

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
TECNOLÓGICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA

**SEP**

**TRABAJO PROFESIONAL**  
**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
**INGENIERO BIOQUÍMICO**  
**QUE PRESENTA:**  
**ARIATNE MONZERRAT DE PAZ RAMOS**

**CON EL TEMA:**  
**ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE MICROENCAPSULACIÓN DE**  
**PROBIÓTICOS CON ALGINATO DE SODIO Y QUITOSANO**  
**COMO REVESTIMIENTO**

**MEDIANTE:**  
**OPCIÓN I**  
**(TESIS PROFESIONAL)**

**ASESOR INTERNO: Dra. PATRICIA GUADALUPE SÁNCHEZ ITURBE**

**ASESOR EXTERNO: Dr. ADRIÁN HERNÁNDEZ MENDOZA**

**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS**

**ENERO 2015**

"2014, Año de Octavio Paz"

DIRECCIÓN  
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 23 de junio del 2014

OFICIO NUM. DEP-CT-180-2014

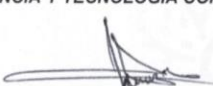
**C. ARIATNE MONZERRAT DE PAZ RAMOS**  
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.  
P R E S E N T E.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. DRA. PATRICIA GUADALUPE SANCHEZ ITURBE, ING. MARGARITA MARCELIN MADRIGAL e ING. JAVIER RAMIREZ DÍAZ, En el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

**" ESTUDIO DE EFICIENCIA DE MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS CON ALGINATO DE SODIO Y QUITOSANO COMO REVESTIMIENTO."**

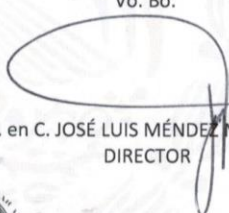
Registrado mediante la opción:  
**I (TESIS PROFESIONAL)**

**ATENTAMENTE**  
**"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"**

  
ING. JUAN JOSÉ ARREOLA ORDAZ  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE LA DIVISION DE  
ESTUDIOS PROFESIONALES

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares  
C.c.p.- Expediente  
I'JLMN/I'JJAO/I'eeam

Vo. Bo.

  
M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO  
DIRECTOR



Secretaría de Educ. Pública  
Instituto Tecnológico  
de Tuxtla Gutiérrez,  
Div. de Est. Profesionales



Carretera Panamericana Km. 1080, C.P. 29050, Apartado Postal 599  
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Tels. (961) 61 54285, 61 50461  
[www.ittg.edu.mx](http://www.ittg.edu.mx)





Hermosillo, Son., 4 de octubre de 2013

**Ing. Javier Ramírez Díaz**

Jefe del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica  
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Por medio de este conducto, hago constar que la **C. Ariatne Monzerrat De Paz Ramos**, alumna de la carrera de Ingeniería Bioquímica del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, con número de control 08270008, realizó el trabajo de tesis experimental de licenciatura intitulado **“Estudio de la eficiencia de microencapsulación de probióticos con alginato de sodio y quitosano como revestimiento”**.

Dicho trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), ubicado en el kilómetro 0.6 de la carretera a La Victoria, en Hermosillo, Sonora, bajo la dirección del Dr. Adrián Hernández Mendoza y asesoría de Dr. Aarón Fernando González Córdova y la Dra. Belinda Vallejo Galland.

Cabe señalar que el manuscrito de tesis ha sido revisado y corregido por su servidor, así como por los colegas antes mencionados. Derivado de lo anterior, consideramos que cumple con los requisitos de calidad para una Tesis de Licenciatura, por lo cual solicitamos a usted continuar con el proceso de revisión al interior del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del I.T.T.G.

Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho para reiterar a usted la seguridad de mis más distinguidas consideraciones.

ATENTAMENTE

  
**Dr. Adrián Hernández Mendoza**

Profesor-Investigador Titular



## INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) en la ciudad de Hermosillo, Sonora. Bajo la dirección del Dr. Adrián Hernández Mendoza y asesoría del Dr. Aarón Fernando González Córdova y la Dra. Belinda Vallejo Galland.

La tesis fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad de su contenido a satisfacción del director y asesores de CIAD.

Dr. Adrián Hernández Mendoza

Director

Dr. Aarón Fernando González Córdova

Asesor

Dra. Belinda Vallejo Galland

Asesor

## DEDICATORIAS

Gracias a Dios por darme la oportunidad de vivir y compartir con mi familia este gran logro. Por ser quien ha estado a mi lado en todo momento dándome las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día y seguir adelante rompiendo todas las barreras que se me presenten. Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

Este trabajo es dedicado a mi madre, Sandra Ramos Utrilla y mi padre Jorge De Paz López que me educaron con principios, valores y me hicieron la persona que soy ahora. Mediante su apoyo y su amor incondicional siempre he salido adelante y he aprendido el verdadero significado de la lucha. Ustedes son mi ejemplo y mi motivo de superación. Este trabajo es dedicado a ustedes, los amo.

A mis abuelos, Salomón Ramos Hernández y Julieta Utrilla Domínguez que me dieron su cariño y amor, dándome consejos todo el tiempo, me transmitieron sabiduría y dependencia en Dios.

A mis hermanos Lesther Alejandro De Paz Ramos y Michael Aldahir De Paz Ramos quienes han sido mis compañeros a lo largo de mi camino, nos hemos apoyado en la buenas y en las malas, he aprendido y crecido a su lado.

A mi cuñada Yesenia Ruiz Trujillo por aconsejarme, por sus mensajes dándome fuerza para seguir adelante, por cuidar a mi madre durante mi ausencia en la realización de este proyecto.

A mi tía Norma Lorely Ramos Utrilla, quien gracias a su apoyo y sus consejos he salido adelante, demostrándome que todo se puede, aunque este uno lejos de tus seres queridos.

A mi tía Claudia Morales Avendaño por darme fuerza para salir adelante, quien me dio sus consejos día a día y su apoyo incondicional, confiando en mi y brindándome su amistad, haciéndome cada día más fuerte .

A toda mi familia en general, gracias por su ayuda en todo momento, toda mi gratitud y respeto por ayudarme a salir adelante, y cumplir una etapa más de mi vida. Por compartir todos mis momentos de felicidad y tristeza y por su apoyo incondicional. Que con amorosa paciencia me han acompañado en cada etapa de mi vida. El presente trabajo es el resultado de todo su esfuerzo.



A Omar Hernández Díaz que me ha apoyado incondicionalmente, a cada instante. Su ayuda, amor y compañía me han motivado a culminar muchas de mis metas, esta es una de ellas.

A mis amigas que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigas: Yareni García, Karla Avendaño, Aurora Ocampo, Eva Magdalena, por compartir los buenos y malos momentos.

A Rubí Cruz Ramos por ser mi mejor amiga quien me acompañó gran parte de mi tesis, trabajamos juntas, vivimos juntas durante todo este proyecto y nos ayudamos mutuamente, gracias por tu apoyo, amistad y compañía.

A Lucio Benítez Romero quien me apoyo gran parte de mi tesis, con sus consejos, ayuda, asesorías y acompañarme durante todo el proceso de mi tesis y ser un gran amigo y compañero de casa.

A Ángeles de la rosa y Ángel Martín Ortiz por toda la colaboración brindada, durante la elaboración de este proyecto. A todos mis compañeros del área de lácteos Rocío, Marisol, Yair, Lulú, Alex, Samantha, Olga, Lilia, Pricilia, Sosa, Eleazar, Trini, Isidro, Martin, gracias por su apoyo y ayuda.

Finalmente a todos los maestros, aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario, y que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis.

A todas y a cada una de las personas que en su momento han ocupado un lugar muy importante en mi corazón y han influido para bien en mi vida, sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, tantas develadas sirvieron de algo y aquí está el fruto. Les agradezco a todos ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y momentos tristes, pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Los quiero mucho y nunca los olvidare.

## AGRADECIMIENTOS

Al instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG) por abrirme sus puertas y entrar al maravilloso mundo del saber, por ser el medio del cual adquirí los conocimientos necesarios para forjarme como profesionista y ser humano.

Al Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), a cargo de la Dra. Belinda Vallejo Galland, por abrirme sus puertas al maravilloso mundo de la investigación.

A mi asesor interno Dra. Patricia Sánchez Iturbe, por su apoyo y por darme ánimos para emprender una nueva experiencia.

A mi asesor externo Dr. Adrián Hernández Mendoza por creer en mí, por su conocimiento, por su paciencia, por estar pendiente de mí y sobre todo por el gran apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación, colaboración en este proyecto que me ha brindado.

A Dr. Aarón Fernando Gonzales Córdova le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

A CIAD por la beca otorgada, que me hizo más fácil la permanencia durante la tesis.

A todo el personal de la CTAOA, agradezco la colaboración de la M.C Carne Estrada Montoya, del M.C. Ricardo Reyes Díaz por su ayuda en el manejo de técnicas y por resolver todas mis dudas, en la capacitación del uso de equipos, préstamo de material, por su gran apoyo, confianza, paciencia y el tiempo que me brindaron, pero principalmente por su gran amistad. Gracias por compartir conmigo sus vivencias y todos esos consejos que los tengo muy presentes.

Gracias...!

## INDICE

<b>LISTA DE CUADROS</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>IV</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>V</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
2.1 Historia de los probióticos	4
2.2 Efectos benéficos de los probióticos	6
2.3 Mecanismos de acción	7
2.4 Criterios de selección de cepas probióticas	10
2.5 Problemática de la viabilidad de los probióticos durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos.	11
2.6 Microencapsulación de bacterias probióticas	12
2.6.1 Métodos de encapsulación	14
2.6.2 Materiales de encapsulación	17
2.7 Caracterización de las microcápsulas	21
2.7.1 Características morfológicas y tamaño de partícula	21
2.7.2 Rendimiento de producción	22
2.7.3 Eficacia y capacidad de encapsulación	23
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>24</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>4.1 General</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Específicos</b>	<b>24</b>
<b>V. Materiales y Métodos</b>	<b>25</b>
5.1 Cepas y propagación de cultivos	25



5.2 Evaluación de la capacidad de crecimiento y resistencia de las bacterias a diferentes valores de pH _____	27
5.3 Microencapsulación por emulsión (gelificación interna) _____	28
5.4 Caracterización de las microcápsulas _____	29
5.4.1 Eficacia de encapsulación y capacidad de liberación de las cepas .....	29
5.4.2 Propiedades micro-geométricas de las cápsulas.....	31
5.4.3 Efecto de la humedad relativa sobre algunas propiedades micro-geométricas de las microcápsulas .....	31
5.4.4 Determinación de hidrofobicidad superficial de las microcápsulas .....	32
5.4.5 Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad de las bacterias microencapsuladas y sobre las propiedades micro-geométricas de las microcápsulas .....	32
<b>VI Resultados y Discusión _____</b>	<b>33</b>
6.1 Evaluación de la capacidad de crecimiento y resistencia de las bacterias a diferentes valores de pH _____	33
6.2 Microencapsulación por emulsión (gelificación interna) _____	46
6.3. Caracterización de las microcápsulas _____	47
6.3.1 Eficacia de encapsulación y capacidad de liberación de las cepas .....	47
6.3.2 Propiedades micro-geométricas de las cápsulas.....	50
6.3.4 Efecto de la humedad relativa sobre algunas propiedades micro-geométricas de las microcápsulas y viabilidad bacteriana.....	51
6.3.5 Determinación de la hidrofobicidad superficial de las microcápsulas ....	56
6.3.6 Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad de las bacterias microencapsuladas y sobre algunas propiedades micro-geométricas de las microcápsulas.....	56
<b>VII Conclusiones _____</b>	<b>60</b>
<b>VIII REFERENCIAS _____</b>	<b>61</b>

## LISTA DE CUADROS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Cuadro 1.</b> Criterios de selección de cepas probióticas.....	10
<b>Cuadro 2.</b> Bacterias probióticas empleadas en el estudio.....	25
<b>Cuadro 3.</b> Actividad de agua ( $a_w$ ) obtenida con diferentes soluciones de ácido sulfúrico a 30 °C.....	32
<b>Cuadro 4.</b> Eficacia y capacidad de encapsulación.....	48
<b>Cuadro 5.</b> Cambios en los parámetros geométricos de las microcápsulas influenciados por diferentes valores de ( $a_w$ ) a una temperatura de 30 °C.....	52
<b>Cuadro 6.</b> Cambios morfológicos de las microcápsulas sometidas a diferentes valores de $a_w$ a 30 °C durante 15 d.....	53
<b>Cuadro 7.</b> Cambios en los parámetros geométricos de las microcápsulas almacenadas a dos diferentes temperaturas (4 y 25 °C) durante 15 d.....	57
<b>Cuadro 8.</b> Cambios morfológicos de las microcápsulas almacenadas a dos diferentes temperaturas (4 y 25 °C) durante 15 d.....	58

## LISTA DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Tipos de microcápsulas .....	13
<b>Figura 2.</b> Modelo de caja de huevo .....	19
<b>Figura 3.</b> Diagrama de propagación bacteriana (caldo MRS, pH 6.5, 37 °C) .....	26
<b>Figura 4.</b> Evaluación de la capacidad de crecimiento y resistencia de las bacterias a diferentes valores de pH .....	27
<b>Figura 5.</b> Metodología empleada para evaluar la eficacia de encapsulación .....	30
<b>Figura6(A-K).</b> Crecimiento (a) y resistencia (b) de las diferentes cepas probióticas en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.....	35-45
<b>Figura 7.</b> Cuenta viable de las cepas probióticas durante los diferentes pasos del proceso de encapsulación .....	46
<b>Figura 8.</b> Ensayo comparativo de la liberación de L.r14171 microencapsulado empleando diferentes soluciones amortiguadoras (C.S., PBS y Peptona) .....	48
<b>Figura 9.</b> Micrografías representativas de L.r14171 sin marcar (a) y marcada con CFDA-SE (b) .....	49

<b>Figura 10.</b>	Micrografías representativas de microcápsulas cargadas con L.r14171 sin marcar (a) y marcada con CFDA-SE (b) .....	49
<b>Figura 11.</b>	Micrografías representativas de las características macro (a) y microscópicas (b) de las microcápsulas de alginato conteniendo L.r14171 .....	50
<b>Figura 12.</b>	Comportamiento del peso de las microcápsulas almacenadas 15 d a 30 °C y a diferentes valores de $a_w$ .....	54
<b>Figura 13.</b>	Comportamiento de la viabilidad de las bacterias probióticas almacenadas 15 d a 30 °C y a diferentes valores de $a_w$ .....	55
<b>Figura 14.</b>	Adhesión de las microcápsulas de alginato contenido L.r14171 a la fase hidrofóbica .....	56
<b>Figura 15.</b>	Viabilidad de L.r14171 microencápsulado y almacenado a dos diferentes temperaturas 4 y 25 °C durante 15 d .....	59

## RESUMEN

La tecnología de la microencapsulación ofrece un mecanismo de protección y de liberación controlada de ciertos componentes bioactivos que generan efectos positivos en el organismo humano. Tomando esto en consideración, el objetivo del presente trabajo fue microencapsular bacterias probióticas específicas empleando alginato de sodio y quitosano como revestimiento y caracterizar las microcápsulas obtenidas en términos geométrico-morfológicos, así como de eficiencia de encapsulación y capacidad de liberación de las cepas probióticas.

22 cepas probióticas fueron evaluadas en su capacidad de crecimiento y resistencia a diferentes valores de pH (2-7) y periodos de incubación (0, 4, 24 h). El 60% de las cepas fue capaz de crecer a valores de pH 3 después de 4 h de incubación, mientras que solo el 13 % pudo permanecer viable bajo dichas condiciones. A partir de estos resultados se pre-seleccionaron seis cepas (L.ferm 2, L.rha, Lp-B4496, L.r14171, B1-R0175 y Lr-B442) en función de su baja capacidad de crecimiento y resistencia a diferentes valores de pH.

