ± 0.002, valores que limitan el crecimiento de microorganismos y reacciones indeseables (Fennema *et al*., 2017). Sin embargo, el tto 4 (5% BM) mostró valores de humedad y a_W significativamente más altos, dicho comportamiento establece que la adición de biomasa incrementa humedad y a_W, en complemento, el material encapsulante MD:IN

se relaciona con la estabilidad del producto final en términos de estos parámetros. La a_W disminuyó significativamente con el incremento de *L. reuteri* ME en la panela granulada.

Los tratamientos con *L. reuteri* ME (tto 1, 2 y 3), mostraron una solubilidad mayor con el incremento de la concentración del probiótico encapsulado (85.506 ± 0.397 a 88.578 ± 0.406 %) en comparación con el tto 5 (80.460 ± 0.492%), la adición de *L. retureri* ME mejora la dispersión del producto en medios acuosos por las propiedades del material encapsulante MD:IN (bajo peso molecular, alta solubilidad y estructura porosa). Por otra parte, el incremento de solubilidad del tto 4 (89.132 ± 0.339) se relaciona con la adición de *L. reuteri* libre, el contenido de humedad y a_W que promueven la liberación de compuestos hidrofílicos (proteínas y exopolisacáridos) que reducen la tensión superficial. Adicionalmente, la ausencia de una matriz encapsulante permite una interacción directa de la biomasa con los componentes de la panela.

En los tratamientos evaluados, la humectabilidad incrementa progresivamente (5.136 ± 0.159 hasta 11.300 ± 0.291 min), reacción que se ve influenciada por la adición de *L. reuteri* ME y biomasa en comparación con el tto 5. La microencapsulación ofrece resistencia a la humectabilidad por la matriz encapsulante MD:IN, mientras la maltodextrina limita la interacción inicial con el agua por su estructura con característica vítrea, la inulina forma redes, estabiliza la matriz y retrasa la plastificación por humedad. Por otra parte, la biomasa libre mejora la rapidez de rehidratación causado posiblemente por la lisis celular, liberación de compuestos intracelulares modificando la hidrofobicidad de la superficie.

Chand *et al*. (2014), reportaron reducciones de humedad para panela en bloque de 10.67 a 8.466 % y de 9.95 a 8.16 % para panela convencional y recubierta con proteína de suero concentrada, durante un periodo de almacenamiento de 6 meses, según los autores, esto puede deberse a la formación de una película gruesa a base de proteínas que reduce el oxígeno y el contenido de humedad. De igual forma, Asfaq & Chand (2020) reportan valores de 0.577 a 0.669 para panela en bloque. Resultados mayores a los presentados en la presente investigación, a excepción de los resultados de a_W para el el tratamiento con 5 % de biomasa. Por otra parte, Verma *et al*. (2019b), mencionan que a menor humedad y a_W, en panela granula, se mejora la estabilidad del producto y se prolonga su vida útil, además, reportan datos para humedad de panela granulada entre 3.9 a 4.6 %, cercanos a los obtenidos en esta investigación con adición del probiótico microencapsulado y el tratamiento control.

Angnunavuri *et al*. (2022), formularon chocolates con leche y adición de *L. acidophilus*. En sus estudios, evaluaron la viabilidad del probiótico durante 90 días de almacenamiento a 4 y 25 °C. Los resultados mostraron que la viabilidad inicial para los tratamientos fue de 8.85 Log UFC/g. A 4 °C, esta viabilidad se redujo hasta 8 Log UFC/g al finalizar el periodo de almacenamiento, mientras que a 25 °C no se observó crecimiento a partir de los 60 días. Además, se midieron valores de a_W en los chocolates con la adición de *L. acidophilus* en estado libre, encontrándose rangos de 0.41 ± 0.00 a 0.49 ± 0.01; en contraste, el tratamiento control (sin la cepa) presentó un cambio de 0.37 ± 0.01 a 0.44 ± 0.03 a 4 °C en el mismo periodo. Los autores sugieren que el chocolate de control mostró valores de a_W más bajos, lo cual podría atribuirse al uso de pellets bacterianos recuperados de un medio líquido, y enfatizan que valores altos de a_W están asociados a una disminución en la viabilidad del probiótico.

Del mismo modo, Nebesny *et al*. (2007), suplementaron chocolate negro con cepas de *Lactobacillus* liofilizadas en leche. Durante 12 meses de almacenamiento a 18 °C, reportaron que la supervivencia de *L. casei* y *L. paracasei* disminuyó de 9.897 Log UFC/g hasta alcanzar rangos finales entre 7.556 y 7.763 Log UFC/g. Asimismo, se observaron valores de a_W que oscilaron entre 0.118 ± 0.01 y 0.20 ± 0.01. Según los autores, la supervivencia se debe al ambiente anaeróbico interior de la cápsula y el bajo contenido de humedad, que mantiene la a_W en un rango que impide las reacciones de deterioro, protegiendo así a las cepas lácticas.

Sharifi *et al*. (2021), microencapsularon *L. plantarum* y evaluaron su estabilidad en queso blanco durante 90 días de almacenamiento a 4 °C. Durante este periodo, se observó una disminución en la viabilidad de *L. plantarum*, tanto en forma libre como encapsulada, llegando a 6.44 Log UFC/g después de 61 días. Sin embargo, al final del almacenamiento, la población de probióticos microencapsulados alcanzó 7.95 Log UFC/g, y la coencapsulada con fitoesteroles, 8.14 Log UFC/g. Los autores destacaron que la viabilidad del probiótico se ve influida por factores como un pH bajo, la presencia de oxígeno, la competencia con el cultivo iniciador, la presencia de sal (cloruro de sodio), la baja temperatura y el tiempo de almacenamiento.

Marcial-Coba *et al*. (2019), analizaron el chocolate negro como matriz portadora de *Akkermansia muciniphila* y *L. casei* microencapsulados. Durante 60 días de almacenamiento a 4 y 15 °C, se observó que la viabilidad para *L. casei* se mantuvo estable, con una concentración inicial de 9.23 Log UFC/g que finalizó en 9.29 Log UFC/g. La a_W reportada fue de 0.27 ± 0.02 al día 0,

disminuyendo a 0.24 ± 0.02 (4 °C) y 0.21 ± 0.01 (15 °C) al día 60. Por otra parte, la carga bacteriana inicial de *A. muciniphila* disminuyó de 7.87 Log UFC/g (4 y 15 °C) a 7.24 Log UFC/g (4 °C) y 7.00 Log UFC/g (15 °C) y la a_W inicial fue de 0.26 ± 0.02, reduciéndose a 0.23 ± 0.04 (4 °C) y 0.24 ± 0.02 (15 °C) al final del almacenamiento. Estos autores mencionaron que la combinación de biopolímeros y chocolate negro es efectiva para mantener la estabilidad de *L. casei*, mientras que *A. muciniphila* presentó mayor sensibilidad.

5.5.2 Coordenadas CIEL*a*b*

Los resultados obtenidos demuestran que la incorporación de *L. reuteri* microencapsulado (ME) en panela granulada, utilizando maltodextrina:inulina (MD:IN) como matriz encapsulante, influye significativamente en las coordenadas L* (luminosidad), a* (rojo-verde) y b* (azul-amarillo) durante el almacenamiento. El análisis estadístico confirmó efectos significativos ($p<0.05$) del tratamiento, tiempo e interacción tto:tiempo , lo que sugiere que L*, a* y b* se ven afectados por estos factores.

Los tratamientos con ME (tto 1, tto 2 y tto 3) mostraron una relación directa entre la concentración del probiótico y los valores de L*, donde, las concentraciones con mayores ME (15%) incrementaron los valores de la coordenada. Este comportamiento podría atribuirse al efecto de la matriz encapsulante MD:IN, que incrementa la luminosidad del producto, similar a la descripción realizada por Delgado & Bañón (2018) y Mahdavee Khazaei *et al*. (2014), quienes inciden en que maltodextrina e inulina aumentan la luminosidad del producto formulado.

La inclusión de *L. reuteri* ME en panela granulada modula significativamente la coordenada a*, evidenciando que concentraciones mayores de ME (15 %) reducen la intensidad de tonalidades rojizas. El tto 3 (15% ME) registró los valores más bajos de a* en todos los puntos en el tiempo, contrastando con el tto 4 (5% BM) y tto 5 (control), que presentaron las medias más elevadas.

Los tratamientos con ME mostraron una relación inversa entre la concentración del probiótico y los valores de b*. Esta reducción de la coordenada b* con mayores concentraciones de ME sugiere que la matriz encapsulante MD:IN disminuyó tonalidades amarillas en el producto. El tto4 (biomasa libre) mostró fluctuaciones notables, por otra parte, el tto 5 exhibió un aumento progresivo de b*, que se interpreta en tonalidades propias de la panela. Las coordenadas b* y a* posiblemente se

reducen con el incremento de la luminosidad, efecto por la matriz de encapsulación MD:IN (Delgado & Bañón, 2018; Mahdavee Khazaei *et al*., 2014).

Upadhyaya *et al*. (2023), reportaron las coordenadas CIEL*a*b* de panela en bloque de la siguiente forma; L* 11.8 ± 2.1, a* 1.6 ± 0.4, b* 12.7 ± 1.6 y con adición de clarificador, los resultados variaron a: L* 62.6 ± 6.3 a* 4.6 ± 0.3 b* 11.2 ± 1.8. Además, mencionaron que la tonalidad de la panela es el resultado de las diferentes temperaturas de calentamiento en el proceso de obtención. De igual forma, Solís-Fuentes *et al*. (2019b) reportan valores de CIEL*a*b* para panela comercial de: L* 57.5 ± 0.1, a* 5.1 ± 0.1 y b* 32.9 ± 0.1, expresaron que la panela varía su color dependiendo de la materia prima utilizada, variedad de caña de azúcar, condiciones agroecológicas y el proceso de elaboración, además, indican que compuestos como azucares reductores, polifenoles, azucares totales, las proteínas y el hierro son factores que también afectan el color.

Mahdavee Khazaei *et al*. (2014) dieron a conocer variaciones en las coordenadas CIEL*a*b* tras microencapsular con maltodextrina (DE 7 y DE 20) y almacenar a 35 °C. Para la maltodextrina DE 7, observaron una disminución en la luminosidad L*, pasando de 64.54 (día 0) a 60.21 (día 70), mientras que la coordenada a* aumentó de 22.11 a 22.96, y la coordenada b* varió de -5.62 a -6.17 en el mismo periodo. En el caso de la maltodextrina DE 20, se registró una reducción en L* 56.95 (día 0) a 51.82 (día 70), un incremento en a* de 37.73 (día 0) a 39.91 (día 70), al igual en la coordenada b* de 8.56 a 9.18. Los autores destacan que las maltodextrinas tienden a incrementar la luminosidad después del secado por aspersión y con ello, la disminución de la intensidad en las coordenadas a* y b*, generando un producto con un perfil de color claro o pálido, similar a los resultados reportados en la presente investigación.

5.5.3 Análisis bromatológico

Los resultados del análisis bromatológico de la panela granulada con inclusión de *L. reuteri* microencapsulado (ME) (tto 3: 15%) y tratamiento control (tto 5) cumplen con los requisitos establecidos en la NTC 1311 (ICONTEC, 2009) para consumo humano, que valida su calidad e inocuidad. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en parámetros clave, como la humedad, que sugieren efectos específicos de la microencapsulación en las propiedades fisicoquímicas del producto.

La ausencia de diferencias significativas en cenizas, azúcares reductores y proteína ($p>0,05$) sugiere que la adición de *L. reuteri* ME no altera significativamente la composición nutricional de la panela. Por otra parte, la humedad en el tto 3 (2,36 ± 0.01 %) fue significativamente menor ($p<0,05$) que en el tto 5 (2,80 ± 0.01 %), pero similar a los valores reportados por (Verma *et al*., 2019b). Efecto que se atribuye a las propiedades de la matriz encapsulante MD:IN (Fennema *et al*., 2017; Fritzen-Freire *et al*., 2012).

5.5.4 Identificación de colorantes y pruebas microbiológicas

Los resultados de las pruebas microbiológicas y de identificación de colorantes en la panela granulada con inclusión de *L. reuteri* microencapsulado (ME), al 15% (tto3), y control (tto 5), demuestran que ambos tratamientos cumplen con los requisitos establecidos en la ICONTEC (2009), destacando la ausencia de patógenos y colorantes artificiales.

La no detección de colorantes artificiales en ambos tratamientos (tto 3 y tto 5) refuerza la naturalidad del producto y su alineación con las tendencias de consumo hacia alimentos libres de aditivos sintéticos. El color de la panela granulada se deriva de pigmentos naturales como los polifenoles y melanoidinas formadas durante el procesamiento térmico, Kumar & Singh (2020b).

5.5.5 Prueba sensorial – Aceptabilidad por ordenamiento

La evaluación sensorial mediante la prueba de Friedman mostró diferencias significativas ($p < 0.05$). El tratamiento con menor adición de probiótico tto 1 (5 % ME) y tto 5 (control), presentaron la mayor aceptación, el resultado sugiere que las concentraciones bajas de *L. retueri* ME no alteran significativamente las propiedades sensoriales, mientras que el control, al carecer de ME, mantiene el perfil tradicional del producto. Sin embargo, el tto 3 (15 % ME) registró la menor aceptación, causado posiblemente por los cambios de perfil sensorial asociados con una mayor concentración del material encapsulante (MD:IN). Finalmente, los tto 4 y tto 2 presentaron una aceptación intermedia, indicando que la biomasa libre y las concentraciones moderadas de ME introducen cambios perceptibles pero tolerables.

Angnunavuri *et al*. (2022), reportaron que la adición de *L. acidophilus* en chocolate no alteró significativamente las propiedades sensoriales frente al control, evaluado por 50 panelistas no entrenados. Este resultado coincide con Nebesny *et al*. (2007), donde chocolates con *L. casei* y *L.*

paracasei mantuvieron características sensoriales similares a las muestras no inoculadas, incluso con panelistas entrenados. Por otra parte, Marcial-Coba *et al*. (2019), observaron puntuaciones más bajas en muestras con microcápsulas, destacaron que estas diferencias no fueron significativas, respaldando que la inclusión de probióticos no compromete radicalmente la aceptabilidad. En complemento, Chand *et al*. (2014), evaluaron sensorialmente panela en bloque y recubierta con proteína de suero concentrado, indicando que las muestras con recubierta tienen menos aceptabilidad general en comparación con la muestra de control.

5.6 Conclusiones y recomendaciones

5.6.1 Conclusiones

La incorporación de *L. reuteri* microencapsulado (ME) mantiene la estabilidad durante el almacenamiento del producto final, los tratamientos con mayores concentraciones de ME presentaron niveles de humedad estable y reducción de actividad de agua (a_W), parámetros críticos que limitan el crecimiento microbiano y favorecen la integridad del alimento. Los análisis de solubilidad y humectabilidad indicaron que la matriz MD:IN facilita una dispersión óptima del producto en medios acuosos y retrasa la penetración de agua, lo cual contribuye a mantener la calidad y prolongar la vida útil de la panela granulada durante el periodo evaluado. Además, el análisis de color con coordenadas CIEL*a*b* y la prueba sensorial de ordenamiento indican que concentraciones altas de microencapsulado incrementan la luminosidad y reducen la aceptabilidad del producto.

5.6.2 Recomendaciones

Ampliar el periodo de almacenamiento, evaluando la estabilidad de *L. reuteri* y la evolución de los parámetros fisicoquímicos (humedad, actividad de agua, solubilidad y humectabilidad) en condiciones de vida útil aceleradas.

Se sugiere estudiar el proceso para adicionar probióticos microencapsulados en panela granulada con el fin de asegurar la integridad de las microcápsulas, evaluando diferentes temperaturas de la panela al momento de agregar los microrganismos.

5.7 Bibliografía

Akbarbaglu, Z., Peighambardoust, S. H., Sarabandi, K., & Jafari, S. M. (2021). Spray drying encapsulation of bioactive compounds within protein-based carriers; different options and applications. In *Food Chemistry* (Vol. 359). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129965

Angnunavuri, P. N., Attiogbe, F., & Mensah, B. (2022). Effect of storage on the levels of phthalates in high-density polyethylene (HDPE) film-packaged drinking water. *Science of The Total Environment*, *845*, 157347. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157347

AOAC. (1990). *OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS* (Fifteenth).