Durante el proceso de microencapsulación se observó pérdida de la viabilidad bacteriana en forma cepa-dependiente, siendo B1-R0175 y L.r14171 mostrando mayor tolerancia con una eficiencia de encapsulación de 36.02 y 73.61 %, respectivamente. Sin embargo, L.r14171 fue la única cepa que mostró una concentración celular  $>10^6$  UFC/mL, concentración mínima requerida en los alimentos para ser considerados como probióticos. Por esta razón ésta cepa fue seleccionada para la caracterización de las microcápsulas.

Las microcápsulas de L.r14171 presentaron en promedio parámetros geométricos de área, volumen y diámetro de 0.1080 cm,  $0.65 \times 10^{-3}$  cm<sup>3</sup> y 0.009176 cm<sup>2</sup>, respectivamente y se caracterizaron por presentar forma esférica con superficie rugosa, porosa y con cráteres. También, se determinó la hidrofobicidad

superficial de las microcápsulas, las cuales exhibieron porcentajes elevados (61.15 %) de hidrofobicidad.

Adicionalmente, se evaluó el efecto del almacenamiento (15 días) a diferentes temperaturas (4 y 25 °C) sobre la viabilidad de L.r14171 y sobre algunas propiedades micro-geométricas de las microcápsulas.

Los resultados de este trabajo mostraron que la microencapsulación por emulsificación utilizando alginato de sodio y quitosano como recubrimiento es una alternativa viable para la protección de *L. reuteri* NRRL 14171, lo que sugiere que la bacteria así protegida puede ser almacenada o administrada a través de productos fermentados refrigerados.

## **SUMMARY**

Microencapsulation technology provides a mechanism of protection and controlled release of certain bioactive components that generate positive effects on the human body. Taking this into account, the aim of this study was specific probiotic bacteria microencapsulated using alginate and chitosan coated and characterize the microcapsules obtained in geometric-morphological terms, as well as encapsulation efficiency and release ability of probiotic strains.

22 probiotic strains were evaluated for their ability to grow and resistance to different pH values (2-7) and incubation times (0, 4, 24 h). 60% of the strains was able to grow at pH 3 after 4 h of incubation, whereas only 13% could remain viable under these conditions. From these results are pre-selected six strains (L.ferm 2 L.rha, Lp-B4496, L.r14171, and R0175-Lr B1-B442) according to their low capacity for growth and resistance to different values pH.

During the microencapsulation process was observed loss of bacterial viability as strain-dependent, being B1-R0175 and L.r14171 showing a higher

tolerance encapsulation efficiency 36.02 and 73.61% respectively. However, L.r14171 was the only strain that showed a cell concentration  $> 10^6$  UFC / mL, minimum required concentration in food to be considered as probiotics. Thus this strain was selected for the characterization of the microcapsules.

Microcapsules L.r14171 had an average geometric parameters of area, volume and diameter of 0.1080 cm,  $0.65 \times 10^{-3}$  cm<sup>3</sup> and 0.009176 cm<sup>2</sup>, respectively, and were characterized by spherical shape with rough, porous surface with craters. Surface hydrophobicity of the microcapsules were also determined, which showed high percentages (61.15%) of hydrophobicity.

Additionally, the effect of storage (15 days) at different temperatures (4 and 25) on the viability of L.r14171 and on some micro-geometric properties of the microcapsules were evaluated.

The results of this work showed that microencapsulation by emulsification using sodium alginate and chitosan as a coating is suitable for protection of *L. reuteri* alternative NRRL 14171, suggesting that the bacteria can be stored and protected or products administered via fermented refrigerated.



## I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el ser humano ha adoptado nuevos comportamientos en su estilo de vida, incluyendo costumbres sedentarias y patrones de alimentación poco saludables. Esto ha aumentado el riesgo de padecer ciertas enfermedades crónicas degenerativas que comprometen la salud (Sanz, Collado y Dalmau 2006).

El desarrollo de productos con propiedades funcionales constituye una oportunidad real de contribuir al mejoramiento de la dieta, afectando positivamente la salud y el bienestar de los individuos. En especial los que ejercen una acción benéfica sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer una enfermedad. Estos alimentos que promueven la salud han sido denominados Alimentos Funcionales (Araya y Lutz ,2003).

En este sentido, estudios han demostrado que algunos microorganismos empleados como aditivos no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas, fisicoquímicas y reológicas de los alimentos, sino que además proveen beneficios a la salud del consumidor. Estos microorganismos son denominados probióticos, los cuales han sido definidos por la FAO (2002) como “microorganismos vivos que, al ser ingeridos en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del anfitrión”.

Éstos microorganismos deben de cumplir ciertos requisitos para ser considerados como probióticos, tales como: ser de origen humano, resistentes al procesamiento, estables frente a las secreciones gástricas y biliares, y tener la capacidad de adherirse a las células epiteliales del tracto digestivo. Adicionalmente, es condición imprescindible demostrar en estudios humanos, publicados en revistas científicas de reconocido prestigio, que éstas producen un efecto benéfico. Los estudios realizados en humanos deben además demostrar la seguridad de los probióticos, dando garantía de que no hay riesgo detectable de efectos secundarios o infección por su uso (FAO, 2002).

Los efectos biológicos más estudiados en relación a los probióticos incluyen: mejora en la digestión de lactosa, inmunomodulación, reducción de ciertos tipos de cáncer e inhibición del crecimiento de ciertos tumores y células tumorales, así como el control de infecciones intestinales y el control de los niveles de colesterol sérico entre otros (Isolauri *et al.*, 2002).

En los últimos años se ha registrado un incremento en la incorporación de estos microorganismos en los alimentos, debido a que la industria alimentaria se encuentra interesada en el desarrollo de productos con un mayor valor agregado y que además, tienen una gran aceptación y demanda por parte de los consumidores.

Cuando estos microorganismo se adicionan a un producto alimenticio – vivos y en suficiente cantidad, a éste producto se le denomina alimento probiótico. El consumo continuo del mismo, garantiza obtener los efectos deseados en salud (Marteau *et al.*, 2001).

Diferentes alimentos han sido explorados como vehículos para la incorporación de los probióticos, entre los más estudiados se destacan las leches fermentadas. Sin embargo, actualmente las investigaciones se han diversificado a diferentes productos (*e.g.*, quesos, carnes, vegetales, frutas) de la industria de alimentos (FAO/WHO, 2001)

Cuando los probióticos son incorporados a los alimentos, se debe considerar que existen varios factores que pueden influir en la capacidad de éstas bacterias para sobrevivir en el producto. Estos factores incluyen: 1) el estado fisiológico de los organismos probióticos añadidos, 2) las condiciones físicas de almacenamiento del producto (*e.g.*, temperatura), 3) la composición química de la matriz (*e.g.*, acidez, contenido de carbohidratos disponibles, fuentes de nitrógeno, contenido de minerales, actividad de agua y el contenido de oxígeno) y 4) las posibles interacciones antagónicas-sinérgicas de los probióticos con cultivos iniciadores (Heller, 2001). Así, se han desarrollado diferentes estrategias que permitan incrementar la resistencia y estabilidad de las bacterias probióticas en el

producto, incluyendo: selección de cepas ácido-resistentes, fermentación en doble etapa, pre-adaptación a diferentes condiciones de estrés, adición de micronutrientes y microencapsulación, entre otras (Pérez *et al.*, 2013).

De las estrategias antes mencionadas, la microencapsulación es la que se ha desarrollado con mayor énfasis, y al menos cinco métodos de microencapsulación se han aplicado a los probióticos: secado por aspersión, recubrimiento por aspersión, extrusión, emulsión y tecnología de gel-partículas (Champagne y Fustier, 2007). Por otra parte, debido a su gran versatilidad, la familia de los polímeros es la más utilizada en las técnicas de microencapsulación. Dentro de éstos se encuentran los polímeros naturales, los semi sintéticos y los sintéticos. Los polímeros naturales son principalmente de naturaleza polisacáridica, de origen animal y vegetal; se destacan la carboximetil celulosa, carragenina, la goma arábiga, el quitosano y el alginato (Martín *et al.*, 2009).

Dependiendo de los materiales y técnicas utilizadas para la formación de la estructura de las microesferas, se genera una gran variedad de microcápsulas que pueden diferir en tamaño, composición y función. De acuerdo esto, las microcápsulas deben de ser caracterizadas para asegurar su calidad y homogeneidad, así como su comportamiento en la liberación del material activo. Dentro de los ensayos característicos que se suelen realizar a las microcápsulas se encuentran: características morfológicas, tamaño de partícula, rendimiento de producción, eficacia de la encapsulación, y liberación del material activo, entre otras (Roman *et al.*, 2008).

El presente estudio fue llevado a cabo con la finalidad de microencapsular bacterias probióticas específicas empleando alginato de sodio y quitosano como revestimiento y caracterizar las microcápsulas obtenidas en términos geométrico-morfológicos, así como de eficiencia de encapsulación y capacidad de liberación de las cepas probióticas.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Historia de los probióticos

El interés científico por las bacterias como agentes protectores frente a diferentes enfermedades surgió de la observación de Metchnikoff, quien a principios del siglo XX relacionó la longevidad y la buena salud de los campesinos búlgaros, que consumían grandes cantidades de yogurt (Alvares y Oberhelman, 2001).

A partir de las observaciones de Metchnikoff, y posteriormente las de Tissier (1906), quien reportó que los niños con diarrea presentaban en sus heces un menor número de bacterias bífidas al contrario que los niños sanos, sugirió la posibilidad de administrar éstas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una flora intestinal sana, resultaron tan atractivas, que inmediatamente después sus obras científicas fueron objeto de explotación comercial. Lamentablemente, los resultados no siempre fueron positivos y la mayoría de esas observaciones tuvieron un carácter anecdótico. Por consiguiente se consideró que el concepto de probiótico no estaba demostrado científicamente y durante años recibió escasa atención (FAO, 2001).

Estos conocimientos fueron evolucionando, de tal forma que años más tarde, se comenzó a denominar “prebióticos” a las sustancias que favorecían el desarrollo de la microbiota autóctona, y “probióticos” a aquellos microorganismos que ingeridos con los alimentos, tenían efectos de prevención de algunas patologías o disminuían los daños que causaban algunas enfermedades (Pardio *et al.*, 2000).

En 1965, el término “probiótico” fue introducido por primera vez por Lilly y Stillwell, quienes definieron a los probióticos como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. Sin embargo, el concepto que parecía adecuado, no era totalmente correcto, ya que el término probiótico denotaba a todas las sustancias de carácter nutritivo y no sólo determinados microorganismos. Parker (1974) fue el primero en usar el concepto

“probiótico” en el sentido que hoy se conoce, “organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio intestinal”. Sin embargo, su definición fue debatida por muchos autores ya que varias sustancias (incluyendo antibióticos) podrían ser incluidos.

En 1970, un microorganismo probiótico se definió como “microorganismo que se utiliza como suplemento en la alimentación animal, para aumentar el crecimiento y reducir el estrés”. En 1989, Fuller intentó mejorar la definición hecha por Parker, y enfatizó el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto benéfico para el huésped mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal (Vasiljevic y Shah, 2008).

Posteriormente, Gibson y Roberfroind (1995) introdujeron el término prebiótico para referirse a los “ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento o de la actividad de una o un limitado grupo de bacterias en el colon”.

Un grupo de trabajo de la FAO/OMS sobre la evaluación de probióticos en alimentos, presentó la siguiente definición: “Microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico a la salud del hospedero” (FAO/OMS, 2002).

La definición de probióticos ha sufrido una evolución continua debido a los avances que se han tenido en la investigación y de los múltiples beneficios que estas bacterias pueden traer al organismo, de tal forma que una de las definiciones más aceptadas actualmente es: “Microorganismos vivos, principalmente bacterias, usadas en forma de suplementos nutricionales que tras ser ingeridos en cantidad suficiente, mejorar el equilibrio microbiano en el intestino de las personas o animales que los ingieren, provocando efectos benéficos sobre su salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales” (Amores *et al.*, 2004).

Entre los principales microorganismo probióticos usados actualmente por la industria se encuentran especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y

en menor medida algunas especies de los géneros *Bacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. Además de algunas levaduras como la *Saccharomyces boulardii* (Argyri *et al.*, 2013).

## 2.2 Efectos benéficos de los probióticos

Desde la era de Metchnikoff, se han atribuido diferentes efectos benéficos a productos que contienen a los probióticos. Algunos de estos efectos benéficos han sido bien documentados, mientras que otros han mostrado un potencial prometedor en modelos animales. Por otra parte, dichos efectos benéficos son cepa dependiente, es decir, no hay ninguna cepa universal que proporcione todos los beneficios propuestos, aun cuando se trate de cepas de la misma especie. Además, no todas las cepas de la misma especie son eficaces contra condiciones de salud definidas. Las cepas de *L. rhamnosus* GG (Valio<sup>®</sup>), *Saccharomyces cerevisiae* boulardii (Biocodex<sup>®</sup>), *L. casei* Shirota (Yakult<sup>®</sup>), y *B. animalis* Bb-12 (Chr. Hansen<sup>®</sup>) son sin duda los cultivos probióticos más estudiados con datos bien establecidos en cuanto al manejo de la malabsorción de lactosa, diarrea por rotavirus, diarrea asociada a los antibióticos y diarrea por *Clostridium difficile* (Vasiljevic y Shah, 2008).

Aparte de los efectos benéficos antes mencionados, también se ha atribuido a algunas cepas probióticas propiedades antimutagénicas y anticancerígenas, estimulación del sistema inmune (refuerzan los mecanismos de defensa naturales del cuerpo), reducción del colesterol sérico mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, ácido láctico o ácido propiónico) en el intestino, así como mejorar la biodisponibilidad de los nutrientes debido a que provocan un aumento en la permeabilidad intestinal (Álvarez-Olmos y Oberhelman, 2001; Mortazavian *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Argyri *et al.*, 2013).

Adicionalmente, las bacterias probióticas son capaces de producir metabolitos (v.g., ácidos orgánicos, ácidos grasos libres, CO<sub>2</sub>, peróxido de

hidrógeno, y bacteriocinas) con propiedades antimicrobianas que pueden incrementar la resistencia a infecciones mediante antagonismo directo de patógenos (*Escherichia coli* y *Salmonella*), o extender la vida de anaquel de los productos por inhibición de microorganismos degradadores como *Staphylococcus* (Álvarez-Olmos y Oberhelman, 2001; Lastras, 2009).

### **2.3 Mecanismos de acción**

Se han realizados varios estudios *in vivo* para determinar las capacidades probióticas de las cepas estudiadas. Sin embargo solo algunos de ellos han identificado específicamente la base mecánica detrás de los beneficios observados, por lo que muchos de los posibles mecanismos de acción descifrados descansan en datos de estudios *in vitro*. Debe subrayarse el carácter multifactorial de los mecanismos de acción ya que no todos los probióticos emplean los mismos mecanismos para ejercer un beneficio en el hospedador, lo que acentúa la importancia de documentar científicamente los beneficios que se propongan para cada cepa probiótica.

Los probióticos pueden actuar en el huésped a distintos niveles: en el lumen intestinal, mediante interacción con la microbiota intestinal o ejerciendo un efecto metabólico directo, en la mucosa y el epitelio intestinales, incluyendo los efectos de barrera, los procesos digestivos y el sistema inmunológico asociado a la mucosa y en otros órganos como el sistema inmune sistémico (Ng *et al.*, 2009). Así pues, los microorganismos probióticos pueden llevar a cabo su efecto benéfico a través de uno o el conjunto de los siguientes mecanismos:

- Competencia por la adhesión en los receptores del epitelio intestinal y competencia por nutrientes.

La capacidad de adhesión es una propiedad crucial para la colonización de un probiótico. Después de pasar a través de la parte superior de intestino delgado, las bacterias probióticas parecen ser capaces de vivir por un corto período en



estado no proliferativo. Sin embargo, para establecerse como un habitante permanente del intestino, una cepa probiótica debe poder adherirse a las células epiteliales del intestino para evitar ser removida por los mecanismos de limpieza normales del intestino. La adhesión bacteriana involucra una fase inicial irreversible no específica basada en interacciones físicas entre dos superficies, seguida de una fase irreversible específica mediada por la adhesión en la superficie de las células bacterianas (usualmente proteínas) y receptores específicos en las células epiteliales.

Una vez implantadas las bacterias probióticas en el tracto intestinal, éstas actúan como una barrera defensiva al impedir que el espacio del epitelio celular quede disponible para la colonización de bacterias patógenas (Fuller, 1989; Fox, 1994; Salminen *et al.*, 1998).

En este sentido, estudios en modelos animales han demostrado que la administración de cultivos probióticos, obtenidos de cerdos destetados saludables, en cerdos neonatos resultó en la reducción de la colonización intestinal y expulsión fecal de patógenos como *Escherchia coli* y *Salmonella choleraesuis* (Fedorka-Cray *et al.*, 1999 y Genovese *et al.*, 2000).

- Producción de sustancias antimicrobianas.

Las bacterias probióticas producen comúnmente una amplia variedad de sustancias antimicrobianas (ácidos orgánicos y sustancias con un espectro de acción definido). Estas sustancias ofrecen ventajas competitivas que promueven una exitosa colonización de las bacterias probióticas sobre la flora normal ya establecida del tracto gastrointestinal (Fuller, 1989).

La producción de ácido láctico, ácido acético y ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) durante el crecimiento de las bacterias probióticas pueden reducir el pH de su entorno a niveles donde bacterias patógenas y toxigénicas pueden ser inhibidas y/o destruidas (Collins *et al.*, 1999).

Por otra parte, hay diferentes reportes que hablan de la producción de compuestos de bajo peso molecular (reuterina, diacetilo, ácido piroglutámico) con actividad antimicrobiana por algunas bacterias probióticas. Además del bajo peso molecular, estos compuestos comparten otras propiedades como actividad a bajos pH, termoestabilidad y amplio espectro de actividad (Höltzel *et al.*, 2000)

Las bacteriocinas, grupo de péptidos o proteínas con potencia antimicrobiana, producidas por diferentes bacterias probióticas también pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos. Existen numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares (Holzapfel *et al.*, 1995).

- Estimulación de la inmunidad

Algunos estudios han demostrado que alguno *Lactobacillus* usados como probióticos son capaces de estimular el sistema inmune mediante dos vías: La primera, migración y multiplicación de los microorganismos probióticos a través de la pared intestinal estimulando las partes más lejanas, y la segunda, por reconocimiento de organismos probióticos muertos como antígenos que puedan estimular directamente el sistema inmune (Lázaro, 2005).

Adicionalmente, se ha documentado que ciertas cepas probióticas pueden actuar sobre receptores opioides y canabinoides de las células epiteliales, mediando así en funciones analgésicas, lo que daría lugar a nuevos enfoques en el tratamiento del dolor abdominal y la enfermedad del colon irritable (Rousseaux, *et al.*, 2007). Las bacterias probióticas son capaces de aumentar la respuesta inmune específica y no específica por la activación de macrófagos, incrementado los niveles de citocinas, células exterminas naturales,  $\gamma$ -interferón e inmunoglobulinas, especialmente la IgA.

## 2.4 Criterios de selección de cepas probióticas

No todas las bacterias probióticas presentan el mismo comportamiento, por lo que se requiere un estricto criterio de selección para poder obtener resultados positivos utilizando a estos microorganismos.

Se ha aceptado que para la selección de cepas probióticas se deben considerar varios aspectos (Cuadro 1), incluyendo características de seguridad, tecnológicas, funcionales y fisiológicas (Havenaar *et al.*, 1992). En general esto se refiere a que un probiótico debe ser reconocido como generalmente seguro (GRAS, por sus siglas en inglés), esto es, no debe ser patogénico, infectivo ni virulento. Además, es necesario establecer y conocer sus patrones de resistencia a antibióticos, y su actividad metabólica y hemolítica.

Por otra parte, los probióticos deben de ser tolerados por el sistema inmunitario del organismo huésped, por lo que es deseable que cuando se vayan a utilizar, éstos sean originarios de la misma especie para la cual van a ser destinados. Las cepas probióticas deben de tener la capacidad de resistir la acción de los ácidos gástricos y de las sales biliares para llegar vivas en cantidades suficientes al intestino, y ahí adherirse a la superficie de la mucosa intestinal y colonizar el segmento gastrointestinal (Nava, 2008).

**Cuadro 1.** Criterios de selección de cepas probióticas

Criterios	Propiedad
Seguridad	Ser reconocida como generalmente seguro (GRAS)
	Nula patogenicidad e infectividad
	Presentar resistencia a antibióticos
Tecnológicos	Cepas genéticamente estables
	Presentar alta viabilidad durante procesamiento y almacenamiento
	Propiedades Sensoriales

Funcionales	Presentar tolerancia a jugos gástricos
	Poseer tolerancia a bilis
	Tener capacidad de adhesión a la mucosa intestinal
Fisiológicos	Actividad antagónica contra patógenos gastrointestinales
	Metabolismo del colesterol
	Metabolismo de lactosa
	Propiedades Inmunomoduladoras
	Propiedades antimutagénicas/anticarcinogénicas

(Shah, 2007; Morelli, 2007).

Además de los criterios antes mencionados, se debe comprobar en estudios con humanos el efecto probiótico esperado. Se debe asociar un efecto a una cepa concreta y se debe de poder realizar el seguimiento en estudios clínicos y epidemiológicos (FAO/OMS, 2002).

Finalmente, cuando las bacterias probióticas son sometidas a algún tipo de proceso durante el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, éstas deben de ser capaces de crecer en suficiente cantidad sin presentar variaciones genéticas. Además, se espera que sean capaces de adaptarse a la matriz del alimento (e.g., leche), y que el producto final tenga una vida de anaquel y atributos sensoriales aceptables como color, sabor y textura. También se requiere que las bacterias probióticas presentes en el producto permanezcan viables, en suficiente número y metabólicamente activas, aún después de haber sido ingeridas (Gibson y Roberfroid 1995 ; Fuller, 1989).

## **2.5 Problemática de la viabilidad de los probióticos durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos.**

Durante los procesos tecnológicos involucrados en la elaboración de alimentos probióticos, los bacterias deben superar diferentes barreras físicas y

químicas, incluyendo cambios drásticos de temperatura ocasionados por los procesos de congelación y secado (liofilización, aspersion), alta acidez y bajo pH de los productos fermentados, oxígeno molecular (en el caso de los microorganismos anaerobios obligatorios), humedad, interacción con otros componentes del alimento, actividad de agua del alimento, entre otros (Mortazavian *et al.*, 2007; Feucht y Kwak, 2013). Todos estos factores causan una disminución o pérdida de la viabilidad de las bacterias probióticas (Mortazavian *et al.*, 2007; Kasra-Kermanshadi *et al.*, 2010).

Por lo anterior, se han buscado diferentes estrategias que eviten o reduzcan la exposición de los microorganismos a las condiciones adversas del entorno (Martín-Villena *et al.*, 2009). En este sentido, la microencapsulación se ha posicionado como una herramienta útil para la estabilización de los probióticos durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos probióticos funcionales (Heidebach *et al.* 2009).

En la microcapsulación las células bacterianas son retenidas por una delgada pero fuerte pared membranosa y son liberadas a velocidades controladas bajo condiciones específicas, mientras que los nutrientes y metabolitos pueden difundirse a través de la pared semipermeable (Kailasapathy, 2002).

## **2.6 Microencapsulación de bacterias probióticas**

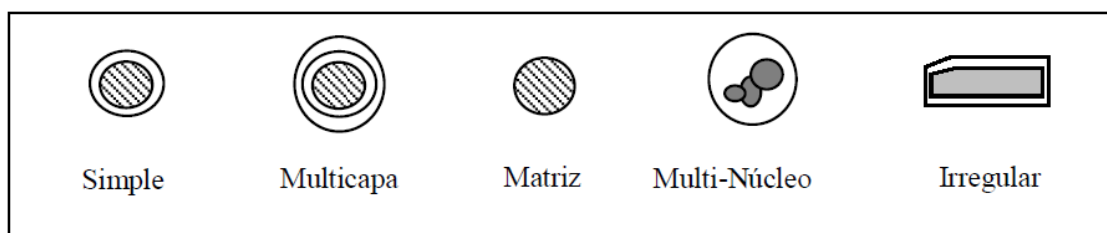
La microencapsulación es un proceso en el que las células se retienen dentro de una matriz esférica, semipermeable, ligera, y fuerte, con un diámetro que varía entre micras a milímetros. Para su elaboración normalmente se emplean polisacáridos de diferentes orígenes (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

El núcleo que compone la microcápsula es también denominado fase interna o principio activo, así como a la membrana se puede nombrar capa externa o matriz. En este sentido, las microcápsulas o microesferas son definidas como el

producto del proceso de microencapsulación dependiendo de cuál sea su morfología y estructura interna (Anal y Singh 2007).

Las microcápsulas se han diferenciado de las microesferas principalmente por la distribución del principio activo. En el primer caso, el núcleo puede ser de naturaleza líquida o sólida incluido en una especie de reservorio recubierto por una película del material. Mientras que, en las microesferas, el principio activo se encuentra altamente disperso en forma de partículas o moléculas en una matriz. La obtención de un tipo de estructura u otra depende de las propiedades físico-químicas del principio activo y de la matriz, así como de la técnica empleada para su preparación (Lopretti *et al.*, 2007).

Las microcápsulas pueden tener forma esférica o irregular. Además, pueden estar constituidas por una membrana simple, múltiples capas e incluso núcleos múltiples (**Figura 1**) cuya matriz puede ser del mismo material o una combinación de varios (Gibbs *et al.*; 1999).



**Figura 1. Tipos de microcápsulas**

La microencapsulación protege a las bacterias de factores como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad. Además, protege a los probióticos de los bacteriófagos y facilita la manufacturación de productos fermentados. La selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del costo (Mortazavian *et al.*, 2007; Feucht y Kwak, 2013).

La inmovilización de las células bacterianas mediante la microencapsulación puede permitir su distribución homogénea en todo el producto en el que se deseen incorporar. También ayuda a fijar y/o mejorar las propiedades sensoriales del producto final (olores y sabores), al mantener inactivo el metabolismo de las células encapsulada (Martín-Villena *et al.*, 2009; Feucht y Kwak, 2013).

En los productos fermentados como el yogurt que contienen probióticos encapsulados, éstos no influyen en el perfil del sabor de este producto, especialmente durante su tiempo de almacenamiento. Se ha comprobado que su acidez es más suave cuando se encapsulan las bacterias probióticas, debido a la menor cantidad de producción de ácido (Adhikari *et al.*, 2000).

En el caso de encapsulación de probióticos se debe de tener en cuenta el tamaño y forma de partícula deseada. Las microcápsulas mayores a 100  $\mu\text{m}$  son detectables en la boca y las inferiores a 15  $\mu\text{m}$  no proveen la suficiente protección a los agentes externos. Además, las microcápsulas redondas u ovaladas presentan una mejor dispersabilidad y pueden ser más fácilmente distribuidas en el producto final. Así, el tamaño y forma de las microcápsulas dependen de los métodos y los materiales usados para prepararlas (Martín-Villena *et al.*, 2009).

### **2.6.1 Métodos de encapsulación**

Existen diversos métodos para la producción de microcápsulas. La selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del costo (Martín-Villena *et al.*, 2009). En general, los métodos de microencapsulación se pueden dividir en dos grupos:



- Procesos físicos: secado por aspersión, enfriamiento por aspersión, liofilización, recubrimiento por lecho fluidizado, extrusión, co-extrusión, extrusión-fusión, cocrystalización.
- Procesos físico-químicos: coacervación, liposomas, técnicas de emulsión (gelificación iónica o enzimática, polimerización interfacial).

Dichos métodos comúnmente cuentan con tres etapas principales en el proceso (i) incorporación de los ingredientes en una solución mediante la mezcla o dispersión, para formar el núcleo de la microcápsula; (ii) operaciones mecánicas tales como la pulverización o emulsificación, para formar las cápsulas; (iii) estabilización de producto a través de recubrimiento, seguido de un número de procesos físicos o químicos. Cada paso de microencapsulación puede ser optimizada de acuerdo con las características deseadas de la formulación final. Los procedimientos más utilizados para la microencapsulación de probióticos se basan en la formación de cápsulas por atrapamiento de las bacterias dentro de una matriz polimérica, mediante extrusión o técnicas de emulsión (Amin *et al.*, 2013).

Cabe señalar que como paso previo en dichas técnicas, primero se obtiene un cultivo de microorganismos probióticos crecidos en condiciones óptimas, los cuales son luego centrifugados y empleados en forma de suspensión o de polvo liofilizado para su posterior microencapsulación.

### **Método de extrusión o goteo**

Este método consiste en el paso forzando una solución hidrocoloide, adicionada con los microorganismos, a través de una aguja de jeringa o de una boquilla en los dispositivos generadores de goteo, sobre una solución de endurecimiento, la cual va a variar dependiendo del material empleado. El tamaño de las cápsulas obtenidas suele rondar los 2-5 mm, y éste va a depender del diámetro de salida de la solución, ya que cuanto menor sea el diámetro de la abertura correspondiente (aguja/boquilla), menor será el tamaño de las cápsulas. Esta técnica es poco agresiva, no emplea disolventes perjudiciales para las bacterias, se puede llevar a cabo tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

Por lo anterior, es una técnica ampliamente utilizada para la encapsulación de probióticos, aunque presenta algunas desventajas tales como: Difícil de producir a gran escala por lenta formación de microcápsulas, las microcápsulas son pobremente cargadas (8 %), existe susceptibilidad de los carbohidratos hacia daños y defectos estructurales, y forma diámetros de partículas de larga distribución (De Vos *et al.*, 2010).

### **Método de emulsión o sistemas de dos fases**

Esta metodología es aplicada a los microorganismos probióticos al realizar una fase dispersa que consiste en un volumen pequeño de una solución polimérica con células microbianas en suspensión, el cual se añade a un volumen mayor de aceite vegetal (aceite de soja, girasol o maíz) para formar la fase continua y esta mezcla es homogeneizada hasta desarrollar una emulsión de agua en aceite. Una vez que la emulsión se ha formado, el polímero hidrosoluble ha de ser insolubilizado mediante “cross-linking” o entrecruzamiento para formar las cápsulas dentro de la fase oleosa. El agente de entrecruzamiento a utilizar dependerá del tipo de polímero (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

La preparación de microcápsulas por emulsificación puede llevarse a cabo empleando el mecanismo de gelificación externa o interna. Para el primer caso, la gelificación externa en emulsión consta en la dispersión de una mezcla solución de alginato-componente en una fase continua no acuosa, seguido de la adición de una fuente de calcio que al difundirse a la fase dispersa inicie la gelificación permitiendo la encapsulación, y a su vez, la desestabilización de la emulsión para la separación de las cápsulas formadas. Mientras que, la técnica en emulsión por gelificación interna se fundamenta en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble o parcialmente soluble en cuyo caso se adiciona un agente secuestrante, contenido en una solución de alginato-componente el cual es dispersado en una fase continua no acuosa generando una emulsión agua en aceite (W/O) (Gouin, 2006). La liberación del ion calcio ocurre con la adición de un ácido orgánico soluble en la fase continua que al difundirse disminuye el pH del

medio solubilizando la sal y produciendo la gelificación (Champagne y Fustier, 2007).

Para ayudar a la formación de las cápsulas se suelen adicionar surfactantes, como el Tween 80, que inducen la encapsulación mediante la formación de micelas, vesículas, bicapas y micelas invertidas alrededor del producto a encapsular. Este método presenta como ventajas la formación de cápsulas mucho más pequeñas (20  $\mu\text{m}$  a 2 mm) que las obtenidas por el método de extrusión que es una característica deseable, es un proceso fácil de escalar a nivel industrial y la distribución del tamaño de partícula puede ser controlada por parámetros como la velocidad de agitación y homogenización (Poncelet, 1992; Pérez-Leornad *et al.*, 2013).