Asfaq, & Chand, K. (2020). Effect of Moisture Absorber and High-Density Polyethylene Bags on Shelf Life of Edible Coated Jaggery Cubes During Storage. *Sugar Tech*, *22*(6), 1130–1137. https://doi.org/10.1007/s12355-020-00849-4

Bello, D., Carrera, E., & Díaz, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, *2*, 45–50. https://doi.org/https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006

Beltrán Martínez, C. (2020). *EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA GESTIÓN DE LOS RESIDUOS DE LA PRODUCCIÓN PANELERA (CACHAZA) EN LA VEREDA NACEDEROS MUNICIPIO DE QUEBRADANEGRA-CUNDINAMARCA*. www.ucundinamarca.edu.co

Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., & Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *6*(4), 420–428. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003

Ceballos, A. M., Giraldo, G. I., & Orrego, C. E. (2012). Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *J Food Eng*, *111*(2), 360–365. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2012.02.010

Chand, K., Verma, A. K., Kumar, A., & Shahi, N. C. (2014). Effect of Edible Coating on Quality Parameters of Jaggery During Storage. *Sugar Tech*, *16*(1), 80–85. https://doi.org/10.1007/s12355-013-0244-7

CHARM SCIENCES INC. (2021). *Charm ® Peel Plate ® Microbial Tests Family Brochure "Charm Peel Plate Microbial*. https://www.charm.com/wp-content/uploads/2022/09/MRK-1052_email.pdf

Delgado, P., & Bañón, S. (2018). Effects of replacing starch by inulin on the physicochemical, texture and sensory characteristics of gummy jellies. *CyTA - Journal of Food*, *16*(1), 1–10. https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1327462

Essa, M. M., Bishir, M., Bhat, A., Saravana, C., Al-Balushi, B., Hamdan, H., Govindarajan, N., Freidland, R., & Walid Qoronfleh, M. (2023). Functional foods and their impact on health. *Journal of Food Science and Technology*, *60*(3). https://doi.org/10.1007/s13197-021-05193-3

Fennema, O., Damodaran, S., & Parkin, K. (2017). *Fennema´s Food Chemistry* (Fifth). Taylor & Francis Group. https://lccn.loc.gov/2016027062

Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Res Int*, *45*(1), 306–312. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.09.020

Gupta, E., Mishra, P., Mishra, N., Singh, P., & Sheikh, A. (2023). Topic: Utilization of fruit peel for the development of functional fruit peel bar. *Food Chemistry Adv*, *2*(June 2022), 0–5. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100310

ICONTEC. (2009). Productos Agrícolas Panela. In *Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación* (NTC 1311).

Karasawa, M. M. G., & Mohan, C. (2018). Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review. *Natural Products and Bioprospecting*, *8*(5), 335–346. https://doi.org/10.1007/s13659-018-0186-6

Kumar, A., & Singh, S. (2020). The benefit of Indian jaggery over sugar on human health. *Dietary Sugar, Salt and Fat in Human Health*, 347–359. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816918-6.00016-0

Mahdavee Khazaei, K., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Hemmati Kakhki, A. (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers*, *105*(1), 57–62. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.042

Marcial-Coba, M. S., Saaby, L., Knøchel, S., & Nielsen, D. S. (2019). Dark chocolate as a stable carrier of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus casei* . *FEMS Microbiology Letters*, *366*(2). https://doi.org/10.1093/femsle/fny290

Morales-Ramos, V., Osorio-Mirón, A., & Rodríguez-Campos, J. (2017). Innovaciones En El Trapiche Panelero: La Producción De Panela Granulada. *Agro Productividad*, *10*(11), 41–47. https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/67

Nebesny, E., Żyżelewicz, D., Motyl, I., & Libudzisz, Z. (2007). Dark chocolates supplemented with Lactobacillus strains. *European Food Research and Technology*, *225*(1), 33–42. https://doi.org/10.1007/s00217-006-0379-9

Ramírez, N. F., Keefe, G., Dohoo, I., Sánchez, J., Arroyave, O., Cerón, J., Jaramillo, M., & Palacio, L. G. (2014). Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy

farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *J Dairy Sci*, *97*(7), 4141–4150. https://doi.org/10.3168/JDS.2013-6815

Rasane, P., Jha, A., & Sharma, N. (2015). Predictive modelling for shelf life determination of nutricereal based fermented baby food. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(8), 5003–5011. https://doi.org/10.1007/s13197-014-1545-x

Rodríguez-Barona, Sneyder., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebioticos. *Información Tecnológica*, *27*(6), 135–144. https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014

Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of Lactobacillus paracasei by spray freeze drying. *Food Research International*, *43*(1), 193–202. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.028

Sharifi, S., Rezazad-Bari, M., Alizadeh, M., Almasi, H., & Amiri, S. (2021). Use of whey protein isolate and gum Arabic for the co-encapsulation of probiotic Lactobacillus plantarum and phytosterols by complex coacervation: Enhanced viability of probiotic in Iranian white cheese. *Food Hydrocolloids*, *113*, 106496. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106496

Solís-Fuentes, J. A., Hernández-Ceja, Y., Hernández-Medel, M. del R., García-Gómez, R. S., Bernal-González, M., Mendoza-Pérez, S., & Durán-Domínguez-de-Bazúa, M. del C. (2019). Quality improvement of jaggery, a traditional sweetener, using bagasse activated carbon. *Food Biosci*, *32*(July). https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100444

Upadhyaya, A., Bhalerao, P. P., Bhushette, P., Dabade, A., & Sonawane, S. K. (2023). Optimization study of palm jaggery and palm candy - production and process. *Applied Food Research*, *3*(1), 100269. https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100269

UPRA. (2023). *Análisis situacional de la cadena agroindustrial de la panela en Colombia*. https://upra.gov.co/es-co/POP_Documentos/DT_A_Situacional_Cadena_Panela.pdf

Verma, P., Shah, N. G., & Mahajani, S. M. (2019). Why jaggery powder is more stable than solid jaggery blocks. *LWT - Food Science and Technology*, *110*(April), 299–306. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.093

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

La optimización del secado por aspersión para la obtención de microcápsulas de *Limosilactobacillus reuteri*, utilizando una matriz binaria de maltodextrina e inulina, mostró una alta viabilidad de *L. reuteri*, evidenciando su capacidad para proteger células probióticas frente a condiciones de estrés térmico y deshidratación. Además, el análisis morfológico por Microscopía Electrónica de Barrido reveló la formación de microcápsulas con una estructura esférica y superficie lisa.

La determinación de la supervivencia del microencapsulado *Limosilactobacillus reuteri* bajo condiciones gastrointestinales *in-vitro* demostró un incremento progresivo en la viabilidad, pasando de 8.118 ± 0.434 Log UFC/g en la fase oral a 9.866 ± 0.447 Log UFC/g en la fase gástrica, alcanzando 10.335 ± 0.314 Log UFC/g en la fase intestinal. Este comportamiento sugiere que, bajo condiciones gastrointestinales *in vitro*, la matriz MD:IN no solo preserva la integridad celular, sino que facilita una liberación controlada en el ambiente intestinal.

La incorporación de *L. reuteri* microencapsulado (ME) mantiene la estabilidad durante el almacenamiento del producto final, los tratamientos con mayores concentraciones de ME presentaron niveles de humedad estable y reducción de actividad de agua (a_W), parámetros críticos que limitan el crecimiento microbiano y favorecen la integridad del alimento. Además, los análisis de solubilidad y humectabilidad indicaron que la matriz MD:IN facilita una dispersión óptima del producto en medios acuosos y retrasa la penetración de agua, lo cual contribuye a mantener la calidad y prolongar la vida útil de la panela granulada durante el periodo evaluado.

La microencapsulación de *L. reuteri* mediante una matriz MD:IN demostró ser eficaz para preservar la viabilidad del probiótico en la panela granulada durante un almacenamiento de 45 dias de almacenamiento.

La inclusión de *L. reureri* ME no altera de manera significativa la composición nutricional de la panela, aunque sí cambia las coordenadas CIEL*a*b* y sensoriales del producto. Mientras que concentraciones elevadas del ME incrementan la luminosidad y modifican los valores de las coordenadas a* y b*, se observa una disminución en la aceptabilidad sensorial, lo que sugiere la necesidad de equilibrar los beneficios funcionales con las preferencias del consumidor.

6.2 Recomendaciones

Se recomienda profundizar en la formulación de *L. reuteri* microencapsulado con panela granulada para optimizar la funcionalidad probiótica y la preservación de las propiedades sensoriales del producto, dado que concentraciones elevadas pueden alterar las Coordenadas CIEL*a* b* y la aceptación organoléptica.

Evaluar variaciones en la composición de la matriz encapsulante para optimizar la liberación bacteriana, y determinar su efecto sobre la viabilidad durante digestiones gastrointestinales simuladas.

Ampliar el periodo de almacenamiento, evaluando la estabilidad de *L. reuteri* y la evolución de los parámetros fisicoquímicos (humedad, actividad de agua, solubilidad y humectabilidad) en condiciones de vida útil aceleradas.

Se sugiere estudiar el proceso para adicionar probióticos microencapsulados en panela granulada con el fin de asegurar la integridad de las microcápsulas, evaluando diferentes temperaturas de la panela al momento de agregar los microrganismos.

A. Anexo: Prueba T-Student, Resistencia a diferentes temperaturas.

Método

μ_1: media de Log UFC/mL cuando Temperatura °C = 37
μ_2: media de Log UFC/mL cuando Temperatura °C = 45
Diferencia: $\mu_1 - \mu_2$

No se presupuso igualdad de varianzas para este análisis.

Estadísticos descriptivos: Log UFC/mL

Temperatura °C	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
37	20	13,253	0,865	0,19
45	20	12,419	0,331	0,074

Estimación de la diferencia

Diferencia	IC de 95% para la diferencia
0,834	(0,406; 1,261)

Prueba

Hipótesis nula H_0: $\mu_1 - \mu_2 = 0$
Hipótesis alterna H_1: $\mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valor T	GL	Valor p
4,03	24	0,000

B. Anexo: Análisis estadístico para capítulo 3 – Optimizar el proceso de secado por aspersión para la obtención de microcápsulas de *Limosilactobacillus reuteri*

1. Optimización del secado por aspersión para la obtención de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado

Valore iniciales de caracterización de *Limosilactobacillus reuteri* microencapsulado evaluado durante 64 días.

		Viabilidad Log UFC/g		Humedad %		Actividad de agua a_W	
Dias	N	Media	SD	Media	SD	Media	SD
1	5	8.781[a]	± 0.398	3.120[a]	± 0.127	0.255[a]	± 0.006
12	5	8.573[a]	± 0.792	3.914[b]	± 0.082	0.288[b]	± 0.006
24	5	8.530[a]	± 0.770	4.752[c]	± 0.048	0.325[d]	± 0.005
64	5	8.181[a]	± 0.549	6.212[d]	± 0.033	0.418[d]	± 0.007

N (replicas), ±SD (desviación estándar)

Estadístico descriptico de las variables evaluadas para optimizar el proceso de microencapsulación de *Limosilactobacillus reuteri*

			Rendimiento		Humedad		Actividad de agua		Viabilidad	
temp[1]	MD[2]	N	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
110	10	3	48.825	±1.106	7.100	±1.939	0.337	±0.025	10.087	±0.502
	15	3	36.203	±0.954	7.973	±2.214	0.355	±0.020	9.730	±0.582
	5	3	46.272	±1.015	9.653	±0.451	0.357	±0.025	9.177	±0.095
120	10	3	49.702	±1.106	6.820	±0.688	0.287	±0.023	10.125	±1.050
	15	3	37.279	±1.106	5.860	±0.302	0.306	±0.020	9.975	±0.601
	5	3	49.188	±1.015	7.893	±0.451	0.293	±0.025	9.081	±0.118
130	10	3	50.419	±1.106	5.727	±1.266	0.248	±0.025	10.023	±0.622

15	3	38.246	±1.106	4.500	±0.302	0.254	±0.020	10.040	±0.493
5	3	54.337	±1.015	7.493	±0.451	0.275	±0.025	9.311	±0.984

[1]temp = Temperatura °C; [2]MD = Maltodextrina %
N = replicas; ±SD desviación estándar

Análisis de Varianza para rendimiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p*
temp	68.4551	1	68.4551	93.5000	0.0000*
MD	724.5990	1	724.5990	989.6600	0.0000*
temp: temp	0.6424	1	0.6424	0.8800	0.3607
temp:MD	27.1978	1	27.1978	37.1500	0.0000*
MD:MD	220.4160	1	220.4160	301.0500	0.0000*
Error total	13.9112	19	0.7322		
Total (corr.)	1075.3800	26			

temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %.
Gl = Grados de libertad. Significancia p<0.05*

Análisis de Varianza para humedad

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p*
temp	24.5467	1	24.5467	18.6000	0.0004*
MD	22.4897	1	22.4897	17.0400	0.0006*
temp: temp	0.2817	1	0.2817	0.2100	0.6493
temp:MD	1.2936	1	1.2936	0.9800	0.3345
MD:MD	2.7744	1	2.7744	2.1000	0.1634
Error total	25.0707	19	1.3195		
Total (corr.)	77.7891	26			

temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %.
Gl = Grados de libertad. Significancia p<0.05*.

Análisis de Varianza para actividad de agua a_W

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor- p*
temp	0.03699	1	0.0370	186.1100	0.0000*
MD	0.00004	1	0.0000	0.2000	0.6568
temp: temp	0.00049	1	0.0005	2.4500	0.1344
temp:MD	0.00027	1	0.0003	1.3600	0.2576
MD:MD	0.00157	1	0.0016	7.8900	0.0112*
Error total	0.00378	19	0.0002		
Total (corr.)	0.04975	26			

temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %.
Gl = Grados de libertad. Significancia p<0.05*

Análisis de varianza para viabilidad Log UFC/g

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor p*
temp	0.0727	1	0.0727	0.1800	0.6721
MD	2.3647	1	2.3647	6.0200	0.0240*
temp: temp	0.0000076	1	0.0000	0.0000	0.9965
temp:MD	0.0231	1	0.0231	0.0600	0.8112
MD:MD	1.6592	1	1.6592	4.2200	0.0539
Error total	7.4677	19	0.3930		
Total (corr.)	11.6326	26			

temp = temperatura °C; MD = maltodextrina %
Gl = Grados de libertad. Significancia p<0.05*

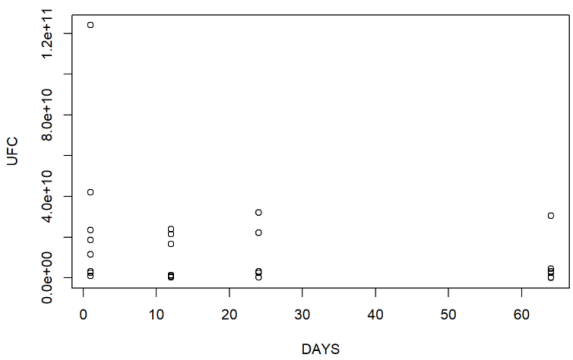
Efectos estimados para el rendimiento, humedad, actividad de agua y viabilidad.

Rendimiento %				Humedad %			
Efecto	Estimado	SE	V.I.F.	Efecto	Estimado	SE	V.I.F.
promedio	49.430	0.368		promedio	6.404	0.494	
temp	3.900	0.403	1.000	temp	-2.336	0.542	1.000
MD	-12.689	0.403	1.000	MD	-2.236	0.542	1.000
temp: temp	0.654	0.699	1.000	temp: temp	0.433	0.938	1.000
temp:MD	-3.011	0.494	1.000	temp:MD	-0.657	0.663	1.000
MD:MD	-12.122	0.699	1.000	MD:MD	1.360	0.938	1.000
bloque	2.252	0.466	1.333	bloque	0.471	0.625	1.333
bloque	-1.948	0.466	1.333	bloque	0.124	0.625	1.333
a_w				Viabilidad Log UFC/g			
Efecto	Estimado	SE	V.I.F.	Efecto	Estimado	SE	V.I.F.
promedio	0.284	0.006		promedio	10.077	0.270	
temp	-0.091	0.007	1.000	temp	0.127	0.296	1.000
MD	-0.003	0.007	1.000	MD	0.725	0.296	1.000
temp: temp	0.018	0.012	1.000	temp: temp	0.002	0.512	1.000
temp:MD	-0.010	0.008	1.000	temp:MD	0.088	0.362	1.000
MD:MD	0.032	0.012	1.000	MD:MD	-1.052	0.512	1.000
bloque	0.039	0.008	1.333	bloque	0.030	0.341	1.333
bloque	-0.038	0.008	1.333	bloque	0.082	0.341	1.333

temp = Temperatura °C; MD = Maltodextrina %.
SE = error estándar basado en el error total con 19 grados de libertad. V.I.F. = Factor de Inflación de Varianza: V.I.F. = 1: diseño ortogonal. V.I.F >10: confusión seria entre efectos.