Aunque se considera que el método de encapsulación puede afectar el mecanismo de liberación del material activo, también la formulación del recubrimiento constituye un factor definitorio.

### **2.6.2 Materiales de encapsulación**

Existe una amplia variedad de materiales que pueden ser usados para encapsular ingredientes alimentarios, incluyendo aceites hidrogenados y ceras, proteínas y polímeros que proporcionan una encapsulación uniforme. Los materiales basados en lípidos presentan excelentes propiedades de barrera contra el agua, retardan la migración de gas, y son relativamente estables al calor (compuestos con un punto de fusión alto). Sin embargo, sus propiedades mecánicas a menudo son débiles. Por otra parte, las proteínas (*e.g.*, colágeno y gelatina, proteínas lácteas) y polisacáridos (*e.g.*, agar, alginato de calcio, carragenina, goma xantana, almidón, quitosano) usados en microencapsulación son habitualmente permeables a la humedad y presentan buenas propiedades de barrera a los gases y los lípidos (Picot y Poncelet, 2011).

El material protector debe reunir ciertas propiedades que dependen de las características del material a encapsular, la aplicación, las condiciones de almacenamiento y del proceso al cual será expuesto. En el caso particular de los probióticos, el alginato es el polímero natural más usado para el atrapamiento de las células debido a su bajo costo y simple mecanismo de gelatinización, su excelente biocompatibilidad e inmovilización reversible.

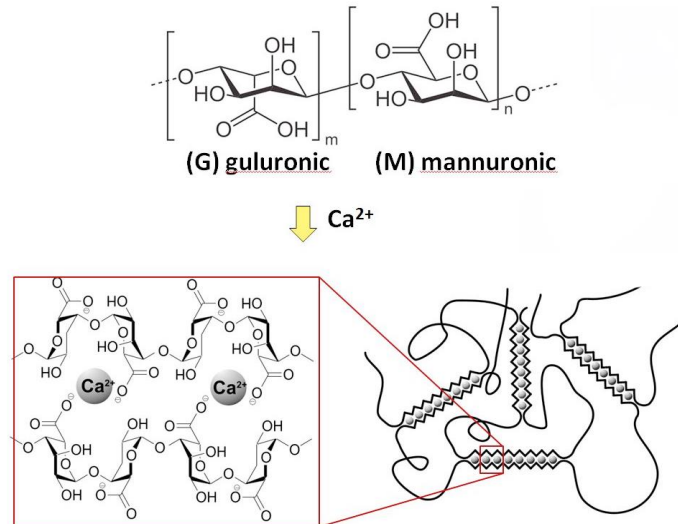
### **Alginato como material de microencapsulación**

El alginato es descrito como un polisacárido lineal poliiónico e hidrofílico, proveniente de algas marinas, conformado por dos monómeros en su estructura, el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) y el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M), los cuales se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo G-bloques (-GGG-), M-bloques (-MMM-), o heteropolímeros donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-). Tanto la distribución de sus monómeros en la cadena polimérica, así como la carga y volumen de los grupos carboxílicos confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido de G. Si en su estructura polimérica se tiene mayor cantidad de G-bloques, generalmente el gel es fuerte y frágil, mientras que con la presencia de mayor proporción de M-bloques, el gel formado se presenta suave y elástico.

El proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes (excepto el magnesio) donde el ión calcio es el más empleado por la industria alimentaria. La gelificación tiene lugar al producirse una zona de unión entre un G-bloque de una molécula de alginato que se enlaza físicamente a otro G-bloque contenido en otra molécula de alginato a través del ión calcio. La visualización de la estructura física es denominada modelo “caja de huevo” (Reddy y Reddy, 2010) mostrada en la **Figura 2**.

Entre las sales de alginato más empleadas se encuentra la sal de sodio, debido a su alta solubilidad en agua fría y característica transición sólido-gel de forma instantánea e irreversible ante el ión calcio (Funami *et al.*, 2009). También, se han desarrollado alginatos modificados químicamente tales como el alginato de

propilenglicol, empleado en la fabricación de cervezas y aderezos para ensaladas por su alta solubilidad a bajos pH. Así como otras dos nuevas familias, los derivados de la sal de amonio cuaternaria del ácido algínico y los obtenidos de injertos con acrilato caracterizados por la obtención de geles fuertes y altamente deformables (Draget *et al.*, 1997).



**Figura 2. Modelo de “caja de huevo”**

En un estudio realizado con varios agentes gelificantes incluyendo alginatos, pectato, kappa-carragenina, goma de algarrobo, goma de gelano y agar, se determinó la resistencia del gel. Los resultados mostraron que los alginatos forman un gel más firme con buena estabilidad mecánica y demostraron fácil liberación de las bacterias encapsuladas cuando se suspenden en una solución amortiguadora alcalina. Sin embargo, Cuando se utilizan en la fermentación láctica, agentes quelantes tales como el lactato pueden causar debilitamiento de gel de alginato cálcico y pueden permitir fuga de las bacterias (Kailasapathy, 2002).

En este sentido, se han atribuido algunas desventajas a las cápsulas de alginato, tales como: susceptibilidad a ambientes ácidos, exceso de iones monovalentes, agentes quelantes de  $\text{Ca}^{+2}$ , y a otros ambientes químicos agresivos, lo que origina la pérdida de su integridad y estabilidad mecánica, formación de poros en la superficie de la cápsulas y difusión relativamente rápida de humedad, causando una degradación más rápida y la liberación de ingredientes activos (Pérez-Leonard *et al.*, 2013). No obstante, policationes, como el quitosano o poli-aminoácidos (*e.g.*, poli-L-lisina) forman fuertes complejos con los alginatos dando estabilidad a las microcapsulas en presencia de quelantes de  $\text{Ca}^{+2}$ , lo que reduce la porosidad del gel. Por lo tanto, el recubrimiento de cápsulas de alginato con policationes puede mejorar la estabilidad química y mecánica de las perlas de alginato, en consecuencia, mejorar la eficacia de encapsulación.

### **Quitosano como revestimiento**

El quitosano es un biopolímero natural obtenido por desacetilación de la quitina. Los principales parámetros que influyen en las características del quitosano son su peso molecular – quitosano de bajo peso molecular proporciona una membrana más densa que el quitosano de alto peso molecular lo cual reduce la liberación de células en un 40%, y el grado de desacetilación, representando la porción de unidades desacetiladas. Estos parámetros, son determinados por las condiciones de reacción durante el proceso de preparación del quitosano (Van Loo *et al.*, 1995).

El quitosano posee una alta biocompatibilidad con otros componentes, es biodegradable, no es tóxico ni alergénico, es insoluble en agua pero soluble en soluciones ácidas, comportándose en este medio como un polielectrolito catiónico. El carácter catiónico del quitosano en solución, así como la presencia de los grupos aminos libres, hacen que pueda formar complejos estables con iones metálicos y capturar aniones (simples, poliméricos o partículas cargadas). Esta propiedad permite que el quitosano pueda polimerizar por medio de la formación de enlaces cruzados con el alginato de calcio (García-Ceja y López-Malo, 2012).

Dejar caer una solución de alginato en una solución que contengan una mezcla de cloruro de calcio y quitosano, o remojar perlas de alginato en 0.1% de quitosano (pH 6.5) durante 20 min puede formar cápsulas de alginato con un recubrimiento de quitosano (Krasaekoopt *et al.*, 2004).

A este respecto, algunos estudios han demostrado que al utilizar una mezcla de alginato-quitosano para encapsular *Escherichia coli* DH5, se obtiene una estabilidad mecánica y química de las cápsulas ante condiciones similares a las encontradas en el tracto gastrointestinal (Lin *et al.*, 2008). Por otra parte, Bruschi y Záchia (2011) realizaron una serie de mezclas con diferentes biopolímeros para encapsular *Lactobacillus plantarum* BL011; los datos obtenidos mostraron que la mezcla de alginato-quitosano provee una mayor estabilidad en la viabilidad del probiótico cuando éste es adicionado a un yogurt durante 38 días de almacenamiento en refrigeración. Otros estudios también han demostrado que el uso del quitosano como revestimiento en cápsulas de alginato incrementa significativamente el tiempo de supervivencia de *L. rhamnosus* y de *L. acidophilus* (40 a 120 min y 90 a 120 min, respectivamente) en condiciones ácidas (Sohail *et al.*, 2011).

Dependiendo de los materiales y técnicas utilizadas para la formación de la estructura de las microesferas, se genera una gran variedad de microcápsulas que pueden diferir en tamaño, composición, y función. De acuerdo esto, las microcápsulas deben de ser caracterizadas para asegurar su calidad y homogeneidad, así como su comportamiento en la liberación del material activo (Roman *et al.*, 2008).

## **2.7 Caracterización de las microcápsulas**

### **2.7.1 Características morfológicas y tamaño de partícula**

La morfología de la superficie de las cápsulas pueden ser lisa (regular y esférica) o irregular (desigual) con o sin presencia de poros, los cuales son los responsables de reducir la eficiencia de encapsulación. Para analizar las

características morfológicas de las microcápsulas, se recurre normalmente a técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM) que también permiten detectar la posible agregación de las partículas, así como determinar el tamaño de las mismas. La observación por microscopía electrónica de barrido de los cortes transversales de las micropartículas permite caracterizar la estructura interna de las mismas.

La distribución de tamaños de las microcapsulas se determinan empleando técnicas microscópicas, de tamización, sedimentación, técnicas de difracción de rayos láser o con un aparato conocido como Coulter Counter, que utiliza el principio de coulter también llamado método Electronical Sensing Zone Method (Mortazavian *et al.*, 2007; Pérez-Leonard *et al.*, 2013). El tamaño medio de las microcápsulas es un factor importante para su estabilidad y su capacidad para proteger al probiótico. Las microcápsulas más pequeñas, con diámetros entre 40 y 80  $\mu\text{m}$ , se han demostrado ineficaces a la hora de proteger a las bacterias probióticas en medio ácido; mientras que las de mayor tamaño (1-3 mm) le confieren una mejor protección. Por otra parte, las microcápsulas de mayor tamaño son demasiado grandes para añadirlas al alimento sin que se vea afectada la textura de éste, y presentan una peor capacidad para dispersar el contenido, mientras que las más pequeñas contienen menor cantidad de probiótico (Annan *et al.*, 2008).

### **2.7.2 Rendimiento de producción**

El rendimiento de producción refleja el porcentaje de las microcápsulas obtenidas con respecto a la cantidad total de material (material activo + polímero) empleado. Se trata de un control muy importante desde el punto de vista económico, teniendo en cuenta el elevado costo de la mayoría de los polímeros y materiales activos utilizados. Es, por lo tanto, conveniente recuperar en forma de microcápsulas la mayor cantidad posible del material de partida.



### 2.7.3 Eficacia y capacidad de encapsulación

Para cuantificar la cantidad de material activo encapsulado en las microcapsulas, primero habrá que disolver el polímero formador de cubierta en un disolvente adecuado o extraer el material activo utilizando un disolvente en el cual el compuesto activo es soluble y el polímero insoluble.

El contenido en material activo (m.a.) o capacidad de encapsulación hace referencia a la cantidad de material activo encapsulado en la microcápsulas. Se calcula de la siguiente manera:

Contenido m.a. (%) = (Cantidad de material activo encapsulado / Peso final de microcapsulas) x 100

El rendimiento o eficacia de encapsulación (EE) se calcula a partir de la relación entre el material activo encapsulado y el teórico o en disposición de ser encapsulado, a partir de la expresión:

EE (%) = (Logaritmo de número células viables liberadas de las cápsulas/ Logaritmo de número de células añadidas a la mezcla de polímeros) x 100

El contenido en material activo como la eficacia de encapsulación deben ser lo más elevados posibles. Es decir, es importante incorporar la mayor cantidad posible de material activo por peso de microcápsulas. Además, desde un punto de vista económico es importante que todo o la mayor parte del material activo utilizado en el proceso sea encapsulado (Mortazavian *et al.*, 2007).

### III. JUSTIFICACIÓN



El principal problema que enfrentan los microorganismos probióticos cuando son incorporados a productos fermentados, es la comprometida viabilidad y estabilidad de las bacterias derivado de los procesos tecnológicos y las condiciones ambientales relacionadas con la elaboración de los productos. Por lo anterior se han buscado diferentes alternativas para proteger a los microorganismos probióticos a través de técnicas de microencapsulación. Sin embargo se requiere la apropiada selección de materiales y métodos de microencapsulación, así como la caracterización de las microcápsulas para asegurar su calidad y homogeneidad, así como su comportamiento en la liberación del material activo. Por lo anterior la técnica que se utilizará en esta investigación que es el método de emulsión con gelificación interna para obtener un tamaño deseado de las microcápsulas. Formando microcápsulas con alginato de sodio y con revestimiento de quitosano.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 General

Microencapsular bacterias probióticas específicas empleando alginato de sodio y quitosano como revestimiento, y caracterizar las microcápsulas obtenidas en términos geométrico-morfológicos, así como de eficiencia de encapsulación y la capacidad de liberación de las cepas probióticas.

#### 4.2 Específicos

-  Evaluar *in vitro* la capacidad de crecimiento y supervivencia de las bacterias probióticas a diferentes valores de pH, y seleccionar aquellas cepas más sensibles.
-  Microencapsular las bacterias seleccionadas por el método de emulsión con alginato de sodio y como revestimiento quitosano.

- Caracterizar las propiedades micro-geométricas de las microcápsulas obtenidas.
- Determinar la eficiencia de microencapsulación y la capacidad de liberación de las cepas probióticas.

## V. Materiales y Métodos

### 5.1 Cepas y propagación de cultivos

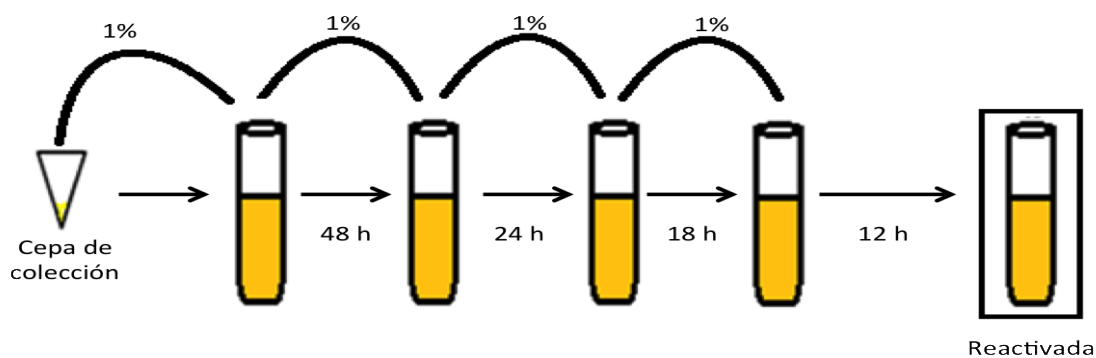
En el presente estudio se emplearon 22 cultivos bacterianos (**Cuadro 2**). Dieciséis de las cepas fueron proporcionadas por colaboradores de diferentes centros de Investigación, y las otras seis fueron aisladas de diversos productos comerciales siguiendo la metodología propuesta previamente por (Hernández-Mendoza et al., 2009).

**Cuadro 2. Bacterias probióticas empleadas en el estudio.**

NOMBRE	CÓDIGO	FUENTE
<i>L. casei</i> 7R1	Lc-7R1	<b>Universidad de Wisconsin, Laboratorio Dr. Jame Steele</b>
<i>L. casei</i> L9	Lc-L9	
<i>L. casei</i> L30	Lc-L.30	
<i>L. casei</i> ATCC334	Lc-334	
<i>L. casei</i> 12A	Lc-12A	
<i>L. casei</i> 21/1	Lc-21/1	
<i>L. fermentum</i> NRRL-B1932	L. ferm 2	<b>Universidad de las Américas, Puebla, Laboratorio Dr. López-Malo</b>
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 13075	L.rha	
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4796	L.ac	
<i>L. acidophilus</i> NRRL B-4495	L. acido 4495	
<i>L. casei</i> DCP 3968	Lc-3968	
<i>L. casei</i> NRRL B-1922	Lc-B1922	
<i>L. plantarum</i> NRRL B-4496	Lp-B4496	
<i>L. rhamnosus</i> NRRL B-442	Lr-B442	

<i>L. reuteri</i> NRRL 14171	L.r14171	Instituto Tecnológico de Veracruz, Laboratorio Dr. García-Galindo
<i>B. bifidum</i> NCFB 2715	Bb-2715	
<i>L. casei shirota</i>	L.c shi	Yakult, Japan®
<i>B. lactis</i> BB12	B1-BB12	Yogurt (Albert Heijn®)
<i>L. casei</i> CRL431	Lc-CRL431	
<i>L. helveticus</i> R0052	Lc.R0052	Maramor Chocolates™
<i>B. longum</i> R0175	B1-R0175	
<i>L.johnsonii</i> ATCC 33200	L.john	Swiss-Type Chesse, USA

Todos los cultivos fueron obtenidos congelados y fueron almacenados a -80 °C en glicerol (50 % v/v) hasta su uso. Previo a su utilización, las cepas fueron reactivadas en caldo MRS (pH 6.5, De Man, Rogosa and Sharpe, Difco™) a partir de los cultivos congelados. Posteriormente, se realizaron cuatro sub-cultivos para cada bacteria con el fin de obtener concentraciones celulares apropiadas para los experimento. Cada sub-cultivo involucró un inóculo del 1 % (v/v) con incubación durante 48, 24, 18 y 12 h, respectivamente, a 37 °C, como se muestra en el diagrama (**Figura 3**), Los tiempos de propagación fueron estimados a través de cinéticas de crecimiento y la concentración celular del último sub-cultivo se determinó mediante el método de vaciado en placa. Los resultados fueron expresados como unidades formadoras de colonias/mililitro (UFC/mL).



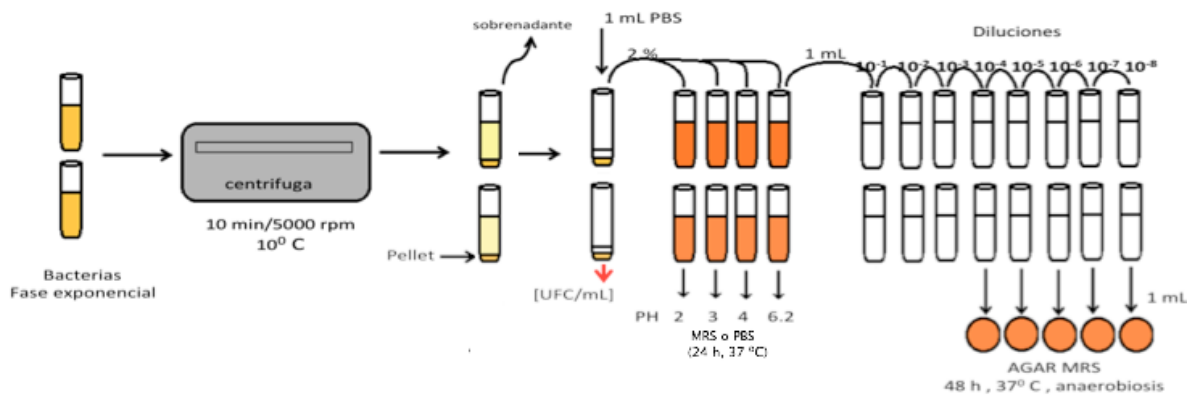
**Figura 3. Diagrama de propagación bacteriana (Caldo MRS pH 6.5, 37 °C)**

## 5.2 Evaluación de la capacidad de crecimiento y resistencia de las bacterias a diferentes valores de pH

Para realizar este ensayo se siguió la metodología descrita por Blanquet *et al.* (2004). Para ello, se recuperó por centrifugación (5000 rpm, 10 °C, 10 min) el paquete celular del ultimo sub-cultivo. Posteriormente, éste fue suspendido en 1 mL de una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS, pH 7.2) estéril. De esta suspensión se tomó una alícuota (20 µL) y se inoculó en 10 mL de MRS, para determinar la capacidad de crecimiento, o en PBS, para determinar la capacidad de resistencia (**Figura 4**). En ambos casos, el medio fue ajustado a diferentes valores de pH (2-7). Los cultivos fueron incubados a 37 °C durante 24 h y se realizó la cuenta viable por el método de vaciado en placa a las 0, 4 y 24 h, siguiendo la metodología reportada en la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994 (1994).

Las placas fueron incubadas anaerómicamente a 37 °C y todas las colonias visibles fueron contadas después de 48 h. La cuenta viable se realizó por duplicado.

Aquellas cepas que resultaron más sensibles a los diferentes valores de pH en ambos ensayos fueron pre-seleccionadas para ser protegidas por el método de microencapsulación.



**Figura 4.** Evaluación de la capacidad de crecimiento y resistencia de las bacterias a diferentes valores de pH.

### **5.3 Microencapsulación por emulsión (Gelificación interna)**

Para realizar este ensayo se siguió la metodología descrita por Lin *et al.*, (2008), la cual se describe brevemente a continuación.

#### **a) Preparación de los cultivos**

Las cepas activas fueron propagadas en caldo MRS mediante dos subcultivos (12 y 10 h, respectivamente) a 37 °C. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se recuperaron los diferentes paquetes celulares (5000 rpm, 10 °C, 10 min) y se ajustaron todos a una misma concentración ( $10^9$  UFC/mL).

#### **b) Preparación del material de microencapsulación**

Se prepararon 100 mL de alginato de sodio (1.8%, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) ajustado a un valor de pH de 6.9 (Chandramoli *et al.*, 2004; Ding y Shah, 2009). Adicionalmente, se prepararon 100 mL de quitosano (0.5%, Sigma) en una solución de ácido acético (Sigma) al 0.25%, la mezcla se ajustó a un pH de 5 (Junzhan *et al.*, 2012). Finalmente, se prepararon 100 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0.1 M, Sigma) como solución endurecedora. Todas las soluciones se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 min.

#### **c) Microencapsulación de las bacterias probióticas**

Una suspensión de 25 mL de cada una de las bacterias probióticas ( $10^9$  UFC/mL) se incorporó en 100 mL de alginato de sodio hasta obtener una mezcla completamente homogénea. Dicha mezcla fue posteriormente agregada a 250 mL aceite de Girasol comercial adicionado con 4 mL de span 80 (Sigma) como emulsificante y se mantuvo en agitación en una placa magnética (700 rpm) durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se adicionaron 5 mL de ácido acético manteniéndose la agitación constante durante otros 15 minutos. Finalmente, se adicionó la solución de  $\text{CaCl}_2$  y la mezcla se agitó (700 rpm) durante 30 minutos más (Poncelet *et al.*, 1992; Chandramouli *et al.*, 2004; Ding y shah, 2009).

Una vez finalizada la agitación, la mezcla se dejó en reposo durante 15 minutos hasta obtener una separación visual de las microcápsulas. Éstas fueron recuperadas por filtración y lavadas tres veces con tween 80 (Sigma) al 1% y posteriormente con agua milli-Q estéril. Las microcápsulas obtenidas se sumergieron en la solución de quitosano durante 30 minutos. Después, se le realizaron lavados con tween 80 al 1% y agua milli-Q estéril (Junzhan *et al.*, 2012). Las microcápsulas fueron colocadas en frascos estériles con papel filtro (Whatman® # 4) y se colocaron en la incubadora a 37 °C durante 24 h para eliminar los restos de humedad.

## 5.4 Caracterización de las microcápsulas

### 5.4.1 Eficacia de encapsulación y capacidad de liberación de las cepas

Con el objetivo de evaluar la eficacia y capacidad de microencapsulación, muestras de un gramo de las microcápsulas correspondientes fueron suspendidas con 9 mL de diferentes soluciones amortiguadoras (citrato de sodio, PBS, agua peptonada), todas preparadas a una concentración de 0.1 M y un pH de 7. Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 60 min. Una vez transcurrido el tiempo, éstas fueron agitadas empleando un Stomacher® 80 biomaster (Seward Ltd., Alemania) durante 15 minutos a una velocidad de 300 rpm. Acto seguido, las bacterias fueron cuantificadas por el método de vaciado en placa tomando 1 mL de las muestras homogeneizadas con posteriores diluciones seriadas. Alícuotas diluidas de 1 mL fueron plaqueadas con agar MRS (**Figura 5**). Las placas fueron incubadas anaeróbicamente durante 48 h a 37 °C (Sheu y Marshall 1993; NOM-110-SSA1-1994).

El contenido de material activo (m.a.) microencapsulado se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido m.a. (\%)} = (\text{Cantidad de material activo encapsulado} / \text{Peso final de microcapsulas}) \times 100$$

La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

EE (%)= (Logaritmo de número células viables liberadas de las cápsulas/  
Logaritmo de número de células añadidas a la mezcla de polímeros) x 100



**Figura 5.** Metodología empleada para evaluar la eficacia y capacidad de encapsulación.

Por otra parte, se emplearon bacterias marcadas con un colorante fluorogénico – carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFDA-SE ), para verificar la incorporación de las bacterias probióticas en las microcápsulas.

Para preparar el colorante fluorogénico, 2 g de CFDA-SE (Molecular Probes, OR, USA) fueron disueltos en 20  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (Sigma). Esta solución fue diluida por la adición de 1 mL de etanol (grado reactivo ), esterilizada por microfiltración (0.2  $\mu$ m) y almacenada a -20 °C. Previo a su utilización, el CFDA-SE preparado fue diluido con PBS estéril (10%, v/v) para obtener una concentración final de 5  $\mu$ M (Logan *et al.*, 1998).

Los cultivos bacterianos incubados durante 10 h en caldo de MRS (pH 6.5, 37°C) fueron recuperados por centrifugación (5000 rpm, 4 °C, 10 min) y lavados tres veces con PBS. Posteriormente, las bacterias se ajustaron a una concentración de 10<sup>9</sup> UFC/mL y se adicionaron 100  $\mu$ L de la solución preparada de CFDA-SE por cada mL de suspensión de cepa. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad. Después, las bacterias fueron lavadas tres veces para eliminar el exceso de CFDA-SE, y se re-suspendieron en 1 mL de PBS. Una alícuota (10  $\mu$ L) de las muestras fue observada en un microscopio óptico con aplicación para fluorescencia para validar el marcaje fluorescente de las



bacterias, mientras que el resto fue utilizado para microencapsulación siguiendo la metodología descrita anteriormente. Las microcápsulas obtenidas fueron observadas en el microscopio con y sin fluorescencia. El microscopio utilizado fue un Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Jena, Alemania) equipado con una lámpara de arco de mercurio (HAL 100/HBO), un set de filtros EX BP (395-440, 450-490, 530-585) y una cámara digital monocromática (AxioCam ICm1 de 1.4 megapíxeles, Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron tomadas usando el software ZEN 2012 lite (Carl Zeiss) y objetivos 5x/0.12 M27, 40x/0.65 M27 y 100x/1.25 Oil WD=0.22 M27 (A-Plan, Carl Zeiss).

#### **5.4.2 Propiedades micro-geométricas de las cápsulas**

El estudio morfo-métrico de las microcápsulas se llevó a cabo mediante el análisis de imágenes (n=10) adquiridas con una cámara digital monocromática acoplada a un microscopio óptico con aplicación para fluorescencia con objetivo "A-Plan". La determinación del diámetro, radio, volumen, forma, tamaño promedio de partícula de las microcápsulas se realizó con la ayuda del software ZEN 2012 lite.

#### **5.4.3 Efecto de la humedad relativa sobre algunas propiedades micro-geométricas de las microcápsulas**

El efecto de la humedad relativa sobre las cápsulas fue determinado empleando un método estático, el cual consistió en el uso de ácido sulfúrico (Fisher Scientific, Reino Unido) diluido para obtener diferentes humedades relativas en equilibrio (**Cuadro 3**) en cámaras herméticas cerradas (Al-Muhtaseb *et al.*, 2004). Antes de iniciar el ensayo, las soluciones de ácido fueron contenidas individualmente en las cámaras herméticas durante 24 h a 30 °C para permitir que el vapor de agua saturara la atmosfera hasta alcanzar un equilibrio. Entonces, 1 g de microcápsulas fueron colocadas en las diferentes cámaras por un periodo de 15 días. El peso de las muestras fue registrado en intervalos apropiados. Adicionalmente, se evaluó la viabilidad y se estudiaron las propiedades morfo-

métricas de las cápsulas como se describió previamente. El experimento se llevó a cabo por triplicado

**Cuadro 3.** Actividad de agua obtenida con diferentes soluciones de ácido sulfúrico a 30 °C.

Solución de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Actividad de agua (a <sub>w</sub> )
5	0.9808
30	0.7549
40	0.5711
50	0.3574

#### 5.4.4 Determinación de hidrofobicidad superficial de las microcápsulas

Para realizar este ensayo se siguió la metodología descrita por Vallejo *et al.*, 2008. Dos mililitros de una suspensión de microcápsulas, con densidad óptica conocida (DO<sub>600nm</sub>= 0.5), se mezclaron con 0.4 mL de p-xileno (Fluka-Sigma) durante 1 min en vórtex. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se extrajeron 600 µL de la fase acuosa y se les determinó la densidad óptica a 600 nm. El porcentaje de hidrofobicidad (%H) fue calculado con la ecuación:

$$\% H = 1 - \frac{A_0 - A}{A_0} * 100$$

Dónde, A = Densidad óptica inicial y A<sub>0</sub> = Densidad óptica después de 15 min.

#### 5.4.5 Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad de las bacterias microencapsuladas y sobre las propiedades morfo-geométricas de las microcápsulas

Las microcápsulas cargadas con las bacterias probióticas fueron almacenadas a dos temperaturas, 4 y 25 °C. Se estableció un calendario de muestreo a lo largo de los 15 días de almacenamiento tomando 1 g de muestra cada tercer día. El recuento de células viables se realizó mediante el método de

vaciado en placas siguiendo la metodología descrita anteriormente en la sección 5.4.1.

Además, durante el periodo de almacenamiento se realizó un seguimiento morfo-geométrico de las microcápsulas, mediante el análisis de fotografías capturadas con un microscopio óptico.

### **Análisis estadístico**

Para determinar diferencias significativas en los resultados, se realizó un análisis de varianza (GLM-ANOVA) con un 95% de confianza mediante un diseño factorial para ver el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre las microcapsulaciones, se monitoreo a diferentes tiempos durante 15 días con un diseño factorial de  $2^2 \times 6$  donde las variables de respuesta fueron diámetro, radio, área, volumen,  $\text{Log}^{10}$  UFC/mL. Por otra parte también se evaluó el efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ) con un diseño factorial de  $4 \times 2 \times 6$  para las mismas variables de respuesta además de la evaluación de la pérdida de peso. Finalmente también se evaluó la liberación microbiana de las microcápsulas en diferentes soluciones amortiguadoras mediante un diseño de bloques al azar donde el tipo de solución amortiguadora fue el factor de bloqueo y la variable de respuesta de densidad poblacional liberada en cada solución. En el caso de encontrar diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) se aplicó la prueba de comparación múltiple entre medias, Todos los análisis se llevaron a cabo usando el programa estadístico NCSS-2007.

## **VI Resultados y Discusión**

### **6.1 Evaluación de la capacidad de crecimiento y resistencia de las bacterias a diferentes valores de pH**

La tolerancia a condiciones ácidas es una propiedad deseable en cualquier cepa probiótica, ya que esta característica favorece su sobrevivencia durante los tratamientos tecnológicos y su paso a través del tracto gastrointestinal. De esta manera se garantiza su colonización a nivel intestinal en mayor número y en

mejores condiciones. Por este motivo, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentos (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), establecieron la capacidad de resistencia a la acidez como uno de los criterios *in vitro* en la selección de microorganismos probióticos (FAO/OMS, 2002).