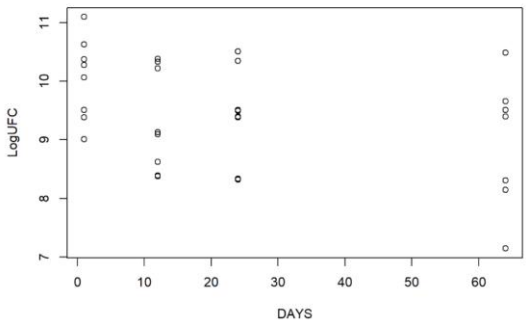
2. Diagrama de dispersión exploratorio UFC y Log UFC - Modelo rectilíneo – Viabilidad Log UFC/g

```
with(data, plot(DAYS, UFC))
```



log(UFC)

```
with(data, plot(DAYS, LogUFC))
```




```
modelo <- lm(LogUFC ~ DAYS + I(DAYS^2), data)
summary(modelo)
```

```
Call:
lm(formula = LogUFC ~ DAYS + I(DAYS^2), data = data)

Residuals:
    Min      1Q  Median      3Q     Max 
-1.8844 -0.7618  0.1882  0.6308  1.4537 

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)    
(Intercept)  9.9735796  0.3095015  32.225   <2e-16 ***
DAYS        -0.0387829  0.0283569  -1.368    0.182    
I(DAYS^2)    0.0003758  0.0004011   0.937    0.357    
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.8666 on 29 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.1446,	Adjusted R-squared:  0.08563 
F-statistic: 2.452 on 2 and 29 DF,  p-value: 0.1038
```

3. Supuesto de normalidad y homocedasticidad

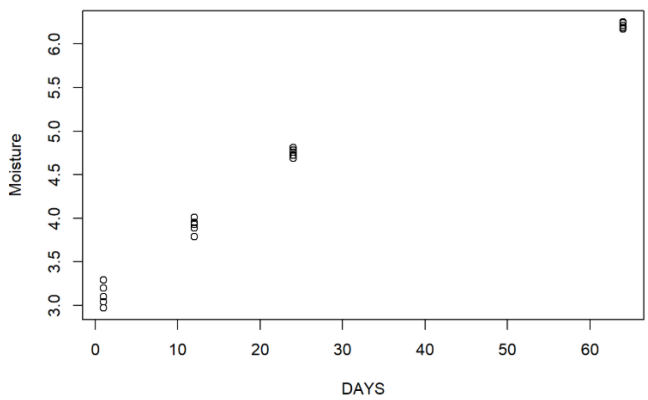
```
    Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(mod.adj)
W = 0.9654, p-value = 0.3829

Cargando paquete requerido: lmtest

Cargando paquete requerido: zoo

Adjuntando el paquete: 'zoo'

The following objects are masked from 'package:base':

    as.Date, as.Date.numeric
```

```
Evaluación de homocedasticidad

    studentized Breusch-Pagan test

data:  mod.adj
BP = 1.6405, df = 1, p-value = 0.2003
```

4. Modelo cuadrático humedad

Diagrama de dispersión

```
with(data, plot(Moisture ~ DAYS))
```

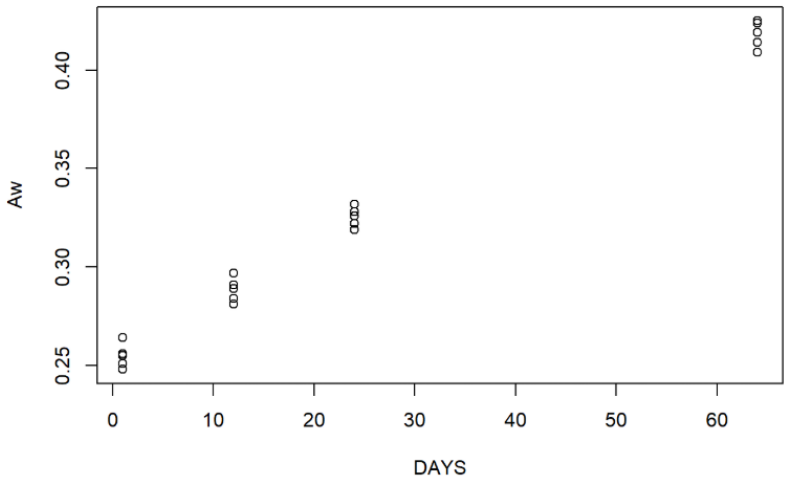



```
mod <- lm(Moisture ~ DAYS + I(DAYS^2), data)
summary(mod)
```

```
Call:
lm(formula = Moisture ~ DAYS + I(DAYS^2), data = data)

Residuals:
      Min        1Q    Median        3Q       Max 
-0.161286 -0.040102 -0.003948  0.039831  0.186057 

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)    
(Intercept)  3.021e+00  3.729e-02   81.00  < 2e-16 ***
DAYS         8.395e-02  3.417e-03   24.57 1.01e-14 ***
I(DAYS^2)   -5.320e-04  4.833e-05  -11.01 3.72e-09 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.08254 on 17 degrees of freedom
  (12 observations deleted due to missingness)
Multiple R-squared:  0.9956,	Adjusted R-squared:  0.9951 
F-statistic:  1923 on 2 and 17 DF,  p-value: < 2.2e-16
```

5. Modelo cuadrático aw

```
with(data, plot(Aw ~ DAYS))
```




```
mod <- lm(Aw ~ DAYS + I(DAYS^2), data)
summary(mod)
```

```
Call:
lm(formula = Aw ~ DAYS + I(DAYS^2), data = data)

Residuals:
       Min         1Q     Median         3Q        Max 
-0.0092577 -0.0045689  0.0007085  0.0038995  0.0096747 

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)    
(Intercept)  2.510e-01  2.678e-03  93.709  < 2e-16 ***
DAYS         3.347e-03  2.454e-04  13.638 1.39e-10 ***
I(DAYS^2)   -1.146e-05  3.471e-06  -3.301  0.00422 ** 
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.005929 on 17 degrees of freedom
  (12 observations deleted due to missingness)
Multiple R-squared:  0.992, Adjusted R-squared:  0.9911 
F-statistic:  1060 on 2 and 17 DF,  p-value: < 2.2e-16
```

C. Anexo: Análisis estadístico para capítulo 5 - Evaluar la estabilidad durante el almacenamiento de una panela granulada adicionada con *Limosilactobacillus reuteri*

1. Estadístico descriptivo - Evaluación microencapsulado

			Viabilidad		Humedad		Actividad de agua		Solubilidad		Humectabilidad	
tto	tiempo (Días)	N	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
1	0	5	7.877	±0.548	2.242	±0.047	0.415	±0.001	85,506	±0,397	8.31	0.114
	15	5	9.049	±1.347	1.972	±0.042	0.421	±0.002	82,496	±0,542	8.726	0.187
	30	5	12.31	±0.511	2.264	±0.096	0.421	±0.001	82,836	±0,525	9.34	0.178
	45	5	10.853	±0.436	2.088	±0.093	0.435	±0.002	83,026	±0,400	9.714	0.347
2	0	5	8.477	±1.000	2.486	±0.038	0.399	±0.002	87,158	±0,372	7.636	0.132
	15	5	9.417	±1.060	2.05	±0.069	0.414	±0.001	85,128	±0,437	7.738	0.266
	30	5	12.215	±0.450	2.178	±0.064	0.414	±0.003	85,910	±0,277	8.294	0.126
	45	5	10.767	±0.521	2.278	±0.054	0.414	±0.002	86,180	±0,372	8.582	0.279
3	0	5	7.682	±1.112	2.924	±0.032	0.384	±0.002	88,578	±0,406	6.032	0.144
	15	5	9.342	±1.018	2.114	±0.045	0.384	±0.002	87,154	±1,291	6.642	0.403
	30	5	12.095	±0.568	2.704	±0.030	0.383	±0.002	87,048	±0,223	7.136	0.381
	45	5	10.959	±0.513	2.346	±0.023	0.394	±0.002	87,120	±0,446	8.264	0.11
4	0	5	8.325	±0.998	4.966	±0.061	0.615	±0.001	85,136	±0,463	5.136	0.159
	15	5	9.405	±1.188	4.814	±0.043	0.613	±0.002	88,288	±0,413	5.404	0.265
	30	5	12.07	±0.777	5.5	±0.026	0.612	±0.003	89,268	±0,406	6.04	0.145
	45	5	10.658	±0.867	5.032	±0.065	0.601	±0.002	89,132	±0,339	6.81	0.212
5	0	5	0	±0.000	2.468	±0.056	0.447	±0.003	80,460	±0,492	8.946	0.198
	15	5	0	±0.000	2.2	±0.041	0.457	±0.001	78,696	±0,446	9.538	0.181
	30	5	0	±0.000	2.48	±0.022	0.456	±0.004	78,972	±0,296	10.126	0.253
	45	4	0	±0.000	0	0	0.486	±0.003	78,990	±0,267	11.3	0.291

tto = tratamiento. tto 1 = 5% *L. reuteri* ME; tto 2 = 10% *L. reuteri* ME; tto 3 = 15% *L. reuteri* ME; tto 4 = 5% *L. reuteri* BM; tto 5 = Control.
N (replicas), ±SD (desviación estándar), tto 5 sin crecimiento bacteriano.

			L		a		b	
[1]tto	tiempo (Días)	N	Media	SD	Media	SD	Media	SD
1	0	5	56.532	±0.614	7.448	±0.486	13.672	±0.424
	15	5	67.58	±1.045	6.658	±0.072	21.864	±0.987
	30	5	67.206	±1.095	6.848	±0.438	20.146	±0.947
	45	5	66.472	±0.840	7.792	±0.247	28.122	±0.568
2	0	5	75.608	±0.533	3 .466	±0.309	8.024	±0.244
	15	5	74.928	±1.122	3.96	±0.527	11.722	±1.048
	30	5	73.496	±0.424	5.04	±0.225	12.064	±0.555
	45	5	76.648	±0.466	5.174	±0.402	16.602	±0.858
3	0	5	83.454	±0.512	1.108	±0.322	4.604	±0.447
	15	5	78.098	±0.419	1.382	±0.354	5.71	±0.831
	30	5	80.486	±0.458	2.992	±0.269	7.276	±0.543
	45	5	84.092	±0.404	2.618	±0.346	8.424	±0.435
4	0	5	38.204	±0.469	12.23	±0.409	22.158	±0.368
	15	5	49.622	±0.458	6.73	±0.342	14.536	±0.549
	30	5	50.642	±0.639	7.912	±0.219	13.542	±0.707
	45	5	47.618	±0.961	10.338	±0.362	23.118	±0.705
5	0	5	41.12	±0.494	10.486	±0.572	23.404	±0.355
	15	5	56.816	±0.551	7.228	±0.406	21.158	±1.241
	30	5	59.796	±0.476	9.332	±0.411	22.258	±0.479
	45	5	57.264	±0.640	10.936	±0.310	31.936	±0.539

[1]tto = tratamiento: tto 1 = 5% *L. reuteri* ME; tto 2 = 10% *L. reuteri* ME; tto 3 = 15% *L. reuteri* ME; tto 4 = 5% *L. reuteri* BM; tto 5 = Control.

2. Ajuste de modelos para viabilidad: Simétrico compuesto, no estructurado y autorregresivo de 1er orden.

Inicialmente, se ajustan las 3 estructuras de covarianzas:

```
# Modelación simétrica compuesta ****
mod.SC <- lme(Viability ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corCompSymm(form = ~ 1|b/ue),
              data = data)


# Modelación no estructurada ****
mod.UN <- lme(Viability ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corSymm( form = ~ 1|b/ue),
              weights = varIdent(form = ~ 1|tiempo),
              control = lmeControl(msMaxIter = 1000, opt = "optim"),
              data = data)

# Modelación con estructura autorregresiva de 1er orden ****
mod.AR1 <- lme(Viability ~ tto * tiempo, random = ~1|b/ue,
               correlation = corAR1(form = ~1|b/ue),
               data = data)

# Comparación de modelos ****
anova(mod.SC, mod.UN, mod.AR1)
```

```
        Model df      AIC      BIC    logLik   Test  L.Ratio p-value
mod.SC      1 24 229.1483 286.3170 -90.57417
mod.UN      2 32 206.5573 282.7822 -71.27865 1 vs 2 38.59103  <.0001
mod.AR1     3 24 223.9212 281.0898 -87.96058 2 vs 3 33.36385   1e-04
```

Se elige el modelo AR1 por tener el BIC menor:

3. ANOVA Viabilidad mod.AR1

```
anova(mod.AR1)
```

```
            numDF denDF   F-value p-value
(Intercept)     1    60 1272.9257  <.0001
tto             4    16  712.2807  <.0001
tiempo          3    60  156.9756  <.0001
tto:tiempo     12    60   10.4751  <.0001
```

Se construye un gráfico de interacción para explorar la naturaleza de la misma:

```
with(data, interaction.plot(tiempo, tto, Viability, col = rainbow(5), lty = 1))
```

4. Ajuste de modelos para viabilidad: Simétrico compuesto, no estructurado y autorregresivo de 1er orden – Se omite tratamiento control

```
# Modelación simétrica compuesta ****
mod.SC <- lme(Viability ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corCompSymm(form = ~ 1|b/ue),
              data = data2)


# Modelación no estructurada ****
mod.UN <- lme(Viability ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corSymm( form = ~ 1|b/ue),
              weights = varIdent(form = ~ 1|tiempo),
              control = lmeControl(msMaxIter = 1000, opt = "optim"),
              data = data2)

# Modelación con estructura autorregresiva de 1er orden ****
mod.AR1 <- lme(Viability ~ tto * tiempo, random = ~1|b/ue,
               correlation = corAR1(form = ~1|b/ue),
               data = data2)

# Comparación de modelos ****
anova(mod.SC, mod.UN, mod.AR1)
```

```
        Model df      AIC      BIC    logLik   Test  L.Ratio p-value
mod.SC      1 20 180.4744 223.6521 -70.23720
mod.UN      2 28 181.7094 242.1581 -62.85469 1 vs 2 14.76503  0.0639
mod.AR1     3 20 187.6792 230.8569 -73.83962 2 vs 3 21.96987  0.0050
```

Se elige el modelo SC por tener el BIC menor:

5. ANOVA Viabilidad mod.SC

```
anova(mod.SC)
```

```
            numDF denDF   F-value p-value
(Intercept)     1    48 1181.3891  <.0001
tto             3    12    1.9499  0.1755
tiempo          3    48  164.3331  <.0001
tto:tiempo      9    48    0.7016  0.7041
```

6. Evaluación de efectos principales en el tiempo Viabilidad

Se evalúan efectos principales del tiempo:

```
emmeans(mod.SC, pairwise ~ tiempo, adjust = "holm")
```

```
NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions

$emmeans
 tiempo emmean    SE df lower.CL upper.CL
 0        8.09 0.317  4     7.21     8.97
 15       9.30 0.317  4     8.42    10.18
 30      12.17 0.317  4    11.29    13.05
 45      10.81 0.317  4     9.93    11.69

Results are averaged over the levels of: tto
Degrees-of-freedom method: containment
Confidence level used: 0.95

$contrasts
 contrast            estimate    SE df t.ratio p.value
 tiempo0 - tiempo15     -1.21 0.196 48  -6.187  <.0001
 tiempo0 - tiempo30     -4.08 0.196 48 -20.825  <.0001
 tiempo0 - tiempo45     -2.72 0.196 48 -13.870  <.0001
 tiempo15 - tiempo30    -2.87 0.196 48 -14.638  <.0001
 tiempo15 - tiempo45    -1.51 0.196 48  -7.683  <.0001
 tiempo30 - tiempo45     1.36 0.196 48   6.955  <.0001

Results are averaged over the levels of: tto
Degrees-of-freedom method: containment
P value adjustment: holm method for 6 tests
```

7. Ajuste de modelos para humedad: Simétrico compuesto, No estructurado, Autorregresivo de 1er orden

Inicialmente, se ajustan las 3 estructuras de covarianzas:

```
# Modelación simétrica compuesta ****
mod.SC <- lme(Moisture ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corCompSymm(form = ~ 1|b/ue),
              data = data)


# Modelación no estructurada ****
mod.UN <- lme(Moisture ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corSymm( form = ~ 1|b/ue),
              weights = varIdent(form = ~ 1|tiempo),
              control = lmeControl(msMaxIter = 1000, opt = "optim"),
              data = data)

# Modelación con estructura autorregresiva de 1er orden ****
mod.AR1 <- lme(Moisture ~ tto * tiempo, random = ~1|b/ue,
               correlation = corAR1(form = ~1|b/ue),
               data = data)

# Comparación de modelos ****
anova(mod.SC, mod.UN, mod.AR1)
```

```
        Model df       AIC        BIC   logLik   Test  L.Ratio p-value
mod.SC      1 24 -165.9893 -108.82069 106.9947
mod.UN      2 32 -157.9363  -81.71146 110.9682 1 vs 2 7.946985  0.4387
mod.AR1     3 24 -167.6134 -110.44477 107.8067 2 vs 3 6.322906  0.6111
```

Se elige el modelo AR1 por tener el BIC menor:

8. ANOVA HUMEDAD mod.AR1

```
anova(mod.AR1)
```

```
            numDF denDF  F-value p-value
(Intercept)     1    60 90384.13  <.0001
tto             4    16  7678.18  <.0001
tiempo          3    60   477.29  <.0001
tto:tiempo     12    60    90.37  <.0001
```

Se construye un gráfico de interacción para explorar la naturaleza de la misma:

```
with(data, interaction.plot(tiempo, tto, Moisture, col = rainbow(5), lty = 1))
```

9. Evaluación de efectos simple de tiempo Humedad

Puesto que hay interacción significativa, se evalúan los efectos simples.

```
emmeans(mod.AR1, pairwise ~ tto|tiempo, adjust = "holm")
```

```
$emmeans
tiempo = 0:
 tto emmean     SE df lower.CL upper.CL
 1     2.24 0.0243  4     2.17     2.31
 2     2.49 0.0243  4     2.42     2.55
 3     2.92 0.0243  4     2.86     2.99
 4     4.97 0.0243  4     4.90     5.03
 5     2.47 0.0243  4     2.40     2.54

tiempo = 15:
 tto emmean     SE df lower.CL upper.CL
 1     1.97 0.0243  4     1.90     2.04
 2     2.05 0.0243  4     1.98     2.12
 3     2.11 0.0243  4     2.05     2.18
 4     4.81 0.0243  4     4.75     4.88
 5     2.20 0.0243  4     2.13     2.27

tiempo = 30:
 tto emmean     SE df lower.CL upper.CL
 1     2.26 0.0243  4     2.20     2.33
 2     2.18 0.0243  4     2.11     2.25
 3     2.70 0.0243  4     2.64     2.77
 4     5.50 0.0243  4     5.43     5.57
 5     2.48 0.0243  4     2.41     2.55

tiempo = 45:
 tto emmean     SE df lower.CL upper.CL
 1     2.09 0.0243  4     2.02     2.16
 2     2.28 0.0243  4     2.21     2.35
 3     2.35 0.0243  4     2.28     2.41
 4     5.03 0.0243  4     4.96     5.10
 5     2.77 0.0243  4     2.71     2.84

Degrees-of-freedom method: containment
Confidence level used: 0.95
```

```
$contrasts
tiempo = 0:
 contrast    estimate     SE df  t.ratio p.value
 tto1 - tto2   -0.244 0.0327 16   -7.468  <.0001
 tto1 - tto3   -0.682 0.0327 16  -20.873  <.0001
 tto1 - tto4   -2.724 0.0327 16  -83.371  <.0001
 tto1 - tto5   -0.226 0.0327 16   -6.917  <.0001
 tto2 - tto3   -0.438 0.0327 16  -13.405  <.0001
 tto2 - tto4   -2.480 0.0327 16  -75.903  <.0001
 tto2 - tto5    0.018 0.0327 16    0.551  0.5893
 tto3 - tto4   -2.042 0.0327 16  -62.498  <.0001
 tto3 - tto5    0.456 0.0327 16   13.956  <.0001
 tto4 - tto5    2.498 0.0327 16   76.454  <.0001

tiempo = 15:
 contrast    estimate     SE df  t.ratio p.value
 tto1 - tto2   -0.078 0.0327 16   -2.387  0.0593
 tto1 - tto3   -0.142 0.0327 16   -4.346  0.0020
 tto1 - tto4   -2.842 0.0327 16  -86.982  <.0001
 tto1 - tto5   -0.228 0.0327 16   -6.978  <.0001
 tto2 - tto3   -0.064 0.0327 16   -1.959  0.0678
 tto2 - tto4   -2.764 0.0327 16  -84.595  <.0001
 tto2 - tto5   -0.150 0.0327 16   -4.591  0.0015
 tto3 - tto4   -2.700 0.0327 16  -82.636  <.0001
 tto3 - tto5   -0.086 0.0327 16   -2.632  0.0544
 tto4 - tto5    2.614 0.0327 16   80.004  <.0001

tiempo = 30:
 contrast    estimate     SE df  t.ratio p.value
 tto1 - tto2    0.086 0.0327 16    2.632  0.0181
 tto1 - tto3   -0.440 0.0327 16  -13.467  <.0001
 tto1 - tto4   -3.236 0.0327 16  -99.041  <.0001
 tto1 - tto5   -0.216 0.0327 16   -6.611  <.0001
 tto2 - tto3   -0.526 0.0327 16  -16.099  <.0001
 tto2 - tto4   -3.322 0.0327 16 -101.673  <.0001
 tto2 - tto5   -0.302 0.0327 16   -9.243  <.0001
 tto3 - tto4   -2.796 0.0327 16  -85.574  <.0001
 tto3 - tto5    0.224 0.0327 16    6.856  <.0001
 tto4 - tto5    3.020 0.0327 16   92.430  <.0001

tiempo = 45:
 contrast    estimate     SE df  t.ratio p.value
 tto1 - tto2   -0.190 0.0327 16   -5.815  0.0001
 tto1 - tto3   -0.258 0.0327 16   -7.896  <.0001
 tto1 - tto4   -2.944 0.0327 16  -90.104  <.0001
 tto1 - tto5   -0.686 0.0327 16  -20.996  <.0001
 tto2 - tto3   -0.068 0.0327 16   -2.081  0.0538
 tto2 - tto4   -2.754 0.0327 16  -84.289  <.0001
 tto2 - tto5   -0.496 0.0327 16  -15.181  <.0001
 tto3 - tto4   -2.686 0.0327 16  -82.208  <.0001
 tto3 - tto5   -0.428 0.0327 16  -13.099  <.0001
 tto4 - tto5    2.258 0.0327 16   69.108  <.0001

Degrees-of-freedom method: containment
P value adjustment: holm method for 10 tests
```

10. Ajuste de modelos para actividad de agua: Simétrico compuesto, No estructurado, Autorregresivo de 1er orden

Inicialmente, se ajustan las 3 estructuras de covarianzas:

```
# Modelación simétrica compuesta ****
mod.SC <- lme(Aw ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corCompSymm(form = ~ 1|b/ue),
              data = data)


# Modelación no estructurada ****
mod.UN <- lme(Aw ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corSymm( form = ~ 1|b/ue),
              weights = varIdent(form = ~ 1|tiempo),
              control = lmeControl(msMaxIter = 1000, opt = "optim"),
              data = data)

# Modelación con estructura autorregresiva de 1er orden ****
mod.AR1 <- lme(Aw ~ tto * tiempo, random = ~1|b/ue,
               correlation = corAR1(form = ~1|b/ue),
               data = data)

# Comparación de modelos ****
anova(mod.SC, mod.UN, mod.AR1)
```

```
        Model df       AIC       BIC   logLik   Test  L.Ratio p-value
mod.SC      1 24 -669.1671 -611.9985 358.5836
mod.UN      2 32 -670.9099 -594.6850 367.4549 1 vs 2 17.74273  0.0232
mod.AR1     3 24 -674.2232 -617.0545 361.1116 2 vs 3 12.68670  0.1231
```

Se elige el modelo AR1 por tener el BIC menor:

11. ANOVA Actividad de agua mod.AR1

```
anova(mod.AR1)
```

```
            numDF denDF   F-value p-value
(Intercept)     1    60 2817481.9  <.0001
tto             4    16   21299.9  <.0001
tiempo          3    60     191.4  <.0001
tto:tiempo     12    60      89.4  <.0001
```

12. Evaluación de efectos principales de tratamientos – Actividad de agua

Se evalúan efectos principales de los tratamientos:

```
emmeans(mod.AR1, pairwise ~ tto, adjust = "holm")
```

```
NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions

$emmeans
 tto emmean        SE df lower.CL upper.CL
 1   0.4229 0.0006149  4   0.4212   0.4246
 2   0.4102 0.0006149  4   0.4085   0.4119
 3   0.3861 0.0006149  4   0.3844   0.3879
 4   0.6103 0.0006149  4   0.6086   0.6120
 5   0.4614 0.0006149  4   0.4597   0.4631

Results are averaged over the levels of: tiempo
Degrees-of-freedom method: containment
Confidence level used: 0.95

$contrasts
 contrast    estimate      SE df  t.ratio p.value
 tto1 - tto2   0.0127 0.00087 16   14.605  <.0001
 tto1 - tto3   0.0367 0.00087 16   42.263  <.0001
 tto1 - tto4  -0.1874 0.00087 16 -215.513  <.0001
 tto1 - tto5  -0.0385 0.00087 16  -44.276  <.0001
 tto2 - tto3   0.0240 0.00087 16   27.658  <.0001
 tto2 - tto4  -0.2001 0.00087 16 -230.119  <.0001
 tto2 - tto5  -0.0512 0.00087 16  -58.881  <.0001
 tto3 - tto4  -0.2241 0.00087 16 -257.777  <.0001
 tto3 - tto5  -0.0752 0.00087 16  -86.539  <.0001
 tto4 - tto5   0.1489 0.00087 16  171.238  <.0001

Results are averaged over the levels of: tiempo
Degrees-of-freedom method: containment
P value adjustment: holm method for 10 tests
```

13. Ajuste de modelos para solubilidad %: Simétrico compuesto, No estructurado, Autorregresivo de 1er orden

Inicialmente, se ajustan las 3 estructuras de covarianzas:

```
# Modelación simétrica compuesta ****
mod.SC <- lme(Solubility ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corCompSymm(form = ~ 1|b/ue),
              data = data)


# Modelación no estructurada ****
mod.UN <- lme(Solubility ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corSymm( form = ~ 1|b/ue),
              weights = varIdent(form = ~ 1|tiempo),
              control = lmeControl(msMaxIter = 1000, opt = "optim"),
              data = data)

# Modelación con estructura autorregresiva de 1er orden ****
mod.AR1 <- lme(Solubility ~ tto * tiempo, random = ~1|b/ue,
               correlation = corAR1(form = ~1|b/ue),
               data = data)

# Comparación de modelos ****
anova(mod.SC, mod.UN, mod.AR1)
```

```
        Model df      AIC      BIC    logLik   Test  L.Ratio p-value
mod.SC      1 24 192.1881 249.3567 -72.09404
mod.UN      2 32 188.1907 264.4155 -62.09535 1 vs 2 19.99737  0.0103
mod.AR1     3 24 192.6048 249.7735 -72.30241 2 vs 3 20.41413  0.0089
```

Se elige el modelo SC por tener el BIC menor:

14. ANOVA Solubilidad % - mod.SC

```
anova(mod.SC)
```

```
            numDF denDF   F-value p-value
(Intercept)     1    60 2841853.1  <.0001
tto             4    16    1334.3  <.0001
tiempo          3    60      17.3  <.0001
tto:tiempo     12    60      33.1  <.0001
```

15.Evaluación de efectos simples – solubilidad %

```
emmeans(mod.SC, pairwise ~ tto|tiempo, adjust = "holm")
```

```
$emmeans
tiempo = 0:
 tto emmean     SE df lower.CL upper.CL
 1    85.51 0.2185  4    84.90    86.11
 2    87.16 0.2185  4    86.55    87.76
 3    88.58 0.2185  4    87.97    89.18
 4    85.14 0.2185  4    84.53    85.74
 5    80.46 0.2185  4    79.85    81.07

tiempo = 15:
 tto emmean     SE df lower.CL upper.CL
 1    82.50 0.2185  4    81.89    83.10
 2    85.13 0.2185  4    84.52    85.73
 3    87.15 0.2185  4    86.55    87.76
 4    88.29 0.2185  4    87.68    88.89
 5    78.70 0.2185  4    78.09    79.30

tiempo = 30:
 tto emmean     SE df lower.CL upper.CL
 1    82.84 0.2185  4    82.23    83.44
 2    85.91 0.2185  4    85.30    86.52
 3    87.05 0.2185  4    86.44    87.65
 4    89.27 0.2185  4    88.66    89.87
 5    78.97 0.2185  4    78.37    79.58

tiempo = 45:
 tto emmean     SE df lower.CL upper.CL
 1    83.03 0.2185  4    82.42    83.63
 2    86.18 0.2185  4    85.57    86.79
 3    87.12 0.2185  4    86.51    87.73
 4    89.13 0.2185  4    88.53    89.74
 5    78.99 0.2185  4    78.38    79.60

Degrees-of-freedom method: containment
Confidence level used: 0.95
```

```
$contrasts
tiempo = 0:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    -1.65 0.307 16  -5.381  0.0002
 tto1 - tto3    -3.07 0.307 16 -10.006  <.0001
 tto1 - tto4     0.37 0.307 16   1.205  0.2457
 tto1 - tto5     5.05 0.307 16  16.436  <.0001
 tto2 - tto3    -1.42 0.307 16  -4.625  0.0006
 tto2 - tto4     2.02 0.307 16   6.586  <.0001
 tto2 - tto5     6.70 0.307 16  21.817  <.0001
 tto3 - tto4     3.44 0.307 16  11.211  <.0001
 tto3 - tto5     8.12 0.307 16  26.442  <.0001
 tto4 - tto5     4.68 0.307 16  15.231  <.0001

tiempo = 15:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    -2.63 0.307 16  -8.573  <.0001
 tto1 - tto3    -4.66 0.307 16 -15.172  <.0001
 tto1 - tto4    -5.79 0.307 16 -18.866  <.0001
 tto1 - tto5     3.80 0.307 16  12.377  <.0001
 tto2 - tto3    -2.03 0.307 16  -6.599  <.0001
 tto2 - tto4    -3.16 0.307 16 -10.293  <.0001
 tto2 - tto5     6.43 0.307 16  20.950  <.0001
 tto3 - tto4    -1.13 0.307 16  -3.694  0.0020
 tto3 - tto5     8.46 0.307 16  27.549  <.0001
 tto4 - tto5     9.59 0.307 16  31.243  <.0001

tiempo = 30:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    -3.07 0.307 16 -10.013  <.0001
 tto1 - tto3    -4.21 0.307 16 -13.719  <.0001
 tto1 - tto4    -6.43 0.307 16 -20.950  <.0001
 tto1 - tto5     3.86 0.307 16  12.586  <.0001
 tto2 - tto3    -1.14 0.307 16  -3.707  0.0019
 tto2 - tto4    -3.36 0.307 16 -10.938  <.0001
 tto2 - tto5     6.94 0.307 16  22.598  <.0001
 tto3 - tto4    -2.22 0.307 16  -7.231  <.0001
 tto3 - tto5     8.08 0.307 16  26.305  <.0001
 tto4 - tto5    10.30 0.307 16  33.536  <.0001

tiempo = 45:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    -3.15 0.307 16 -10.273  <.0001
 tto1 - tto3    -4.09 0.307 16 -13.335  <.0001
 tto1 - tto4    -6.11 0.307 16 -19.888  <.0001
 tto1 - tto5     4.04 0.307 16  13.146  <.0001
 tto2 - tto3    -0.94 0.307 16  -3.062  0.0075
 tto2 - tto4    -2.95 0.307 16  -9.615  <.0001
 tto2 - tto5     7.19 0.307 16  23.419  <.0001
 tto3 - tto4    -2.01 0.307 16  -6.553  <.0001
 tto3 - tto5     8.13 0.307 16  26.481  <.0001
 tto4 - tto5    10.14 0.307 16  33.034  <.0001

Degrees-of-freedom method: containment
P value adjustment: holm method for 10 tests
```

16. Ajuste de modelos para humectabilidad min: Simétrico compuesto, No estructurado, Autorregresivo de 1er orden

Inicialmente, se ajustan las 3 estructuras de covarianzas:

```
# Modelación simétrica compuesta ****
mod.SC <- lme(Weattibility ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corCompSymm(form = ~ 1|b/ue),
              data = data)


# Modelación no estructurada ****
mod.UN <- lme(Weattibility ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corSymm( form = ~ 1|b/ue),
              weights = varIdent(form = ~ 1|tiempo),
              control = lmeControl(msMaxIter = 1000, opt = "optim"),
              data = data)

# Modelación con estructura autorregresiva de 1er orden ****
mod.AR1 <- lme(Weattibility ~ tto * tiempo, random = ~1|b/ue,
               correlation = corAR1(form = ~1|b/ue),
               data = data)

# Comparación de modelos ****
anova(mod.SC, mod.UN, mod.AR1)
```

```
        Model df      AIC      BIC     logLik   Test  L.Ratio p-value
mod.SC      1 24 73.78503 130.9537 -12.892515
mod.UN      2 32 71.46781 147.6927  -3.733904 1 vs 2 18.31722  0.0190
mod.AR1     3 24 69.80568 126.9743 -10.902839 2 vs 3 14.33787  0.0734
```

Se elige el modelo AR1 por tener el BIC menor:

17.ANOVA Humectabilidad mod.AR1

```
anova(mod.AR1)
```

```
            numDF denDF  F-value p-value
(Intercept)     1    60 58868.08  <.0001
tto             4    16  1124.22  <.0001
tiempo          3    60   386.81  <.0001
tto:tiempo     12    60     7.31  <.0001
```

18.Evaluación de efectos principales de tratamientos y tiempo – Humectabilidad

Se evalúan únicamente efectos principales:

```
emmeans(mod.AR1, pairwise ~ tto, adjust = "holm")
```

```
NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions

$emmeans
 tto emmean     SE df lower.CL upper.CL
 1     9.02 0.0548  4     8.87     9.17
 2     8.06 0.0548  4     7.91     8.21
 3     7.02 0.0548  4     6.87     7.17
 4     5.85 0.0548  4     5.70     6.00
 5     9.98 0.0548  4     9.83    10.13

Results are averaged over the levels of: tiempo
Degrees-of-freedom method: containment
Confidence level used: 0.95
```

```
$contrasts
 contrast    estimate     SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    0.960 0.0693 16  13.859  <.0001
 tto1 - tto3    2.004 0.0693 16  28.931  <.0001
 tto1 - tto4    3.175 0.0693 16  45.836  <.0001
 tto1 - tto5   -0.955 0.0693 16 -13.787  <.0001
 tto2 - tto3    1.044 0.0693 16  15.072  <.0001
 tto2 - tto4    2.215 0.0693 16  31.977  <.0001
 tto2 - tto5   -1.915 0.0693 16 -27.646  <.0001
 tto3 - tto4    1.171 0.0693 16  16.905  <.0001
 tto3 - tto5   -2.959 0.0693 16 -42.717  <.0001
 tto4 - tto5   -4.130 0.0693 16 -59.622  <.0001

Results are averaged over the levels of: tiempo
Degrees-of-freedom method: containment
P value adjustment: holm method for 10 tests
```

```
emmeans(mod.AR1, pairwise ~ tiempo, adjust = "holm")
```

```
NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions

$emmeans
 tiempo emmean     SE df lower.CL upper.CL
 0        7.21 0.0517  4     7.07     7.36
 15       7.61 0.0517  4     7.47     7.75
 30       8.19 0.0517  4     8.04     8.33
 45       8.93 0.0517  4     8.79     9.08

Results are averaged over the levels of: tto
Degrees-of-freedom method: containment
Confidence level used: 0.95
```

```
$contrasts
 contrast            estimate     SE df t.ratio p.value
 tiempo0 - tiempo15    -0.398 0.0701 60  -5.673  <.0001
 tiempo0 - tiempo30    -0.975 0.0580 60 -16.809  <.0001
 tiempo0 - tiempo45    -1.722 0.0621 60 -27.743  <.0001
 tiempo15 - tiempo30   -0.578 0.0701 60  -8.241  <.0001
 tiempo15 - tiempo45   -1.324 0.0580 60 -22.828  <.0001
 tiempo30 - tiempo45   -0.747 0.0701 60 -10.655  <.0001

Results are averaged over the levels of: tto
Degrees-of-freedom method: containment
P value adjustment: holm method for 6 tests
```