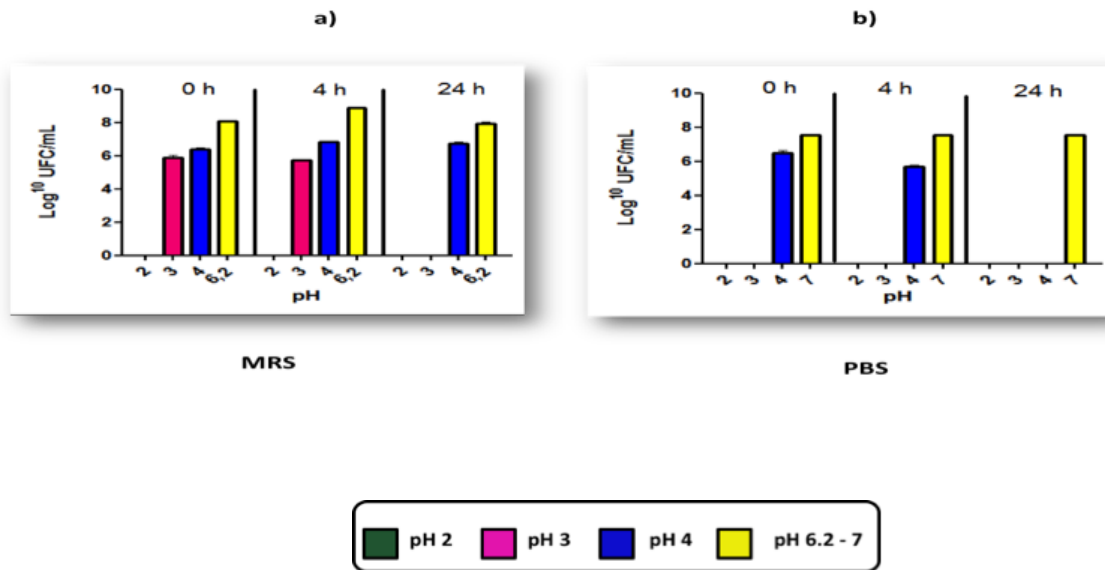
Los datos obtenidos en este estudio revelaron que todas las bacterias mostraron una capacidad variable para crecer y/o resistir a los diferentes valores de pH evaluados (**Figura 6A-K**). El 60% de las cepas fue capaz de crecer a valores de pH 3 después de 4 h de incubación.

Resultados similares han sido publicados con anterioridad (Bao et al., 2010) reportaron 11 cepas de *Lactobacillus fermentum* con alta tolerancia a la acidez gástrica con porcentajes de sobrevivencia del 80 % luego de 3 h de incubación a pH 2.5. Asimismo, (Maragkoudakis et al., 2006) encontraron que la cepa *L. rhamnosus* ACA-DC 112 presentó un porcentaje de supervivencia del 80 % cuando fue inoculado en medio de cultivo ajustado a pH 2, después de 2 h.

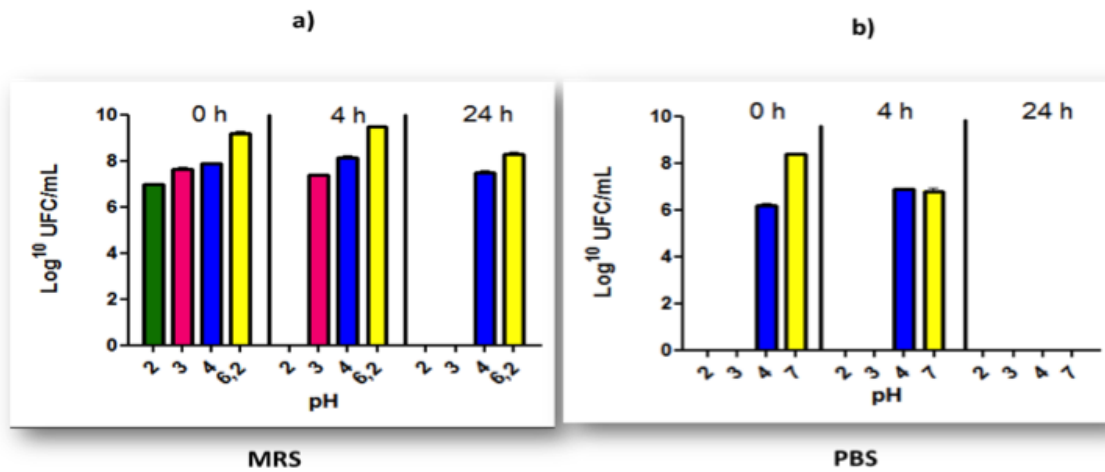
Sin embargo, de las 22 bacterias probióticas evaluadas, hubieron 6 cepas (L.ferm 2, L.rha, Lp-B4496, L.r14171, B1-R0175 y Lr-B442) las cuales mostraron nula capacidad de resistir 4 h de exposición a los diferentes valores de pH evaluados. Estos resultados se pueden observar a continuación (**Figura 6A-K**).

Estos resultados sugieren que más del 70 % de las bacterias probióticas usadas en este trabajo podrían tolerar el tiempo normal de tránsito gastrointestinal, el cual comprende de 2 a 4 h (Cueto-Vigil et al., 2010). Estos resultados surgieron a la necesidad de proteger las 6 cepas sensibles para aumentar su viabilidad ante estas condiciones, por lo que dichas cepas fueron seleccionadas para ser microencapsuladas.

**L.c- 334**

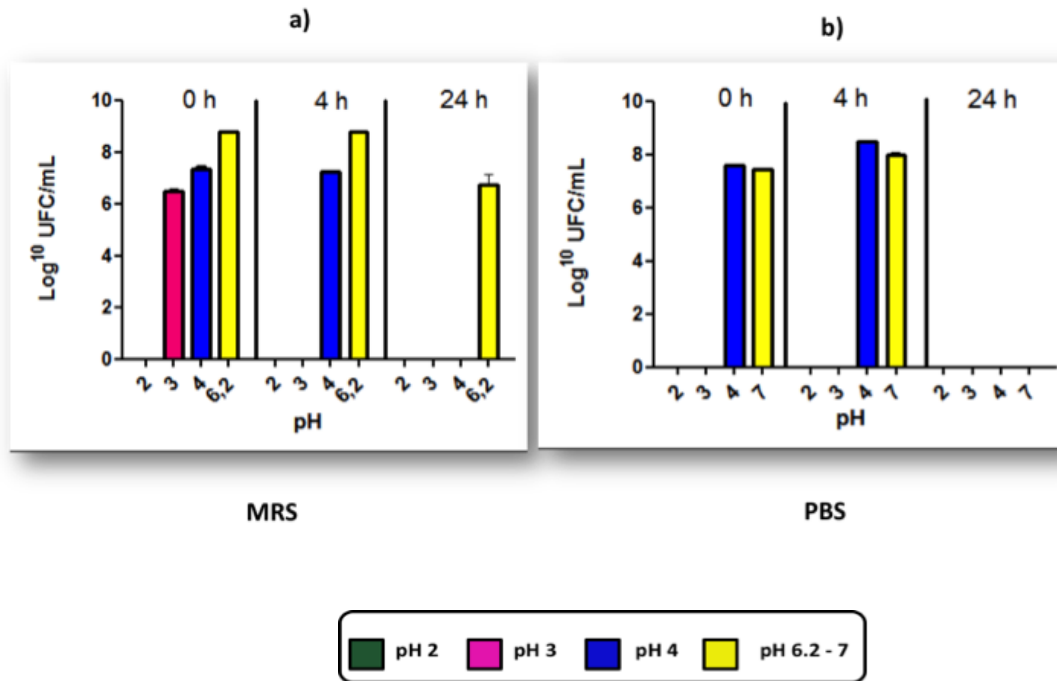


**L.ac**

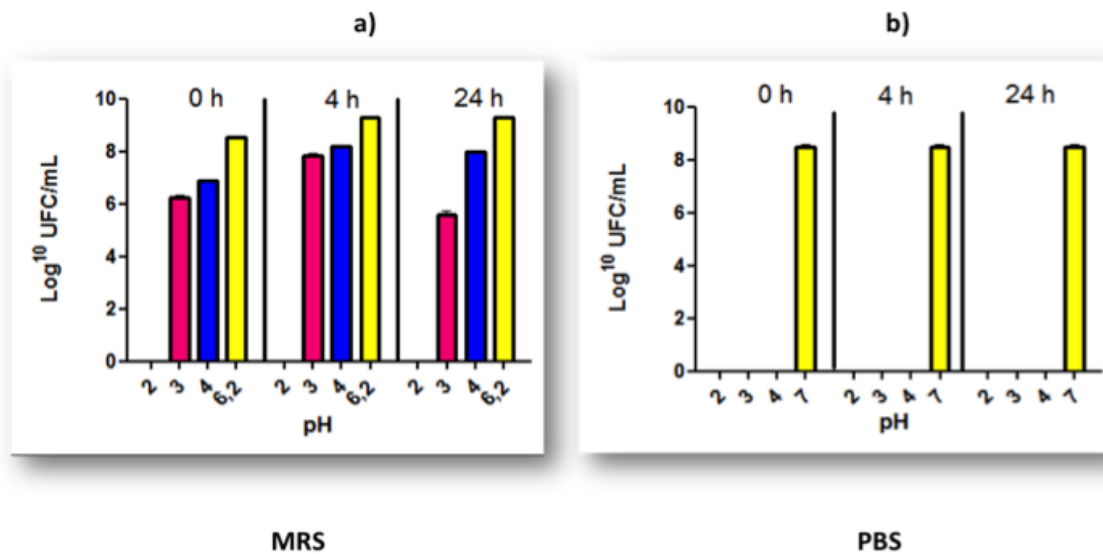


**Figura 6A.** Crecimiento (a) y resistencia (b) de diferentes cepas probióticas (*L.c-334* y *L.ac*) en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.

## B1-BB12

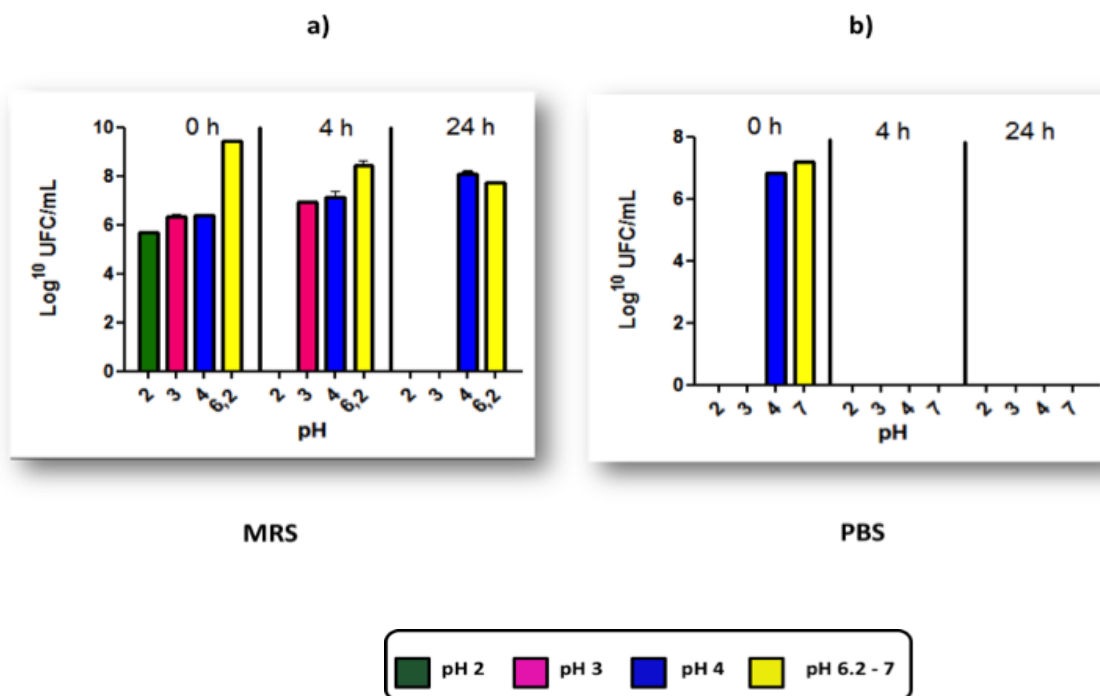


## Lc-L9

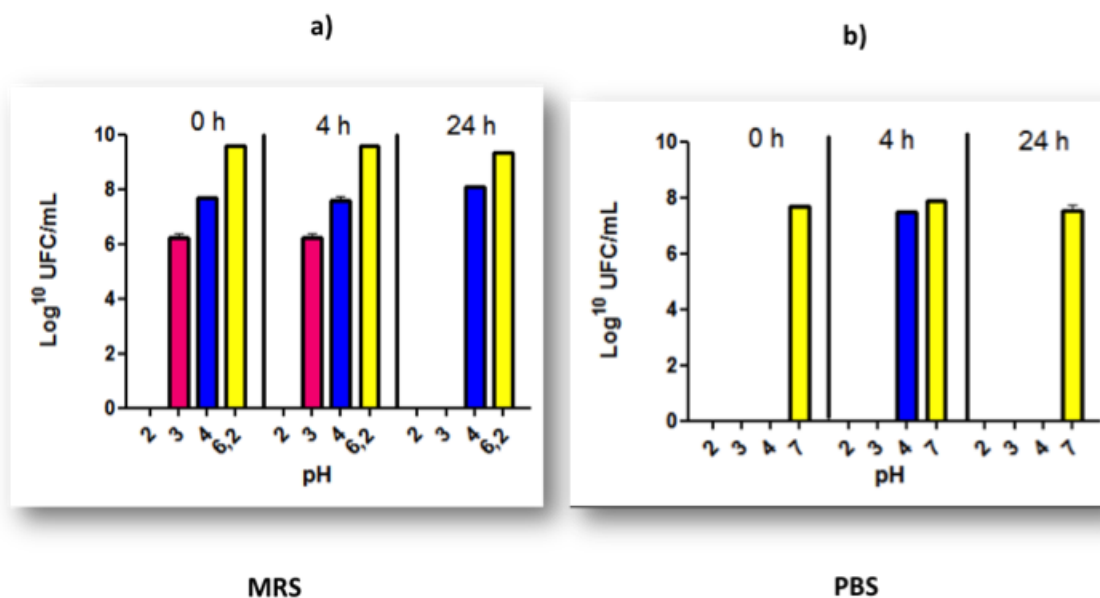


**Figura 6B.** Crecimiento (a) y resistencia (b) de diferentes cepas probióticas (B1-BB12 y Lc-L9) en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.