19. Ajuste de modelos para Coordenada L*: Simétrico compuesto, No estructurado, Autorregresivo de 1er orden

```
# Modelación simétrica compuesta ****
mod.SC <- lme(L ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corCompSymm(form = ~ 1|b/ue),
              data = data)


# Modelación no estructurada ****
mod.UN <- lme(L ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corSymm( form = ~ 1|b/ue),
              weights = varIdent(form = ~ 1|tiempo),
              control = lmeControl(msMaxIter = 1000, opt = "optim"),
              data = data)

# Modelación con estructura autorregresiva de 1er orden ****
mod.AR1 <- lme(L ~ tto * tiempo, random = ~1|b/ue,
               correlation = corAR1(form = ~1|b/ue),
               data = data)

# Comparación de modelos ****
anova(mod.SC, mod.UN, mod.AR1)
```

```
        Model df      AIC      BIC    logLik   Test  L.Ratio p-value
mod.SC      1 24 243.3470 300.5157 -97.67352
mod.UN      2 32 252.8649 329.0897 -94.43245 1 vs 2 6.482139  0.5934
mod.AR1     3 24 243.3174 300.4860 -97.65869 2 vs 3 6.452479  0.5967
```

Se elige el modelo AR1 por tener el BIC menor:

20. ANOVA Coordenada L* - mod.AR1

```
anova(mod.AR1)
```

```
            numDF denDF  F-value p-value
(Intercept)     1    60 650187.9  <.0001
tto             4    16   8097.0  <.0001
tiempo          3    60    738.2  <.0001
tto:tiempo     12    60    231.9  <.0001
```

21.Evaluación de efectos simples – Coordenada L*

```
emmeans(mod.AR1, pairwise ~ tto|tiempo, adjust = "holm")
```

```
$emmeans
tiempo = 0:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1     56.5 0.301  4     55.7     57.4
 2     75.6 0.301  4     74.8     76.4
 3     83.5 0.301  4     82.6     84.3
 4     38.2 0.301  4     37.4     39.0
 5     41.1 0.301  4     40.3     42.0

tiempo = 15:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1     67.6 0.301  4     66.7     68.4
 2     74.9 0.301  4     74.1     75.8
 3     78.1 0.301  4     77.3     78.9
 4     49.6 0.301  4     48.8     50.5
 5     56.8 0.301  4     56.0     57.7

tiempo = 30:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1     67.2 0.301  4     66.4     68.0
 2     73.5 0.301  4     72.7     74.3
 3     80.5 0.301  4     79.6     81.3
 4     50.6 0.301  4     49.8     51.5
 5     59.8 0.301  4     59.0     60.6

tiempo = 45:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1     66.5 0.301  4     65.6     67.3
 2     76.6 0.301  4     75.8     77.5
 3     84.1 0.301  4     83.3     84.9
 4     47.6 0.301  4     46.8     48.5
 5     57.3 0.301  4     56.4     58.1

Degrees-of-freedom method: containment
Confidence level used: 0.95

$contrasts
tiempo = 0:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2   -19.08 0.423 16 -45.075  <.0001
 tto1 - tto3   -26.92 0.423 16 -63.614  <.0001
 tto1 - tto4    18.33 0.423 16  43.307  <.0001
 tto1 - tto5    15.41 0.423 16  36.417  <.0001
 tto2 - tto3    -7.85 0.423 16 -18.539  <.0001
 tto2 - tto4    37.40 0.423 16  88.382  <.0001
 tto2 - tto5    34.49 0.423 16  81.492  <.0001
 tto3 - tto4    45.25 0.423 16 106.921  <.0001
 tto3 - tto5    42.33 0.423 16 100.031  <.0001
 tto4 - tto5    -2.92 0.423 16  -6.890  <.0001

tiempo = 15:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    -7.35 0.423 16 -17.363  <.0001
 tto1 - tto3   -10.52 0.423 16 -24.853  <.0001
 tto1 - tto4    17.96 0.423 16  42.433  <.0001
 tto1 - tto5    10.76 0.423 16  25.434  <.0001
 tto2 - tto3    -3.17 0.423 16  -7.490  <.0001
 tto2 - tto4    25.31 0.423 16  59.796  <.0001
 tto2 - tto5    18.11 0.423 16  42.797  <.0001
 tto3 - tto4    28.48 0.423 16  67.286  <.0001
 tto3 - tto5    21.28 0.423 16  50.287  <.0001
 tto4 - tto5    -7.19 0.423 16 -16.999  <.0001

tiempo = 30:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    -6.29 0.423 16 -14.863  <.0001
 tto1 - tto3   -13.28 0.423 16 -31.379  <.0001
 tto1 - tto4    16.56 0.423 16  39.139  <.0001
 tto1 - tto5     7.41 0.423 16  17.509  <.0001
 tto2 - tto3    -6.99 0.423 16 -16.517  <.0001
 tto2 - tto4    22.85 0.423 16  54.002  <.0001
 tto2 - tto5    13.70 0.423 16  32.372  <.0001
 tto3 - tto4    29.84 0.423 16  70.518  <.0001
 tto3 - tto5    20.69 0.423 16  48.888  <.0001
 tto4 - tto5    -9.15 0.423 16 -21.630  <.0001

tiempo = 45:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2   -10.18 0.423 16 -24.045  <.0001
 tto1 - tto3   -17.62 0.423 16 -41.634  <.0001
 tto1 - tto4    18.85 0.423 16  44.550  <.0001
 tto1 - tto5     9.21 0.423 16  21.758  <.0001
 tto2 - tto3    -7.44 0.423 16 -17.589  <.0001
 tto2 - tto4    29.03 0.423 16  68.595  <.0001
 tto2 - tto5    19.38 0.423 16  45.802  <.0001
 tto3 - tto4    36.47 0.423 16  86.184  <.0001
 tto3 - tto5    26.83 0.423 16  63.392  <.0001
 tto4 - tto5    -9.65 0.423 16 -22.793  <.0001

Degrees-of-freedom method: containment
P value adjustment: holm method for 10 tests
```

22. Evaluación efectos principales de tratamiento – Coordenada L*

```
emmeans(mod.AR1, pairwise ~ tto, adjust = "holm")
```

```
NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions

$emmeans
 tto emmean     SE df lower.CL upper.CL
 1    64.45 0.1652  4    63.99    64.91
 2    75.17 0.1652  4    74.71    75.63
 3    81.53 0.1652  4    81.07    81.99
 4    46.52 0.1652  4    46.06    46.98
 5    53.75 0.1652  4    53.29    54.21

Results are averaged over the levels of: tiempo
Degrees-of-freedom method: containment
Confidence level used: 0.95
```

```
$contrasts
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2   -10.72 0.229 16 -46.848  <.0001
 tto1 - tto3   -17.09 0.229 16 -74.646  <.0001
 tto1 - tto4    17.93 0.229 16  78.320  <.0001
 tto1 - tto5    10.70 0.229 16  46.743  <.0001
 tto2 - tto3    -6.36 0.229 16 -27.798  <.0001
 tto2 - tto4    28.65 0.229 16 125.168  <.0001
 tto2 - tto5    21.42 0.229 16  93.590  <.0001
 tto3 - tto4    35.01 0.229 16 152.966  <.0001
 tto3 - tto5    27.78 0.229 16 121.389  <.0001
 tto4 - tto5    -7.23 0.229 16 -31.578  <.0001

Results are averaged over the levels of: tiempo
Degrees-of-freedom method: containment
P value adjustment: holm method for 10 tests
```

23. Ajuste de modelos para Coordenada a*: Simétrico compuesto, No estructurado, Autorregresivo de 1er orden

Inicialmente, se ajustan las 3 estructuras de covarianzas:

```
# Modelación simétrica compuesta ****
mod.SC <- lme(a ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corCompSymm(form = ~ 1|b/ue),
              data = data)


# Modelación no estructurada ****
mod.UN <- lme(a ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corSymm( form = ~ 1|b/ue),
              weights = varIdent(form = ~ 1|tiempo),
              control = lmeControl(msMaxIter = 1000, opt = "optim"),
              data = data)

# Modelación con estructura autorregresiva de 1er orden ****
mod.AR1 <- lme(a ~ tto * tiempo, random = ~1|b/ue,
               correlation = corAR1(form = ~1|b/ue),
               data = data)

# Comparación de modelos ****
anova(mod.SC, mod.UN, mod.AR1)
```

```
        Model df      AIC      BIC    logLik   Test  L.Ratio p-value
mod.SC      1 24 147.6105 204.7791 -49.80525
mod.UN      2 32 151.4018 227.6266 -43.70088 1 vs 2 12.20873  0.1421
mod.AR1     3 24 147.3770 204.5456 -49.68849 2 vs 3 11.97523  0.1523
```

Se elige el modelo AR1 por tener el BIC menor:

24.ANOVA Coordenada a mod.AR1

```
anova(mod.AR1)
```

```
            numDF denDF   F-value p-value
(Intercept)     1    60 28134.015  <.0001
tto             4    16  1409.485  <.0001
tiempo          3    60   169.875  <.0001
tto:tiempo     12    60    58.440  <.0001
```

25.Evaluación de efectos simples Coordenada a*

Se evalúan efectos simples:

```
emmeans(mod.AR1, pairwise ~ tto|tiempo, adjust = "holm")
```

```
$emmeans
tiempo = 0:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1     7.45 0.165  4    6.990     7.91
 2     3.47 0.165  4    3.008     3.92
 3     1.11 0.165  4    0.650     1.57
 4    12.23 0.165  4   11.772    12.69
 5    10.49 0.165  4   10.028    10.94

tiempo = 15:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1     6.66 0.165  4    6.200     7.12
 2     3.96 0.165  4    3.502     4.42
 3     1.38 0.165  4    0.924     1.84
 4     6.73 0.165  4    6.272     7.19
 5     7.23 0.165  4    6.770     7.69

tiempo = 30:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1     6.85 0.165  4    6.390     7.31
 2     5.04 0.165  4    4.582     5.50
 3     2.99 0.165  4    2.534     3.45
 4     7.91 0.165  4    7.454     8.37
 5     9.33 0.165  4    8.874     9.79

tiempo = 45:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1     7.79 0.165  4    7.334     8.25
 2     5.17 0.165  4    4.716     5.63
 3     2.62 0.165  4    2.160     3.08
 4    10.34 0.165  4    9.880    10.80
 5    10.94 0.165  4   10.478    11.39

Degrees-of-freedom method: containment
Confidence level used: 0.95
```

```
$contrasts
tiempo = 0:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    3.982 0.233 16  17.068  <.0001
 tto1 - tto3    6.340 0.233 16  27.174  <.0001
 tto1 - tto4   -4.782 0.233 16 -20.497  <.0001
 tto1 - tto5   -3.038 0.233 16 -13.021  <.0001
 tto2 - tto3    2.358 0.233 16  10.107  <.0001
 tto2 - tto4   -8.764 0.233 16 -37.564  <.0001
 tto2 - tto5   -7.020 0.233 16 -30.089  <.0001
 tto3 - tto4  -11.122 0.233 16 -47.671  <.0001
 tto3 - tto5   -9.378 0.233 16 -40.196  <.0001
 tto4 - tto5    1.744 0.233 16   7.475  <.0001

tiempo = 15:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    2.698 0.233 16  11.564  <.0001
 tto1 - tto3    5.276 0.233 16  22.614  <.0001
 tto1 - tto4   -0.072 0.233 16  -0.309  0.7616
 tto1 - tto5   -0.570 0.233 16  -2.443  0.0796
 tto2 - tto3    2.578 0.233 16  11.050  <.0001
 tto2 - tto4   -2.770 0.233 16 -11.873  <.0001
 tto2 - tto5   -3.268 0.233 16 -14.007  <.0001
 tto3 - tto4   -5.348 0.233 16 -22.923  <.0001
 tto3 - tto5   -5.846 0.233 16 -25.057  <.0001
 tto4 - tto5   -0.498 0.233 16  -2.135  0.0972

tiempo = 30:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    1.808 0.233 16   7.749  <.0001
 tto1 - tto3    3.856 0.233 16  16.528  <.0001
 tto1 - tto4   -1.064 0.233 16  -4.561  0.0003
 tto1 - tto5   -2.484 0.233 16 -10.647  <.0001
 tto2 - tto3    2.048 0.233 16   8.778  <.0001
 tto2 - tto4   -2.872 0.233 16 -12.310  <.0001
 tto2 - tto5   -4.292 0.233 16 -18.396  <.0001
 tto3 - tto4   -4.920 0.233 16 -21.088  <.0001
 tto3 - tto5   -6.340 0.233 16 -27.174  <.0001
 tto4 - tto5   -1.420 0.233 16  -6.086  <.0001

tiempo = 45:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    2.618 0.233 16  11.221  <.0001
 tto1 - tto3    5.174 0.233 16  22.177  <.0001
 tto1 - tto4   -2.546 0.233 16 -10.913  <.0001
 tto1 - tto5   -3.144 0.233 16 -13.476  <.0001
 tto2 - tto3    2.556 0.233 16  10.956  <.0001
 tto2 - tto4   -5.164 0.233 16 -22.134  <.0001
 tto2 - tto5   -5.762 0.233 16 -24.697  <.0001
 tto3 - tto4   -7.720 0.233 16 -33.089  <.0001
 tto3 - tto5   -8.318 0.233 16 -35.653  <.0001
 tto4 - tto5   -0.598 0.233 16  -2.563  0.0208

Degrees-of-freedom method: containment
P value adjustment: holm method for 10 tests
```

26. Ajuste de modelos para Coordenada b*: Simétrico compuesto, No estructurado, Autorregresivo de 1er orden

Inicialmente, se ajustan las 3 estructuras de covarianzas:

```
# Modelación simétrica compuesta ****
mod.SC <- lme(p.b ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corCompSymm(form = ~ 1|b/ue),
              data = data)


# Modelación no estructurada ****
mod.UN <- lme(p.b ~ tto * tiempo, random = ~ 1|b/ue,
              correlation = corSymm( form = ~ 1|b/ue),
              weights = varIdent(form = ~ 1|tiempo),
              control = lmeControl(msMaxIter = 1000, opt = "optim"),
              data = data)

# Modelación con estructura autorregresiva de 1er orden ****
mod.AR1 <- lme(p.b ~ tto * tiempo, random = ~1|b/ue,
               correlation = corAR1(form = ~1|b/ue),
               data = data)

# Comparación de modelos ****
anova(mod.SC, mod.UN, mod.AR1)
```

```
        Model df      AIC      BIC    logLik   Test  L.Ratio p-value
mod.SC      1 24 244.1633 301.3320 -98.08166
mod.UN      2 32 241.2569 317.4817 -88.62845 1 vs 2 18.90642  0.0154
mod.AR1     3 24 243.6304 300.7990 -97.81520 2 vs 3 18.37351  0.0186
```

Se elige el modelo AR1 por tener el BIC menor:

27. ANOVA Coordenada b* mod.AR1

```
anova(mod.AR1)
```

```
            numDF denDF   F-value p-value
(Intercept)     1    60 20779.078  <.0001
tto             4    16  1561.647  <.0001
tiempo          3    60   820.408  <.0001
tto:tiempo     12    60   137.086  <.0001
```

28.Evaluación de efectos simples – Coordenada b*

```
emmeans(mod.AR1, pairwise ~ tto|tiempo, adjust = "holm")
```

```
$emmeans
tiempo = 0:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1    13.67 0.312  4    12.81    14.54
 2     8.02 0.312  4     7.16     8.89
 3     4.60 0.312  4     3.74     5.47
 4    22.16 0.312  4    21.29    23.02
 5    23.40 0.312  4    22.54    24.27

tiempo = 15:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1    21.86 0.312  4    21.00    22.73
 2    11.72 0.312  4    10.86    12.59
 3     5.71 0.312  4     4.85     6.57
 4    14.54 0.312  4    13.67    15.40
 5    21.16 0.312  4    20.29    22.02

tiempo = 30:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1    20.15 0.312  4    19.28    21.01
 2    12.06 0.312  4    11.20    12.93
 3     7.28 0.312  4     6.41     8.14
 4    13.54 0.312  4    12.68    14.41
 5    22.26 0.312  4    21.39    23.12

tiempo = 45:
 tto emmean    SE df lower.CL upper.CL
 1    28.12 0.312  4    27.26    28.99
 2    16.60 0.312  4    15.74    17.47
 3     8.42 0.312  4     7.56     9.29
 4    23.12 0.312  4    22.25    23.98
 5    31.94 0.312  4    31.07    32.80

Degrees-of-freedom method: containment
Confidence level used: 0.95
```

```
$contrasts
tiempo = 0:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    5.648 0.426 16  13.264  <.0001
 tto1 - tto3    9.068 0.426 16  21.296  <.0001
 tto1 - tto4   -8.486 0.426 16 -19.929  <.0001
 tto1 - tto5   -9.732 0.426 16 -22.856  <.0001
 tto2 - tto3    3.420 0.426 16   8.032  <.0001
 tto2 - tto4  -14.134 0.426 16 -33.194  <.0001
 tto2 - tto5  -15.380 0.426 16 -36.120  <.0001
 tto3 - tto4  -17.554 0.426 16 -41.226  <.0001
 tto3 - tto5  -18.800 0.426 16 -44.152  <.0001
 tto4 - tto5   -1.246 0.426 16  -2.926  0.0099

tiempo = 15:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2   10.142 0.426 16  23.818  <.0001
 tto1 - tto3   16.154 0.426 16  37.938  <.0001
 tto1 - tto4    7.328 0.426 16  17.210  <.0001
 tto1 - tto5    0.706 0.426 16   1.658  0.1168
 tto2 - tto3    6.012 0.426 16  14.119  <.0001
 tto2 - tto4   -2.814 0.426 16  -6.609  <.0001
 tto2 - tto5   -9.436 0.426 16 -22.160  <.0001
 tto3 - tto4   -8.826 0.426 16 -20.728  <.0001
 tto3 - tto5  -15.448 0.426 16 -36.280  <.0001
 tto4 - tto5   -6.622 0.426 16 -15.552  <.0001

tiempo = 30:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2    8.082 0.426 16  18.981  <.0001
 tto1 - tto3   12.870 0.426 16  30.225  <.0001
 tto1 - tto4    6.604 0.426 16  15.509  <.0001
 tto1 - tto5   -2.112 0.426 16  -4.960  0.0003
 tto2 - tto3    4.788 0.426 16  11.245  <.0001
 tto2 - tto4   -1.478 0.426 16  -3.471  0.0032
 tto2 - tto5  -10.194 0.426 16 -23.941  <.0001
 tto3 - tto4   -6.266 0.426 16 -14.716  <.0001
 tto3 - tto5  -14.982 0.426 16 -35.185  <.0001
 tto4 - tto5   -8.716 0.426 16 -20.470  <.0001

tiempo = 45:
 contrast    estimate    SE df t.ratio p.value
 tto1 - tto2   11.520 0.426 16  27.055  <.0001
 tto1 - tto3   19.698 0.426 16  46.261  <.0001
 tto1 - tto4    5.004 0.426 16  11.752  <.0001
 tto1 - tto5   -3.814 0.426 16  -8.957  <.0001
 tto2 - tto3    8.178 0.426 16  19.206  <.0001
 tto2 - tto4   -6.516 0.426 16 -15.303  <.0001
 tto2 - tto5  -15.334 0.426 16 -36.012  <.0001
 tto3 - tto4  -14.694 0.426 16 -34.509  <.0001
 tto3 - tto5  -23.512 0.426 16 -55.218  <.0001
 tto4 - tto5   -8.818 0.426 16 -20.709  <.0001

Degrees-of-freedom method: containment
P value adjustment: holm method for 10 tests
```

29. Prueba t para Humedad, ceniza, proteína y azucares reductores:

Estadísticos descriptivos bromatológicos:

Variable	Tratamiento	N	media	SE	DE	CoefVar
Humedad %	tto 3	3	2,357	0,009	0,015	0,650
	tto 5	3	2,807	0,009	0,015	0,540
Ceniza %	tto 3	3	2,808	0,080	0,138	4,920
	tto 5	3	2,738	0,021	0,036	1,300
Proteína %	tto 3	3	0,336	0,053	0,092	27,300
	tto 5	3	0,496	0,069	0,119	24,060
Azucares reductores %	tto 3	3	8,380	0,306	0,530	6,330
	tto 5	3	7,167	0,277	0,480	6,700

Prueba T Student para bromatológicos

Análisis	Diferencia	Confianza 95%	Valor T	GL	Valor p
Humedad	-0,45	(-0,4846; -0,4154)	-36,08	4	<0,05
Ceniza	0,0695	(-0,2853; 0,4242)	0,84	2	0,488
Proteína	-0,1598	(-0,4366; 0,1170)	-1,84	3	0,163
Azucares reductores	1,213	(-0,101; 2,528)	2,94	3	0,061
Significancia p<0.05					

30. Prueba normalidad de Kolmogorov- Smirnov - prueba sensorial

	Variable	Test	Statistic	P Value
1	tto_1	Kolmogorov-Smirnov	0.2299	<0.001
2	tto_2	Kolmogorov-Smirnov	0.2883	<0.001
3	tto_3	Kolmogorov-Smirnov	0.3000	<0.001
4	tto_4	Kolmogorov-Smirnov	0.2071	<0.001
5	tto_5	Kolmogorov-Smirnov	0.3069	<0.001
Computed by R MVN package, version 5.9				

31. Prueba de Friedman

Hipótesis nula	Prueba no paramétrica	Resumen Friedman	
Las distribuciones de tto 1, tto 2, tto 3, tto 4 y tto 5 son iguales.	Prueba de Friedman para muestras relacionadas para análisis de la varianza de dos factores por rangos	N	90
		Chi-Cuadrado	74,88
		Gr. Libertad	4
		Sig. asin.	<,001

*Significancia valor p<0.05.

32.Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

Rangos

		N	Rango promedio	Suma de rangos
tto_2 - tto_1	Rangos negativos	27[a]	27,50	742,50
	Rangos positivos	63[b]	53,21	3352,50
	Empates	0[c]		
	Total	90		
tto_3 - tto_1	Rangos negativos	9[d]	63,50	571,50
	Rangos positivos	81[e]	43,50	3523,50
	Empates	0[f]		
	Total	90		
tto_4 - tto_1	Rangos negativos	36[g]	27,50	990,00
	Rangos positivos	54[h]	57,50	3105,00
	Empates	0[i]		
	Total	90		
tto_5 - tto_1	Rangos negativos	45[j]	48,20	2169,00
	Rangos positivos	45[k]	42,80	1926,00
	Empates	0[l]		
	Total	90		
tto_3 - tto_2	Rangos negativos	18[m]	56,75	1021,50
	Rangos positivos	72[n]	42,69	3073,50
	Empates	0[o]		
	Total	90		
tto_4 - tto_2	Rangos negativos	54[p]	39,50	2133,00
	Rangos positivos	36[q]	54,50	1962,00
	Empates	0[r]		
	Total	90		
tto_5 - tto_2	Rangos negativos	72[s]	41,00	2952,00
	Rangos positivos	18[t]	63,50	1143,00
	Empates	0[u]		
	Total	90		
tto_4 - tto_3	Rangos negativos	45[v]	66,20	2979,00
	Rangos positivos	45[w]	24,80	1116,00
	Empates	0[x]		
	Total	90		
tto_5 - tto_3	Rangos negativos	72[y]	51,69	3721,50
	Rangos positivos	18[z]	20,75	373,50
	Empates	0[aa]		
	Total	90		
tto_5 - tto_4	Rangos negativos	54[ab]	51,50	2781,00
	Rangos positivos	36[ac]	36,50	1314,00
	Empates	0[ad]		
	Total	90		

a. tto_2 < tto_1
b. tto_2 > tto_1
c. tto_2 = tto_1
d. tto_3 < tto_1
e. tto_3 > tto_1
f. tto_3 = tto_1
g. tto_4 < tto_1
h. tto_4 > tto_1
i. tto_4 = tto_1
j. tto_5 < tto_1
k. tto_5 > tto_1
l. tto_5 = tto_1
m. tto_3 < tto_2
n. tto_3 > tto_2
o. tto_3 = tto_2
p. tto_4 < tto_2
q. tto_4 > tto_2
r. tto_4 = tto_2
s. tto_5 < tto_2
t. tto_5 > tto_2
u. tto_5 = tto_2
v. tto_4 < tto_3
w. tto_4 > tto_3
x. tto_4 = tto_3
y. tto_5 < tto_3
z. tto_5 > tto_3
aa. tto_5 = tto_3
ab. tto_5 < tto_4
ac. tto_5 > tto_4
ad. tto_5 = tto_4

Bibliografía

Abd-Talib, N., Hamidah Mohd-Setapar, S., Kamal Khamis, A., Nian-Yian, L., & Aziz, R. (2013). Survival of encapsulated probiotics through spray drying and non-refrigerated storage for animal feeds application. *Agricultural Sciences*, *04*(05), 78–83. https://doi.org/10.4236/as.2013.45B015

Ahmad, W., Nasir, A., Sattar, F., Ashfaq, I., Chen, M. H., Hayat, A., Rehman, M. ur, Zhao, S., Khaliq, S., Ghauri, M. A., & Anwar, M. A. (2022). Production of bimodal molecular weight levan by a Lactobacillus reuteri isolate from fish gut. *Folia Microbiologica*, *67*(1), 21–31. https://doi.org/10.1007/S12223-021-00913-W/METRICS

Akbarbaglu, Z., Peighambardoust, S. H., Sarabandi, K., & Jafari, S. M. (2021). Spray drying encapsulation of bioactive compounds within protein-based carriers; different options and applications. In *Food Chemistry* (Vol. 359). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129965

Alarcón, Á. L., Orjuela, A., Narváez, P. C., & Camacho, E. C. (2020). Thermal and Rheological Properties of Juices and Syrups during Non-centrifugal Sugar Cane (Jaggery) Production. *Food and Bioproducts Processing*, *121*, 76–90. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.01.016

Algaithi, M., Mudgil, P., Hamdi, M., Redha, A. A., Ramachandran, T., Hamed, F., & Maqsood, S. (2022). Lactobacillus reuteri-fortified camel milk infant formula: Effects of encapsulation, in vitro digestion, and storage conditions on probiotic cell viability and physicochemical characteristics of infant formula. *J Dairy Sci*, *105*(11), 8621–8637. https://doi.org/10.3168/jds.2022-22008

Anandharamakrishnan, C. ., & Ishwarya, S. Padma. (2015). *Spray drying techniques for food ingredient encapsulation*. Wiley-Blackwell, IFT Press.

Angnunavuri, P. N., Attiogbe, F., & Mensah, B. (2022). Effect of storage on the levels of phthalates in high-density polyethylene (HDPE) film-packaged drinking water. *Science of The Total Environment*, *845*, 157347. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157347

AOAC. (1990). *OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS* (Fifteenth).

Aponte, D. J. (2020). *Elaboración y evaluación sensorial de un yogur probiotico tipo batido, endulcorado con panela granulada orgánica y aromatizado con concentrado de café orgánico*. Universidad Catolica sedes Sapientiae.

Arenales, I. M. (2019). *Control de pH interno de microcápsulas para la proteccion de probioticos ante condiciones gastrointestinales simuladas.* Universidad Autónoma de Chapingo.

Arepally, D., Sudharshan Reddy, R., Coorey, R., & Goswami, T. K. (2023). Modelling inactivation kinetics of free and encapsulated probiotic cells in millet biscuit under different baking conditions. *Food Res Int*, *174*, 113573. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113573

Asfaq, & Chand, K. (2020). Effect of Moisture Absorber and High-Density Polyethylene Bags on Shelf Life of Edible Coated Jaggery Cubes During Storage. *Sugar Tech*, *22*(6), 1130–1137. https://doi.org/10.1007/s12355-020-00849-4

Asfaq, Chand, K., Nasir, G., Hussain, A., Bisht, B., upadhyay, S., Ahmad, S., & Kumar, S. (2023). Numerical optimization of process parameters and quality stability of active edible coated jaggery cubes during storage. *Journal of Agriculture and Food Research*, *14*(June). https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100790

Aydın, A., Yüceer, M., Ulugergerli, E., & Caner, C. (2024). Improving food security as disaster relief using intermediate moisture foods and active packaging technologies. *Applied Food Research*, *4*(1). https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100378

Badin, R., Gaiani, C., Desobry, S., Prakash, S., Bhandari, B., & Burgain, J. (2023). *Food Hydrocolloids Dynamic investigation of maltodextrins surface properties by environmental atomic force microscopy*. *145*(July). https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109081

Barajas-Álvarez, P., González-Ávila, M., & Espinosa-Andrews, H. (2022). Microencapsulation of Lactobacillus rhamnosus HN001 by spray drying and its evaluation under gastrointestinal and storage conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *153*, 112485. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112485

Barbosa-Cánovas, G. V, Board, A., Hartel, R. W., Peleg, M., Rahman, S., University, Q., & Rao, O. M. A. (2021). *Food Powders Properties and Characterization* (E. Ermiş, Ed.). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48908-3

Barrera, C., Betoret, N., & Seguí, L. (2024). Potential of vacuum impregnation and osmotic dehydration techniques in producing jaggery-fortified apple snacks. *Sustainable Food Technology*, *2*(4), 1041–1051. https://doi.org/10.1039/d3fb00255a

Behboudi-jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I., Jobbehdar, S. B., Yonekura, L., Fisk, I., Behboudi-jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., & Fisk, I. (2013). *Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated L . acidophilus NCIMB 701748 Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated*. *3937*. https://doi.org/10.1080/07373937.2013.788509

Bello, D., Carrera, E., & Díaz, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *Sobre Los*

Derivados de La Caña de Azúcar, *2*, 45–50. https://doi.org/https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006

Beltrán Martínez, C. (2020a). *EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA GESTIÓN DE LOS RESIDUOS DE LA PRODUCCIÓN PANELERA (CACHAZA) EN LA VEREDA NACEDEROS MUNICIPIO DE QUEBRADANEGRA-CUNDINAMARCA*.

Beltrán Martínez, C. (2020b). *EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA GESTIÓN DE LOS RESIDUOS DE LA PRODUCCIÓN PANELERA (CACHAZA) EN LA VEREDA NACEDEROS MUNICIPIO DE QUEBRADANEGRA-CUNDINAMARCA*. www.ucundinamarca.edu.co

Bhandari, B., Bansal, N., Zhang, M., & Schuck, P. (2013). *Handbook of food powders* (B. Bhandari, N. Bansal, M. Zhang, & P. Schuck, Eds.; 1st ed.). Woodhead Publishing. www.woodheadpublishing.com

Bhola, J., & Bhadekar, R. (2024). Prebiotic effect of daily dietary polyphenols and oligosaccharides on lactobacillus species. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *31*, 100407. https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2024.100407

Bian, L., Molan, A.-L., Maddox, I., & Shu, Q. (2011). Antimicrobial activity of Lactobacillus reuteri DPC16 supernatants against selected food borne pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(4), 991–998. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0543-z

Bilodeau, M., Bouin, M., & Ghia, J.-E. (2022). The Digestive System: From Basic Sciences to Clinical Practice. In P. Poitras & M. Bouin (Eds.), *The Digestive System: from Basic Sciences to Clinical Practice* (0th ed.). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-98381-9

Bolaños-Cardona, L. C., Briñez-Javela, I. A., & Ramírez-Navas, J. S. (2018). Evaluación termodinámica de variables críticas en la Estabilidad de la panela de caña de azúcar. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, *14*(2), 100–110. https://doi.org/10.18359/rfcb.3167

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., … Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1

Cai, Y., Puangpen, S., Premsuda, S., & Benno, Y. (1999). Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *45*(4), 177–184. https://doi.org/10.2323/JGAM.45.177

Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., & Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *6*(4), 420–428. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003

Ceballos, A. M., Giraldo, G. I., & Orrego, C. E. (2012). Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *J Food Eng*, *111*(2), 360–365. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2012.02.010

Chand, K., Verma, A. K., Kumar, A., & Shahi, N. C. (2014). Effect of Edible Coating on Quality Parameters of Jaggery During Storage. *Sugar Tech*, *16*(1), 80–85. https://doi.org/10.1007/s12355-013-0244-7

CHARM SCIENCES INC. (2021). *Charm ® Peel Plate ® Microbial Tests Family Brochure "Charm Peel Plate Microbial*. https://www.charm.com/wp-content/uploads/2022/09/MRK-1052_email.pdf

Chen, G., & Chen, J. (2013). A novel cell modification method used in biotransformation of glycerol to 3-HPA by Lactobacillus reuteri. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(10), 4325–4332. https://doi.org/10.1007/s00253-013-4723-2

Civille, G. V., & Carr, B. T. (2015). *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press. https://doi.org/10.1201/b19493

Crueger, W., & Crueger, A. (1993). *Industrial microbiology manual.* Acribia.