### *L.r-14171*

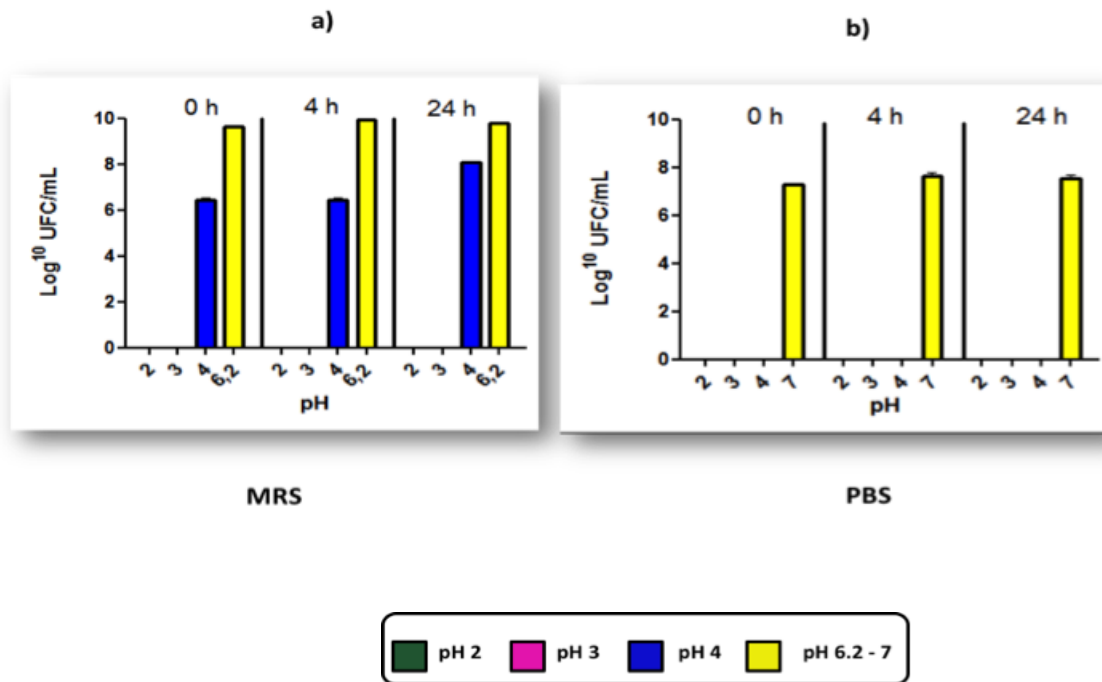


### *L.c-7R1*

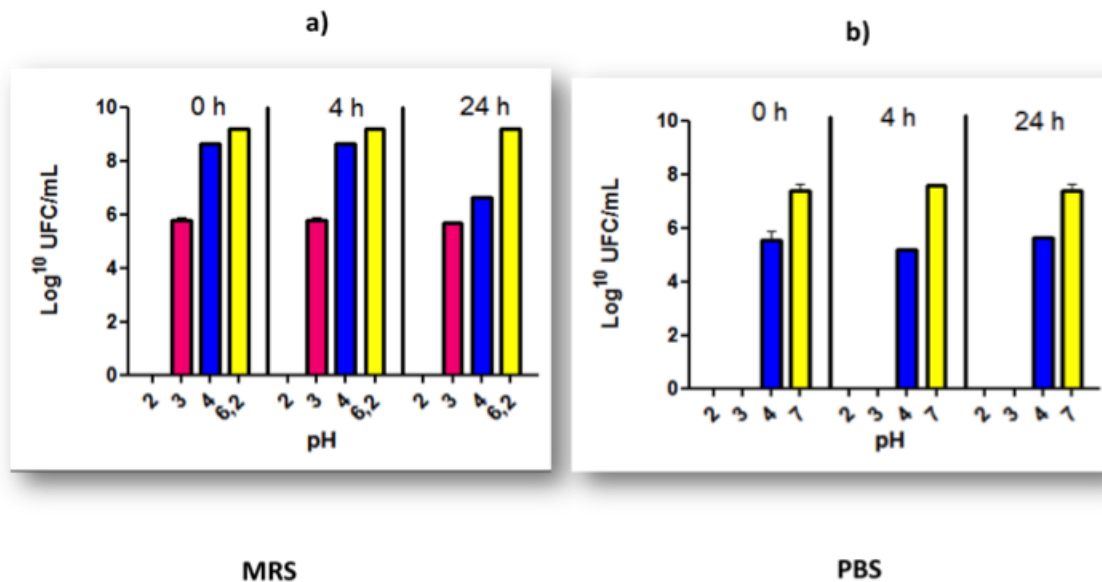


**Figura 6C.** Crecimiento (a) y resistencia (b) de diferentes cepas probióticas (*L.r14171* y *L.c-7R1*) en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.

### L.c- 21/1



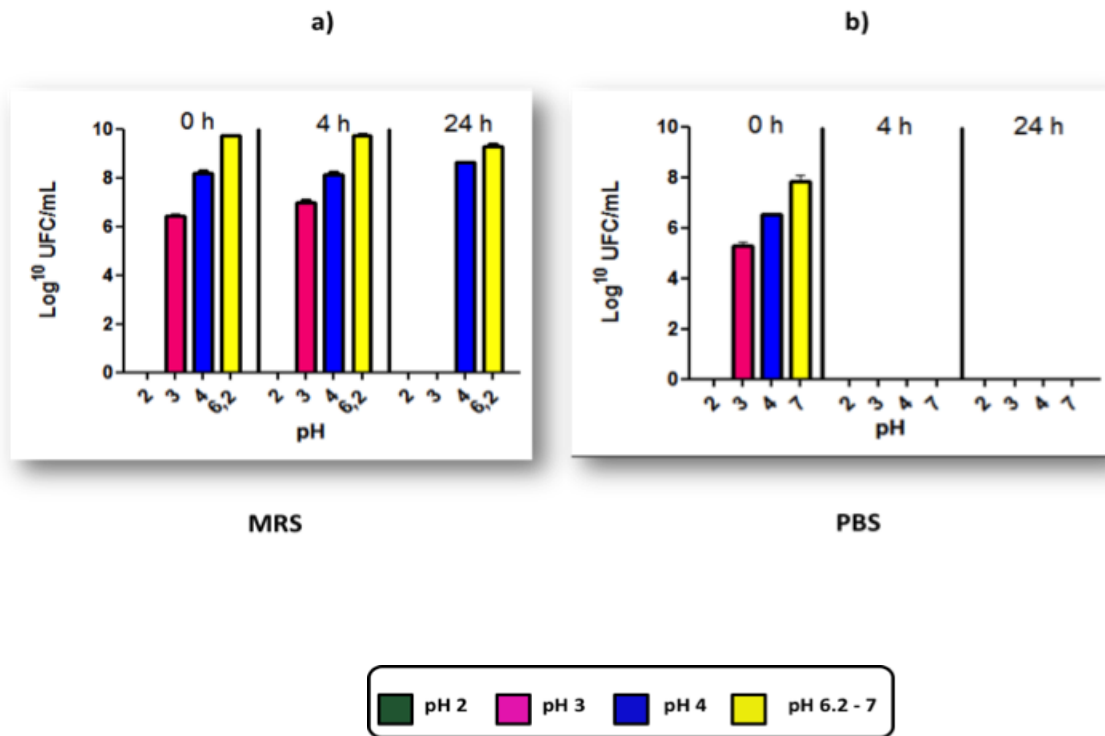
### L.c-R0052



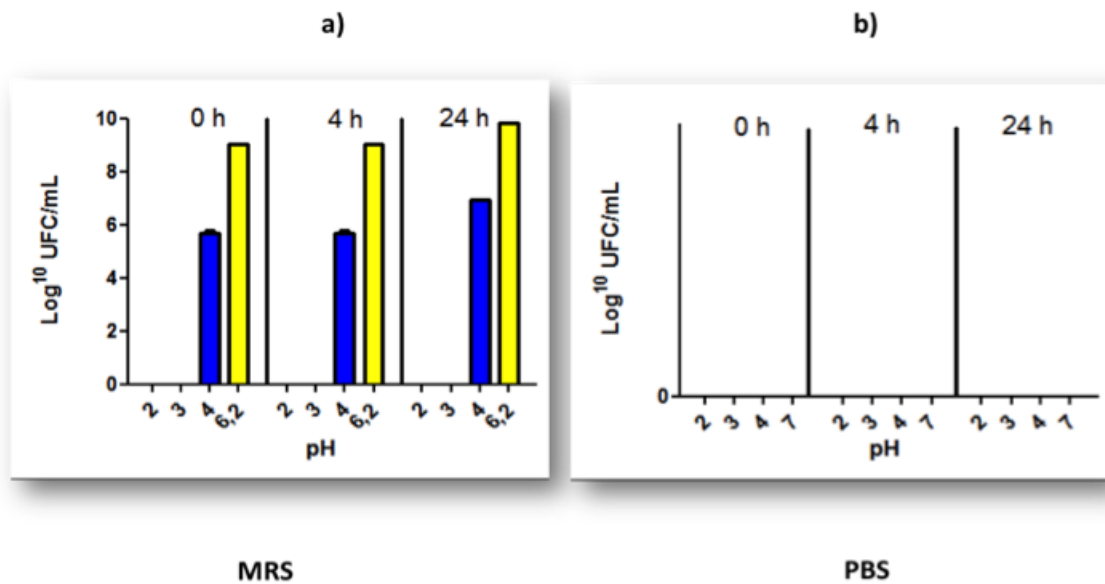
**Figura 6D.** Crecimiento (a) y resistencia (b) de diferentes cepas probióticas (L.c-21/1 y L.c-R0052) en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.



### B1- R0175

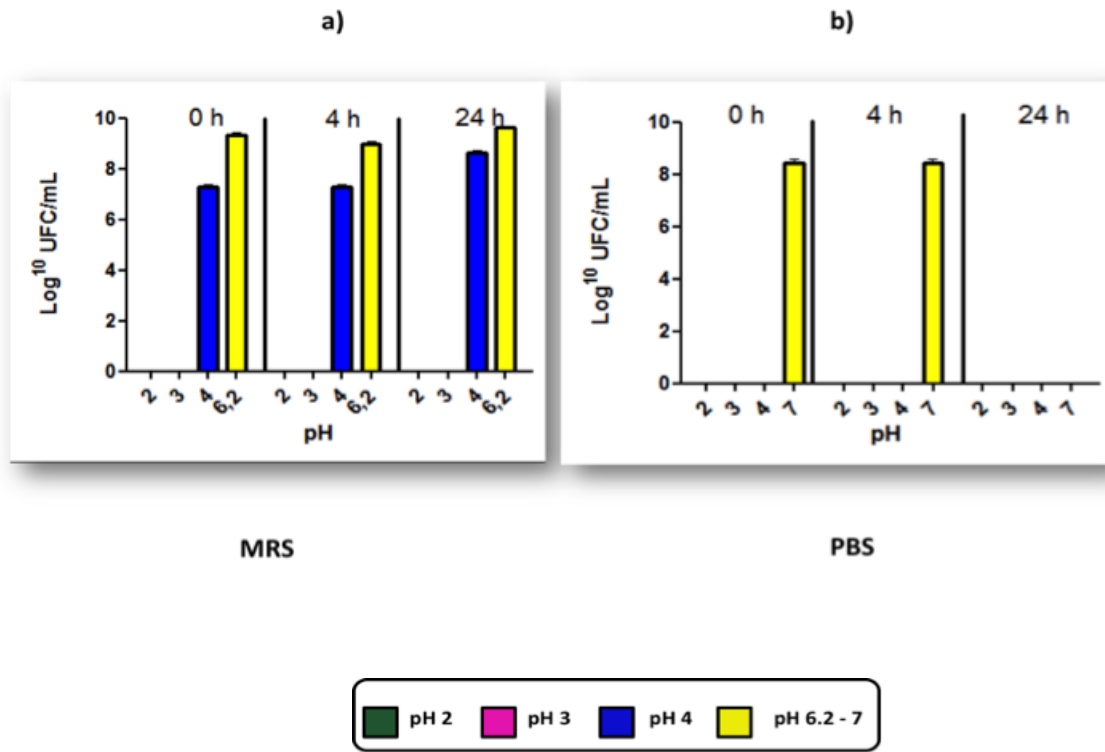


### L.Rha

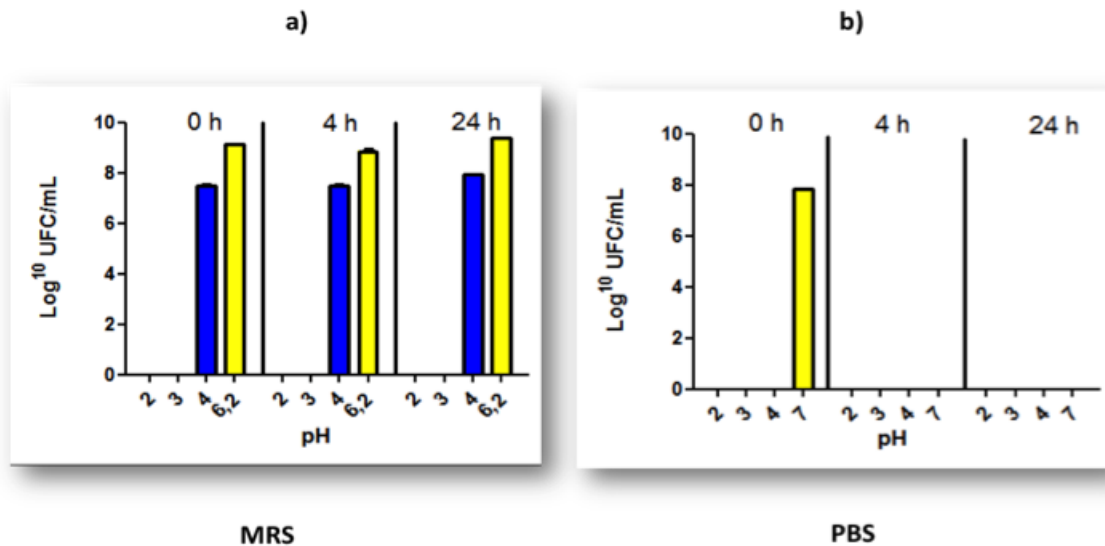


**Figura 6E.** Crecimiento (a) y resistencia (b) de diferentes cepas probióticas (B1-R0175 y L.-Rha) en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.

### *L. John*

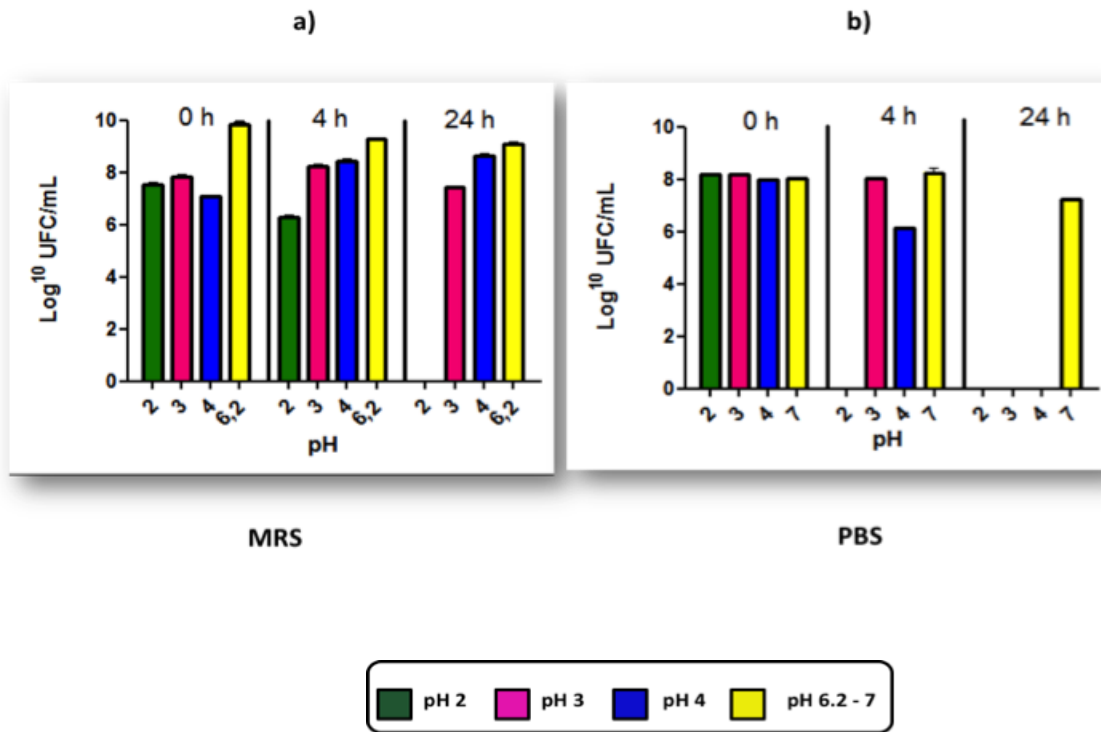


### *L.pB-4496*

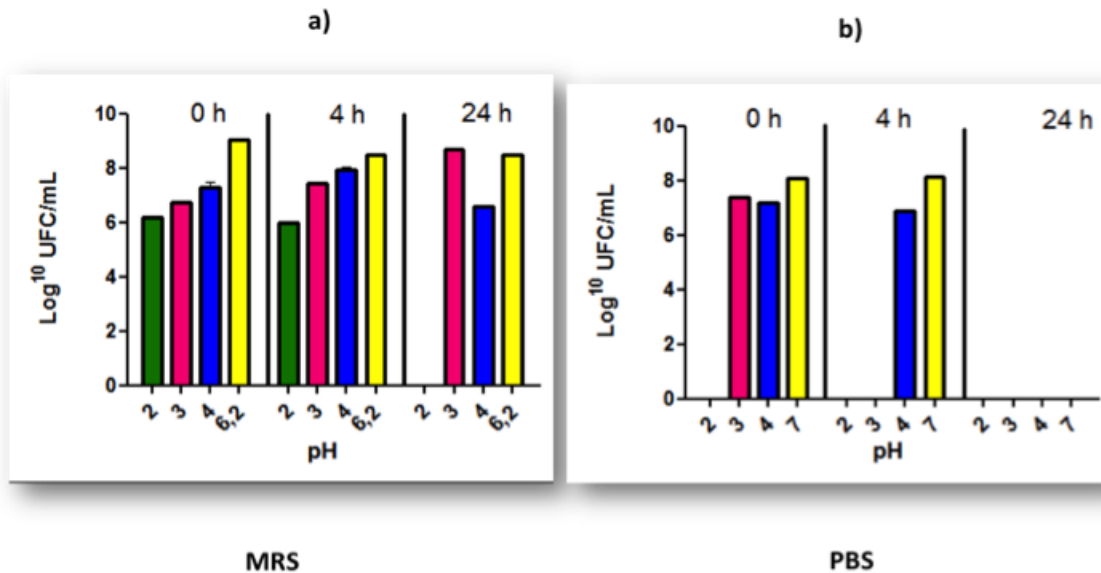


**Figura 6F.** Crecimiento (a) y resistencia (b) de diferentes cepas probióticas (*L. John* y *L.pB-4496*) en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.