Dahl, T. A., Midden, W. R., & Hartman, P. E. (1989). Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of Bacteriology*, *171*(4), 2188–2194. https://doi.org/10.1128/jb.171.4.2188-2194.1989

Delgado, P., & Bañón, S. (2018). Effects of replacing starch by inulin on the physicochemical, texture and sensory characteristics of gummy jellies. *CyTA - Journal of Food*, *16*(1), 1–10. https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1327462

Divyashree, S., Ramu, R., & Sreenivasa, M. Y. (2024). Evaluation of new candidate probiotic lactobacillus strains isolated from a traditional fermented food- multigrain-millet dosa batter. *Food Biosci*, *57*(December 2023), 103450. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103450

El-Enshasy, H. A., & Yang, S.-T. (2021). Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms. In *Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms* (1st ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781351027540

Essa, M. M., Bishir, M., Bhat, A., Saravana, C., Al-Balushi, B., Hamdan, H., Govindarajan, N., Freidland, R., & Walid Qoronfleh, M. (2023a). Functional foods and their impact on health. *Journal of Food Science and Technology*, *60*(3). https://doi.org/10.1007/s13197-021-05193-3

Essa, M. M., Bishir, M., Bhat, A., Saravana, C., Al-Balushi, B., Hamdan, H., Govindarajan, N., Freidland, R., & Walid Qoronfleh, M. (2023b). Functional foods and their impact on health. *Journal of Food Science and Technology*, *60*(3). https://doi.org/10.1007/s13197-021-05193-3

FAO & OMS. (2018). DOCUMENTO DE DEBATE SOBRE LAS DIRECTRICES ARMONIZADAS SOBRE EL USO DE PROBIÓTICOS EN ALIMENTOS Y COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS. In *Comisión del Codex Alimentarius*. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/ar/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-720-40%252FWD%252Fnf40_12s.pdf

FEDEPANELA. (2022, May 31). *Estas son las marcas locales que le están dando una nueva vida a la tradicional panela*. https://fedepanela.org.co/gremio/estas-son-las-marcas-locales-que-le-estan-dando-una-nueva-vida-a-la-tradicional-panela/

Fennema, O., Damodaran, S., & Parkin, K. (2017). *Fennema´s Food Chemistry* (Fifth). Taylor & Francis Group. https://lccn.loc.gov/2016027062

Floch, M., Ringel, Y., & Walker, A. (2017). *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* (1st ed.). Elsevier.

Fredes, C., Becerra, C., Parada, J., & Robert, P. (2018). The Microencapsulation of Maqui (Aristotelia chilensis (Mol.) Stuntz) Juice by Spray-Drying and Freeze-Drying Produces Powders with Similar Anthocyanin Stability and Bioaccessibility. *Molecules*, *23*(5), 1227. https://doi.org/10.3390/molecules23051227

Freire, T. T., Silva, A. L. T. e, Ferreira, B. K. O., & Santos, T. M. dos. (2021). Lactic acid bacteria its characteristics and importance: review. *Research, Society and Development*, *10*(11), e513101119964–e513101119964. https://doi.org/10.33448/RSD-V10I11.19964

Freudig, B., Hogekamp, S., & Schubert, H. (1999). Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, *4–6*(38), 525–532. https://www.infona.pl//resource/bwmeta1.element.elsevier-33e81bfd-56c5-3670-897d-8ebf9cea4cb8

Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Res Int*, *45*(1), 306–312. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.09.020

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. In *Food Research International* (Vol. 40, Issue 9, pp. 1107–1121). https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *14*(8), 491–502. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75

Gichau, A. W., Okoth, J. K., & Makokha, A. (2020). Moisture sorption isotherm and shelf life prediction of complementary food based on amaranth–sorghum grains. *Journal of Food Science and Technology*, *57*(3), 962–970. https://doi.org/10.1007/s13197-019-04129-2

Gojiya, D., Gohil, V., Dabhi, M., & Dhamsaniya, N. (2024). Storage stability of jaggery based sesame spread: A comprehensive study. *Journal of Stored Products Research*, *107*. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2024.102350

Gonzales-Cuello, R., Perez-Mendoza, J., & Morón-Alcazar, L. (2015). Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de Lactobacillus delbrueckii sometido a Jugos Gástricos Simulados. *Información Tecnológica*, *26*(5), 11–16. https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000500003

González, E., Gómez-Caravaca, A. M., Giménez, B., Cebrián, R., Maqueda, M., Parada, J., Martínez-Férez, A., Segura-Carretero, A., & Robert, P. (2020). Role of maltodextrin and inulin as encapsulating agents on the protection of oleuropein during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem*, *310*, 125976. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125976

Goranov, B., Denkova-Kostova, R., Denkova, Z., & Kostov, G. (2023). Growth kinetics of probiotic lactobacilli strains cultivated in a laboratory bioreactor with stirring. *BIO Web of Conferences*, *58*, 3–7. https://doi.org/10.1051/bioconf/20235802003

Guarner, F., Ellen Sanders, M., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., Kaufmann, P., Karakan, T., Khan, A. G., Kim, N., Andrés De Paula, J., Ramakrishna, B., Shanahan, F., Szajewska, H., Thomson, A., & Le Mair, A. (2017). Probióticos y prebióticos. In *Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología Probióticos y prebióticos*.

Guerrero, M., Guzmán S, S., Yandar B, N., & Pazos M, A. (2002). Efecto inhibitorio de Lactobacillus Acidophilus SOBRE EL ENTEROPATOGENO Vibrio Cholerae 01 OGAWA, in vitro. *Universidad y Salud*, *1*(3), 8–14. https://revistas.udenar.edu.co/index.php/usalud/article/view/314/pdf

Gupta, E., Mishra, P., Mishra, N., Singh, P., & Sheikh, A. (2023a). Topic: Utilization of fruit peel for the development of functional fruit peel bar. *Food Chemistry Adv*, *2*(June 2022), 0–5. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100310

Gupta, E., Mishra, P., Mishra, N., Singh, P., & Sheikh, A. (2023b). Topic: Utilization of fruit peel for the development of functional fruit peel bar. *Food Chemistry Adv*, *2*(June 2022), 0–5. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100310

Gutiérrez, L. F., Arias, S., Garzón, D., López Velasco, D. M., & Osorio Alturo, A. (2014). Transición vítrea en alimentos: sistemas binarios agua-carbohidratos. *Revista Vector*, *9*, 21–28. http://vector.ucaldas.edu.co/downloads/Vector9_4.pdf

Hadinia, N., Edalatian Dovom, M. R., & Yavarmanesh, M. (2022). The effect of fermentation conditions (temperature, salt concentration, and pH) with lactobacillus strains for producing Short Chain Fatty Acids. *LWT - Food Science and Technology*, *165*(June), 113709. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113709

Hasler, C. M., & Brown, A. C. (2009). Position of the American Dietetic Association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, *109*(4), 735–746. https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.02.023

Hutkins, R. (2019). *Microbiology and Technology of Fermented Food* (Wiley Blac, Vol. 2). John Wiley & Sons, Inc.

ICONTEC. (2009). Productos Agrícolas Panela. In *Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación* (NTC 1311).

Jackson, P. P., Wijeyesekera, A., Theis, S., van Harsselaar, J., & Rastall, A. R. (2022). Food for thought! Inulin-type fructans: Does the food matrix matter? *J Funct Foods*, *90*(January), 104987. https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104987

Jia, J., Zhang, X., Jia, X., Duan, J., Wu, Z., Deng, X., & Ge, J. (2025). Lactic acid fermentation improves rehydration and emulsifying properties of spray-dried egg yolk powder. *Food Chemistry*, *463*(September 2024). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141352

Jiang, A., & Westland, S. (2024). *Colour Measurement* (pp. 33–48). https://doi.org/10.1007/978-3-031-70920-3_3

Ju, J. H., Jeon, S. G., Heo, S. Y., Kim, J. S., Jo, M. H., Kim, M. S., Kim, C. H., & Oh, B. R. (2023). Synbiotics production using Lactobacillus reuteri EC01, a strain that produces alternan-type exopolysaccharide. *LWT - Food Science and Technology*, *182*(April), 114814. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114814

Jurado-Gámez, H. A., Cerón-Córdoba, J. F., & Bolaños-Bolaños, J. (2023). Effect of microencapsulated Lactobacillus reuteri under simulated gastric conditions and its inhibition on Listeria monocytogenes. *Revista de Ciencias Agrícolas*, *40*(1), e1202. https://doi.org/10.22267/rcia.20234001.202

Jurado-Gámez, H., Ramírez, C., & Aguirre, D. (2013). Cinética de fermentación de Lactobacillus plantarum en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. *Veterinaria y Zootecnía*, *7*(2), 37–53.

Kanauchi, M. (2019). *Lactic Acid Bacteria: Methods and Protocols* (Vol. 1887).

Karasawa, M. M. G., & Mohan, C. (2018a). Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review. *Natural Products and Bioprospecting*, *8*(5), 335–346. https://doi.org/10.1007/s13659-018-0186-6

Karasawa, M. M. G., & Mohan, C. (2018b). Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review. *Natural Products and Bioprospecting*, *8*(5), 335–346. https://doi.org/10.1007/s13659-018-0186-6

Kawai, K., Fukami, K., Thanatuksorn, P., Viriyarattanasak, C., & Kajiwara, K. (2011). Effects of moisture content, molecular weight, and crystallinity on the glass transition temperature of inulin. *Carbohydrate Polymers*, *83*(2), 934–939. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.001

Kent, R. M., & Doherty, S. B. (2014). Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *FRIN*, *64*, 567–576. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.029

Kheto, A., Bist, Y., Awana, A., Kaur, S., Kumar, Y., & Sehrawat, R. (2023). Utilization of inulin as a functional ingredient in food : Processing , physicochemical characteristics , food applications , and future research directions. *Food Chemistry Adv*, *3*(March), 100443. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100443

Kingwatee, N., Apichartsrangkoon, A., Chaikham, P., Worametrachanon, S., Techarung, J., & Pankasemsuk, T. (2015). Spray drying Lactobacillus casei 01 in lychee juice varied carrier materials. *LWT*, *62*(1), 847–853. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.007

Kong, X. P., Yang, Q., Wang, Q. L., & Chen, H. Q. (2024). Effects of ball milling treated wheat flour and maltodextrin on the texture and oil absorption properties of fried batter-coated cashews and almonds. *Food Chemistry*, *460*, 140627. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140627

Kontogiorgos, V. (2024). Colour Chemistry. In *Introduction to Food Chemistry* (pp. 131–146). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-53558-1_7

Kumar, A., & Singh, S. (2020a). The benefit of Indian jaggery over sugar on human health. *Dietary Sugar, Salt and Fat in Human Health*, 347–359. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816918-6.00016-0

Kumar, A., & Singh, S. (2020b). The benefit of Indian jaggery over sugar on human health. *Dietary Sugar, Salt and Fat in Human Health*, 347–359. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816918-6.00016-0

Kurozawa, L. E., Park, K. J., & Hubinger, M. D. (2009). Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. *Journal of Food Engineering*, *94*(3–4), 326–333. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.03.025

Lacerda, E. C. Q., Calado, V. M. D. A., Monteiro, M., Finotelli, P. V., Torres, A. G., & Perrone, D. (2016). Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 500–510. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.093

Larrea, V., Morell, P., Quiles, A., & Hernando, I. (2023). *Alimentos funcionales: probióticos, prebióticos y simbióticos*. Universidad Politecnica de Valencia.

Laureanti, E. J. G., Paiva, T. S., de Matos Jorge, L. M., & Jorge, R. M. M. (2023). Microencapsulation of bioactive compound extracts using maltodextrin and gum arabic by spray and freeze-drying techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, *253*(September), 126969. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126969

Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food* (Second Edition). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6488-5

Lee, J. S., Ramalingam, S., Jo, I. G., Kwon, Y. S., Bahuguna, A., Oh, Y. S., Kwon, O. J., & Kim, M. (2018). Comparative study of the physicochemical, nutritional, and antioxidant properties of some commercial refined and non-centrifugal sugars. *Food Res Int*, *109*, 614–625. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.047

Lepsien, A., Jüptner, A., Scherließ, R., & Schaum, A. (2024). Control oriented modeling for particle size distributions in a spray drying process. *IFAC-PapersOnLine*, *58*(15), 438–443. https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2024.08.568

Liu, Z., Liu, M., Meng, J., Wang, L., & Chen, M. (2024). A review of the interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on associated disease. *Journal of Future Foods*, *4*(3), 221–232. https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.07.004

Lorenzoni, G., Araújo, M. De, José, A., Queiroz, L., Jacob, E., Smanioto, J., Marlon, É., Flores, D. M., Bona, C. De, Ragagnin, C., & Menezes, D. (2018). Inulin, hi-maize , and trehalose as thermal protectants for increasing viability of Lactobacillus acidophilus encapsulated by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *89*(May 2017), 128–133.

Luo, Y., De Souza, C., Ramachandran, M., Wang, S., Yi, H., Ma, Z., Zhang, L., & Lin, K. (2022). Precise oral delivery systems for probiotics: A review. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 352, pp. 371–384). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.10.030

Luzzi, A., Briata, I. M., Di Napoli, I., Giugliano, S., Di Sabatino, A., Rescigno, M., & Cena, H. (2024). Prebiotics, probiotics, synbiotics and postbiotics to adolescents in metabolic syndrome. *Clin Nutr*, *43*(6), 1433–1446. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2024.04.032

Mahdavee Khazaei, K., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Hemmati Kakhki, A. (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and

evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers*, *105*(1), 57–62. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.042

Marcial-Coba, M. S., Saaby, L., Knøchel, S., & Nielsen, D. S. (2019). Dark chocolate as a stable carrier of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus casei* . *FEMS Microbiology Letters*, *366*(2). https://doi.org/10.1093/femsle/fny290

Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *18*, 196–208. https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5

Marefati, A., Pitsiladis, A., Oscarsson, E., Ilestam, N., & Bergenståhl, B. (2021). Encapsulation of Lactobacillus reuteri in W1/O/W2 double emulsions: Formulation, storage and in vitro gastro-intestinal digestion stability. *LWT - Food Science and Technology*, *146*, 111423. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111423

May-Torruco, L. A., Corona-Cruz, A. I., Luna-Jiménez, A. L., González-Cortés, N., & Jiménez-Vera, R. (2020). Sensibilidad y Resistencia a Antibióticos de Cepas Probióticas Empleadas en Productos Comerciales. *European Scientific Journal*, *16*(18), 43–60. https://doi.org/10.19044/esj.2020.v16n18p43

Meldrum, O. W., & Yakubov, G. E. (2024). Journey of dietary fiber along the gastrointestinal tract: role of physical interactions, mucus, and biochemical transformations. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2390556

Minj, S., & Anand, S. (2022). Development of a spray-dried conjugated whey protein hydrolysate powder with entrapped probiotics. *J. Dairy Sci.*, *105*(3), 2038–2048. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20978

Mizrahi, S. (2011). Accelerated shelf life testing of foods. In *Food and Beverage Stability and Shelf Life* (pp. 482–506). Elsevier. https://doi.org/10.1533/9780857092540.2.482

Mohamadzadeh, M., Fazeli, A., Vasheghani-Farahani, E., & Shojaosadati, S. A. (2025). Viability and stability evaluation of microencapsulated Lactobacillus reuteri in polysaccharide-based bionanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, *347*(August 2024). https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122693

Montes C, A., Santacruz B, A., Sañudo D, J., & Pazos M, A. (2003). Efecto in vitro de Lactobacillus casei subsp rhamnosus sobre el crecimiento de un aislado de Heicobacter pylori. *Revista Del Centro de Estudios En Salud*, *1*(4), 5–12. https://revistas.udenar.edu.co/index.php/usalud/article/view/302/pdf

Montes-Ramírez, L. M. (2013). *Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (Lactobacillus casei ATCC 393 y Lactobacillus rhamnosus ATCC 9469)*. https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/11893

Morales-Ramos, V., Osorio-Mirón, A., & Rodríguez-Campos, J. (2017). Innovaciones En El Trapiche Panelero: La Producción De Panela Granulada. *Agro Productividad*, *10*(11), 41–47. https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/67

Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of Lactobacillus reuteri in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*, *9*(APR), 757. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757

Nath, A., Dutta, D., Kumar, P., & Singh, J. (2015). Review on Recent Advances in Value Addition of Jaggery based Products. *Journal of Food Processing & Technology*, *06*(04), 4–7. https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000440

Nebesny, E., Żyżelewicz, D., Motyl, I., & Libudzisz, Z. (2007). Dark chocolates supplemented with Lactobacillus strains. *European Food Research and Technology*, *225*(1), 33–42. https://doi.org/10.1007/s00217-006-0379-9

Oluwatosin, S. O., Tai, S. L., & Fagan-Endres, M. A. (2022). Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic – towards a freeze dried Lactobacillus plantarum topical probiotic. *Biotechnol Rep*, *33*, e00696. https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00696

Paim, D. R. S. F., Costa, S. D. O., Walter, E. H. M., & Tonon, R. V. (2016). Microencapsulation of probiotic jussara (Euterpe edulis M.) juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *74*, 21–25. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.022

Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A.-J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(1), 36–60. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9

Paulo, E. M., Vasconcelos, M. P., Oliveira, I. S., Affe, H. M. de J., Nascimento, R., de Melo, I. S., Roque, M. R. de A., & de Assis, S. A. (2012). An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Food Science and Technology*, *32*(4), 710–714. https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000094

Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M. A., & Gruss, A. (2012). Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*(1), 37–58. https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101255

Peighambardoust, S. H., Golshan Tafti, A., & Hesari, J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(5), 215–224. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.009

Pérez-Martínez, P., Ros, E., Pedro-Botet, J., Civeira, F., Pascual, V., Garcés, C., Solá, R., Pérez-Jiménez, F., & Mostaza, J. M. (2023). Functional foods and nutraceuticals in the treatment of hypercholesterolemia: Statement of the Spanish Society of Arteriosclerosis 2023. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis (English Edition)*, *35*, 248–261. https://doi.org/10.1016/j.artere.2023.09.003

Perez-Sanchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., & Balcazar, J. L. (2013). Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture*, *5*, 1–14. https://doi.org/10.1111/raq.12033

Pimentel, T. C., Gomes da Cruz, A., & Deliza, R. (2016). Sensory Evaluation: Sensory Rating and Scoring Methods. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 744–749). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00617-6

Qiao, F., Wang, S., He, J., Hung, W., Ma, X., Gong, P., Li, J., Sun, T., De Souza, C., Zhang, L., & Lin, K. (2024). Investigating the role of membrane lipid composition differences on spray drying survival in Lactobacillus bulgaricus using non-targeted Lipidomics. *Food Chem*, *459*(April), 140336. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140336

Qiu, L., Zhang, M., Tang, J., Adhikari, B., & Cao, P. (2019). Innovative technologies for producing and preserving intermediate moisture foods: A review. *Food Research International*, *116*, 90–102. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.055

Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of Lactobacillus plantarum (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *60*(2), 773–780. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062

Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Hayat, H. F., Hussain, N., Sarwar, S., Aslam, H., Nadeem, A., & Shi, J. (2019a). Characterization, the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Exopolysaccharide Isolated from Poultry Origin Lactobacilli. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*(4), 1132–1142. https://doi.org/10.1007/S12602-018-9494-8

Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Hayat, H. F., Hussain, N., Sarwar, S., Aslam, H., Nadeem, A., & Shi, J. (2019b). Characterization, the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Exopolysaccharide Isolated from Poultry Origin Lactobacilli. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*(4), 1132–1142. https://doi.org/10.1007/S12602-018-9494-8

Ramírez, H. (2018). *DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE CHOCOLATE EDULCORADO CON PANELA Y RELLENO CON NUEZ DE NOGAL (Juglans neotropica)*. UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS.

Ramírez, N. F., Keefe, G., Dohoo, I., Sánchez, J., Arroyave, O., Cerón, J., Jaramillo, M., & Palacio, L. G. (2014). Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *J Dairy Sci*, *97*(7), 4141–4150. https://doi.org/10.3168/JDS.2013-6815

Rasane, P., Jha, A., & Sharma, N. (2015). Predictive modelling for shelf life determination of nutricereal based fermented baby food. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(8), 5003–5011. https://doi.org/10.1007/s13197-014-1545-x

Rezaei, M., & Netz, R. R. (2021). Water evaporation from solute-containing aerosol droplets: Effects of internal concentration and diffusivity profiles and onset of crust formation. *Physics of Fluids*, *33*(9). https://doi.org/10.1063/5.0060080

Rios-Aguirre, S., & Gil-Garzón, M. A. (2021). Microencapsulación por secado por aspersión de compuestos bioactivos en diversas matrices: una revisión. *TecnoLógicas*, *24*(51), e1836. https://doi.org/10.22430/22565337.1836

Robertson, G. L. . (2013). *Food packaging : principles and practice* (3rd ed.). CRC Press.

Rodriguez, G., Polo, S., Riveros, M., & Buitrago, A. (2019). *La Agroindustria Panelera Impulsando El Desarrollo Rural En Colombia* (p. 66). Fedepanela - AGROSAVIA.

Rodríguez-Barona, Sneyder., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebioticos. *Información Tecnológica*, *27*(6), 135–144. https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014

Roselen, M. D., Weber, F., Diaz de Oliverira, P., Rochedo, F., Scherer, R., Fiorentini, A. M., Padilha da Silva, W., & Pieniz, S. (2019). Symbiotic microencapsulation of Lactococcus lactis subsp. lactis R7 using whey and inulin by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *115*(July), 108411. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108411

Saavedra–Leos, M. Z., Leyva-Porras, C., Alvarez-Salas, C., Longoria-Rodríguez, F., López-Pablos, A. L., González-García, R., & Pérez-Urizar, J. T. (2018). Obtención de polvos de jugo de naranja-maltodextrina sin colapso estructural basado en la temperatura de transición vítrea y grado de polimerización. *CYTA J Food*, *16*(1), 61–69. https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1337048

Sablania, V., Basak, S., & Bosco, S. J. D. (2023). Effect of spray drying on physical, structural, and functional properties of Murraya koenigii leaf extract. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *17*(5), 4672–4683. https://doi.org/10.1007/s11694-023-01992-8

Samakradhamrongthai, R. S., Maneechot, S., Wangpankhajorn, P., Jannu, T., & Renaldi, G. (2022). Polydextrose and guar gum as a fat substitute in rice cookies and its physical, textural, and sensory properties. *Food Chemistry Adv*, *1*(May), 100058. https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100058

Sánchez, L., Omura, M., Lucas, A., Pérez, T., & Ferreira, C. de L. (2015). Cepas de Lactobacillus spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Rev. Salud Animal*, *37*(2), 94–104. http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v37n2/rsa04215.pdf

Sanchez, N., Cobo, M., Rodríguez-Fontalvo, D., Ruiz-Pardo, R. Y., & Roedl, A. (2024). Unlocking sustainable solutions: Harnessing residual biomass from Colombia's non-centrifugal sugar chain for green market deployment. *Bioresource Technology Reports*, *26*(May), 101858. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101858

Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(1), 1–13. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x

Santos, N. C., Almeida, R. L. J., Albuquerque, J. C., de Andrade, E. W. V., Gregório, M. G., Santos, R. M. S., Rodrigues, T. J. A., Carvalho, R. de O., Gomes, M. M. de A., Moura, H. V., de Figueiredo, D. V. P., Araújo, M. A., Lima, V. R. do N., & Mota, M. M. de A. (2024). Optimization of ultrasound pre-treatment and the effect of different drying techniques on antioxidant capacity, bioaccessibility, structural and thermal properties of purple cabbage. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, *201*, 109801. https://doi.org/10.1016/j.cep.2024.109801

Santos, N. C., Almeida, R. L. J., Monteiro, S. S., de Lima, T. L. B., da Silva Lúcio, A., Nogueira, L. P. da S., Paiva, Y. F., Gregório, M. G., Brito, A. C. de O., da Silva, L. A., de Figueiredo, D. V. P., Silva, R. dos S., Mota, M. M. de A., Pasquali, M. A. de B., de Sousa, S., & Rocha, A. P. T. (2025). Microencapsulating Lacticaseibacillus rhamnosus GG by spray drying using pea protein, pectin, and tapioca flour: Probiotic viability, digestibility and thermal stability. *Food and Bioproducts Processing*, *150*, 207–216. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2025.01.011

Santos-Rocha, S. J., Mendoza-Ortiz, C., Tobon-Gonzalez, J., Ríos-Estepa, R., & Orozco-Sánchez, F. (2024). Oxygen Transfer Effect on the Growth of Limosilactobacillus reuteri ATCC 53608 and on Its Metabolic Capacity. *Current Microbiology*, *81*(11), 362. https://doi.org/10.1007/s00284-024-03822-6

Sarabandi, K., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., & Mohammadi, A. (2019). Application of gum Arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source. *International Journal of Biological Macromolecules*, *140*, 59–68. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.133

Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of Lactobacillus paracasei by spray freeze drying. *Food Research International*, *43*(1), 193–202. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.028

Shah, B. R., Li, B., Al Sabbah, H., Xu, W., & Mráz, J. (2020). Effects of prebiotic dietary fibers and probiotics on human health: With special focus on recent advancement in their encapsulated formulations. *Trends Food Sci Technol*, *102*(June), 178–192. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.010

Sharifi, S., Rezazad-Bari, M., Alizadeh, M., Almasi, H., & Amiri, S. (2021). Use of whey protein isolate and gum Arabic for the co-encapsulation of probiotic Lactobacillus plantarum and

phytosterols by complex coacervation: Enhanced viability of probiotic in Iranian white cheese. *Food Hydrocolloids*, *113*, 106496. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106496

Shokri, Z., Reza Fazeli, M., Ardjmand, M., Mohammad Mousavi, S., & Gilani, K. (2015). Factors affecting viability of Bifidobacterium bifidum during spray drying. *DARU Journal Of Pharmaceutical Sciences*, *23*(7).

Shrivastav, P., Verma, A. K., Walia, R., Parveen, R., & Singh, K. A. (2016). Jaggery : a Revolution in the Field of Natural Sweeteners. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, *3*(3), 198–202.

Siemons, I., Politiek, R. G. A., Boom, R. M., van der Sman, R. G. M., & Schutyser, M. A. I. (2020). Dextrose equivalence of maltodextrins determines particle morphology development during single sessile droplet drying. *Food Research International*, *131*, 108988. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108988

Silva Gonzáles, J. (2020). El negocio de la panela se transforma. *LatinPymes*, 18–20.

Singh, N., Kumar, D., Raisuddin, S., & Sahu, A. P. (2008). Genotoxic effects of arsenic: Prevention by functional food-jaggery. *Cancer Letters*, *268*(2), 325–330. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.04.011

SIPA. (2023). *Departamentos paneleros: producción de panela - Colombia*.

Solís-Fuentes, J. A., Hernández-Ceja, Y., Hernández-Medel, M. del R., García-Gómez, R. S., Bernal-González, M., Mendoza-Pérez, S., & Durán-Domínguez-de-Bazúa, M. del C. (2019a). Quality improvement of jaggery, a traditional sweetener, using bagasse activated carbon. *Food Biosci*, *32*(July). https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100444

Solís-Fuentes, J. A., Hernández-Ceja, Y., Hernández-Medel, M. del R., García-Gómez, R. S., Bernal-González, M., Mendoza-Pérez, S., & Durán-Domínguez-de-Bazúa, M. del C. (2019b). Quality improvement of jaggery, a traditional sweetener, using bagasse activated carbon. *Food Biosci*, *32*(July). https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100444

Sørensen, H. M., Rochfort, K. D., Maye, S., MacLeod, G., Brabazon, D., Loscher, C., & Freeland, B. (2022). Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Health Benefits towards Functional Food. *Nutrients* , *14*(14), 1–33. https://doi.org/10.3390/NU14142938

Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Impact of Milk Protein Type on the Viability and Storage Stability of Microencapsulated Lactobacillus acidophilus NCIMB 701748 Using Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(5), 1255–1268. https://doi.org/10.1007/S11947-013-1120-X/TABLES/7

Stępień, A., & Grzyb, K. (2023). Comparison of critical storage parameters of the powders containing soy protein isolate and inulin, based on the concepts: Water activity and

Temperature of glass transition. *International Journal of Biological Macromolecules*, *230*, 123174. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123174

Stevens, M. J. A., Vollenweider, S., Meile, L., & Lacroix, C. (2011). 1,3-Propanediol dehydrogenases in Lactobacillus reuteri: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. *Microbial Cell Factories*, *10*(61). https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-61

Thatoi, H., Mohapatra, P. K. Das, Mohapatra, S., & Mondal, K. C. (2020). Microbial Fermentation and Enzyme Technology. In *Microbial Fermentation and Enzyme Technology*. CRC Press. https://doi.org/10.1201/9780429061257

Tovar, I. M., & Parra, L. C. (2020). *ESTUDIO DE PREFACTIBILIDAD PARA LA PRODUCCIÓN DE PANELA BAJA EN QUÍMICOS SABORIZADA EN EL MUNICIPIO DE CAMPAMENTO ANTIOQUIA Y COMERCIALIZACIÓN DEL PRODUCTO EN EL VALLE DE ABURRÁ* (Issue July).

Tufarelli, V., & Laudadio, V. (2016). AN OVERVIEW ON THE FUNCTIONAL FOOD CONCEPT: PROSPECTIVES AND APPLIED RESEARCHES IN PROBIOTICS, PREBIOTICS AND SYNBIOTICS. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, *4*(3). https://doi.org/10.18006/2016.4(3S).273.278

Tyagi, S. K., Kamboj, S., Himanshu, Tyagi, N., Narayanan, R., & Tyagi, V. V. (2022). Technological advancements in jaggery-making processes and emission reduction potential via clean combustion for sustainable jaggery production: An overview. *Journal of Environmental Management*, *301*(September 2021). https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113792

Upadhyaya, A., Bhalerao, P. P., Bhushette, P., Dabade, A., & Sonawane, S. K. (2023). Optimization study of palm jaggery and palm candy - production and process. *Applied Food Research*, *3*(1), 100269. https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100269

UPRA. (2023a). *Análisis situacional de la cadena agroindustrial de la panela en Colombia*.

UPRA. (2023b). *Análisis situacional de la cadena agroindustrial de la panela en Colombia*. https://upra.gov.co/es-co/POP_Documentos/DT_A_Situacional_Cadena_Panela.pdf

Urrutia-Baca, V. H., Escamilla-García, E., de la Garza-Ramos, M. A., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., & Urbina-Ríos, C. S. (2018). In Vitro Antimicrobial Activity and Downregulation of Virulence Gene Expression on Helicobacter pylori by Reuterin. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *10*(2), 168–175. https://doi.org/10.1007/s12602-017-9342-2

Verma, P., Shah, N. G., & Mahajani, S. M. (2019a). Why jaggery powder is more stable than solid jaggery blocks. *LWT - Food Science and Technology*, *110*(April), 299–306. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.093

Verma, P., Shah, N. G., & Mahajani, S. M. (2019b). Why jaggery powder is more stable than solid jaggery blocks. *LWT - Food Science and Technology*, *110*(April), 299–306. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.093

Verma, P., Shah, N., & Mahajani, S. (2019c). Effect of sodium hydrosulphite treatment on the quality of non-centrifugal sugar: Jaggery. *Food Chemistry*, *299*(June). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125043

Vinderola, G., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Wrigth, A. V. (2019). *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Fuctional Aspects* (Fifth). CRC Press.

Walz, M., Hirth, T., & Weber, A. (2018). Investigation of chemically modified inulin as encapsulation material for pharmaceutical substances by spray-drying. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *536*, 47–52. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.07.072

Witt, T., & Stokes, J. R. (2015). Physics of food structure breakdown and bolus formation during oral processing of hard and soft solids. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 3, pp. 110–117). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.06.011

Yang, C., Liu, L., Majaw, J. K., Liang, L., & Chen, Y. (2021). Efficacy of Lactobacillus reuteri supplementation therapy for Helicobacter pylori eradication: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Medicine in Microecology*, 100036. https://doi.org/10.1016/J.MEDMIC.2021.100036

Yao, M., Xie, J., Du, H., McClements, D. J., Xiao, H., & Li, L. (2020). Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(2), 857–874. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12532

Yin, M., Chen, M., Yuan, Y., Liu, F., & Zhong, F. (2024). Encapsulation of Lactobacillus rhamnosus GG in whey protein isolate-shortening oil and gum Arabic by complex coacervation: Enhanced the viability of probiotics during spray drying and storage. *Food Hydrocoll*, *146*(July 2023), 109252. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109252

Yoha, K. S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2020). Effect of encapsulation methods on the physicochemical properties and the stability of Lactobacillus plantarum (NCIM 2083) in synbiotic powders and in-vitro digestion conditions. *J Food Eng*, *283*, 110033. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2020.110033

Zanoelo, M., Barbosa-Dekker, A. M., Dekker, R. F. H., Pereira, E. A., & da Cunha, M. A. A. (2024). Microencapsulation of roasted mate tea extractives with lasiodiplodan (a (1 → 6)-β-D-glucan) and maltodextrin as combined coating materials: A strategic tool to stabilize and protect the bioactive components. *International Journal of Biological Macromolecules*, *275*, 133615. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133615

Zhang, F., Lu, Y., Zhu, S., Han, F., Wen, G., Tang, P., & Hou, Z. (2024). Mathematical model and numerical investigation of the influence of spray drying parameters on granule sizes of mold powder. *Particuology*, *85*, 280–295. https://doi.org/10.1016/j.partic.2023.06.017

Zhang, S., Ni, D., Xu, W., Zhang, W., & Mu, W. (2023). Characterization of a processive inulosucrase from Lactobacillus mulieris for efficient biosynthesis of high-molecular-weight inulin. *Enzyme Microb Technol*, *164*(November 2022), 110186. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110186

Zhao, H., Zhang, F., Chai, J., & Wang, J. (2020). Effect of lactic acid bacteria on Listeria monocytogenes infection and innate immunity in rabbits. *Czech Journal of Animal Science*, *65*(1), 23–30. https://doi.org/10.17221/247/2019-CJAS

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782–2858. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107

Zhou, L., Huang, Y., Wang, D., Yuan, T., Song, G., Gong, J., Xiao, G., Kim, S. A., & Li, L. (2024). Microencapsulation of Lactobacillus sakei and Lactobacillus rhamnosus in whey protein isolate and sodium hyaluronate for potential food-grade probiotic delivery system. *Food Biosci*, *61*(May), 104784. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104784

Zimmermann, J. A., Sirini, N., Oliveroa, C. R., Renna, M. S., Signorinic, M. L., Zbrun, M. V., Frizzo, L. S., & Soto, L. P. (2023). Macroencapsulation of Limosilactobacillus reuteri DSPV002C as nutritional supplement for piglets : conditions. *Revista Argentina de Microbiología*, *xxxx*, 12. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ram.2023.07.005