### B.B-2715

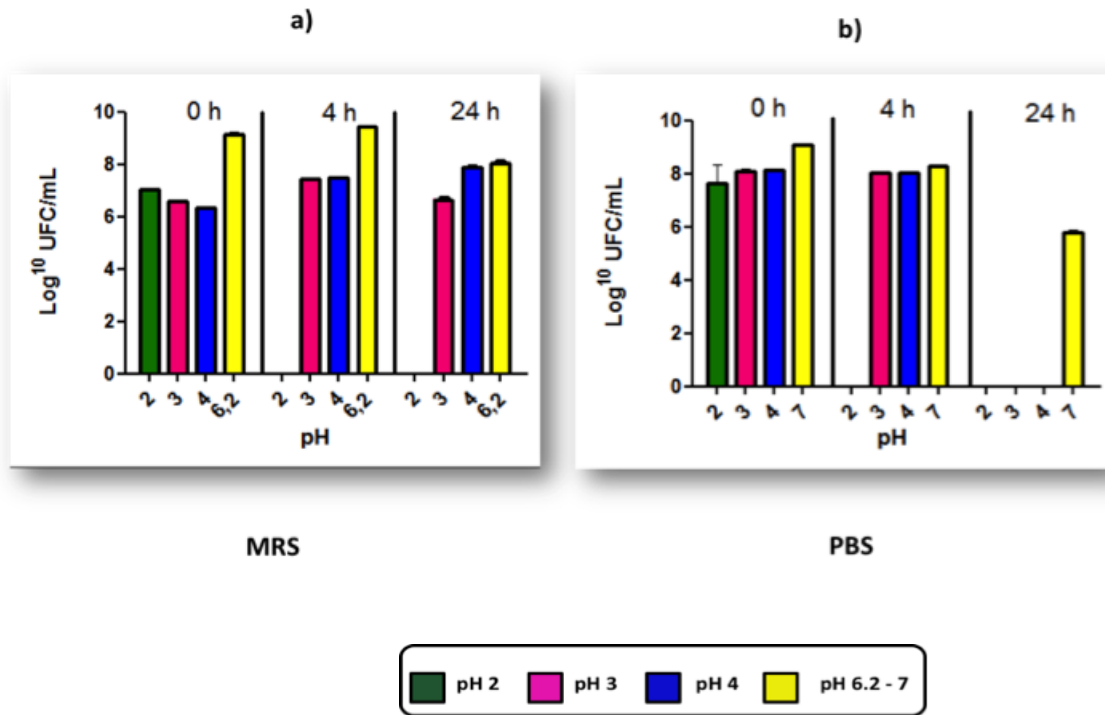


### L.c-12A

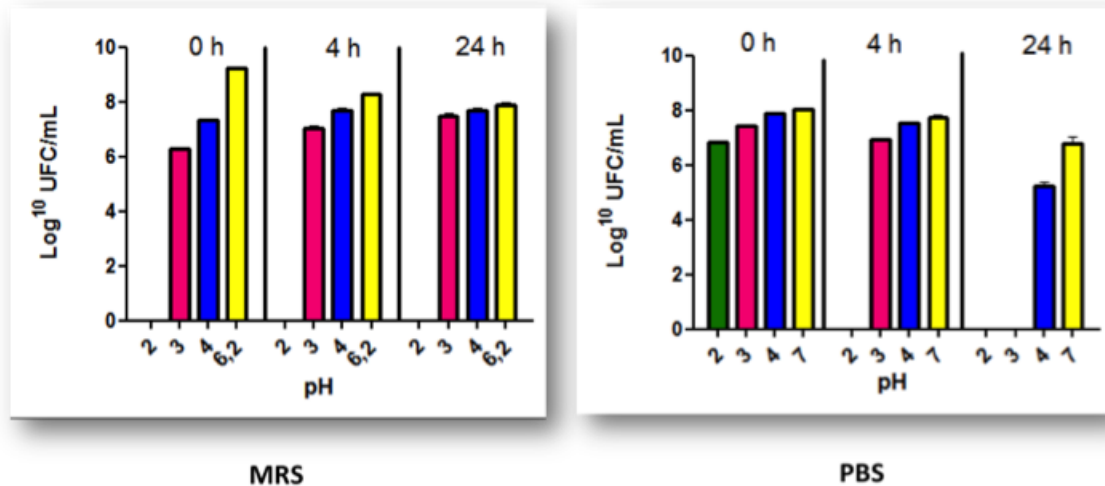


**Figura 6G.** Crecimiento (a) y resistencia (b) de diferentes cepas probióticas (B.B-2715 y L.c-12A) en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.

### L.C- CRL431

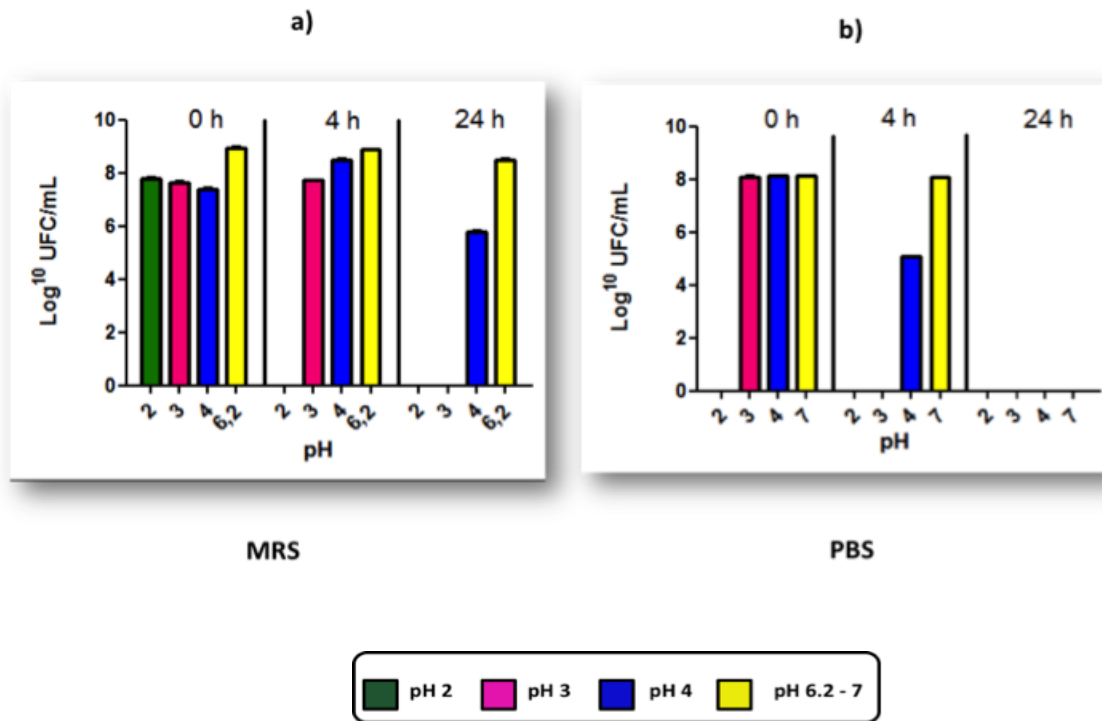


### L.c-B1922

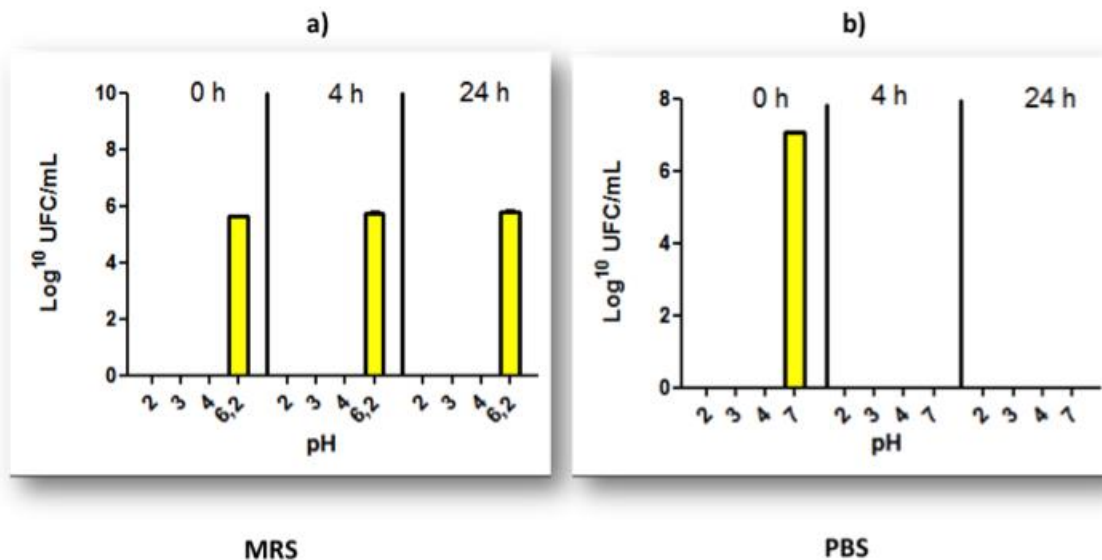


**Figura 6H.** Crecimiento (a) y resistencia (b) de diferentes cepas probióticas (L.c-CRL431 y L.c-B1922) en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.

### *L.c-shi*

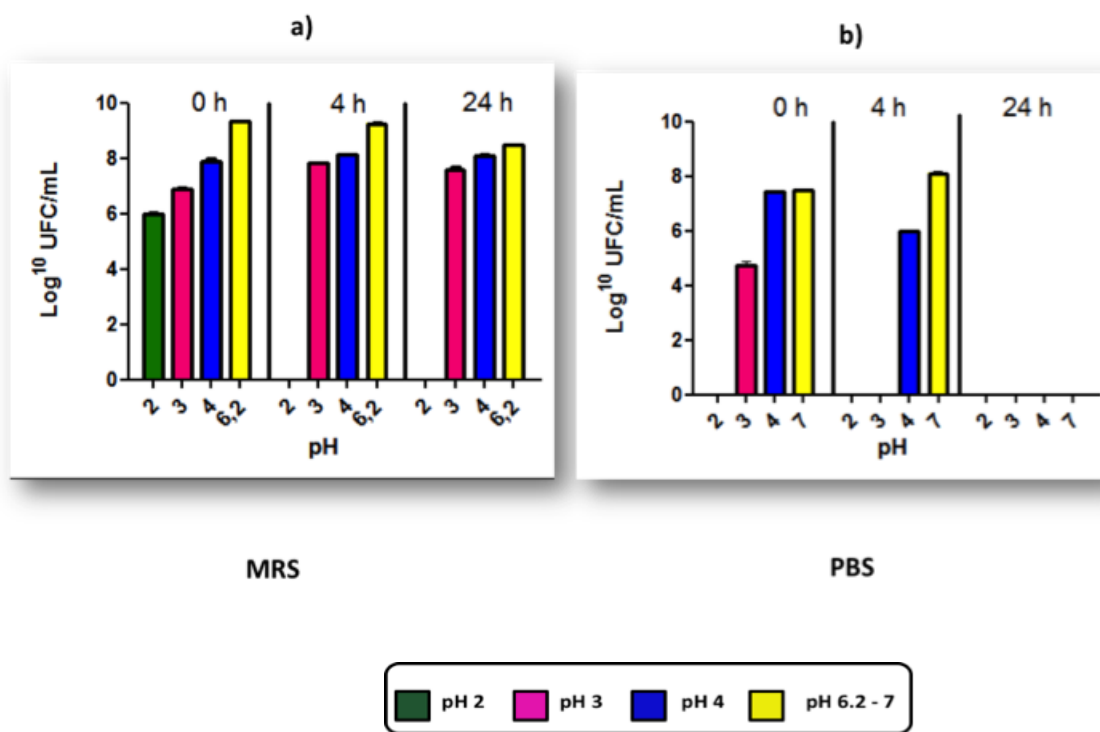


### *L.r-B-442*

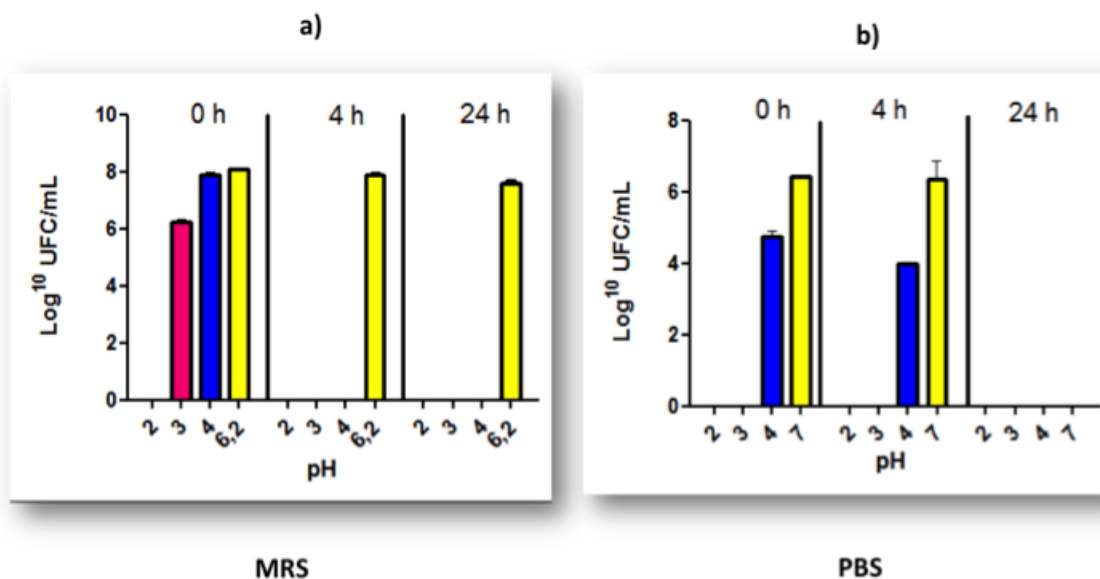


**Figura 6I.** Crecimiento (a) y resistencia (b) de diferentes cepas probióticas (*L.c-shi* y *L.r-B-442*) en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.

### L.c- L30

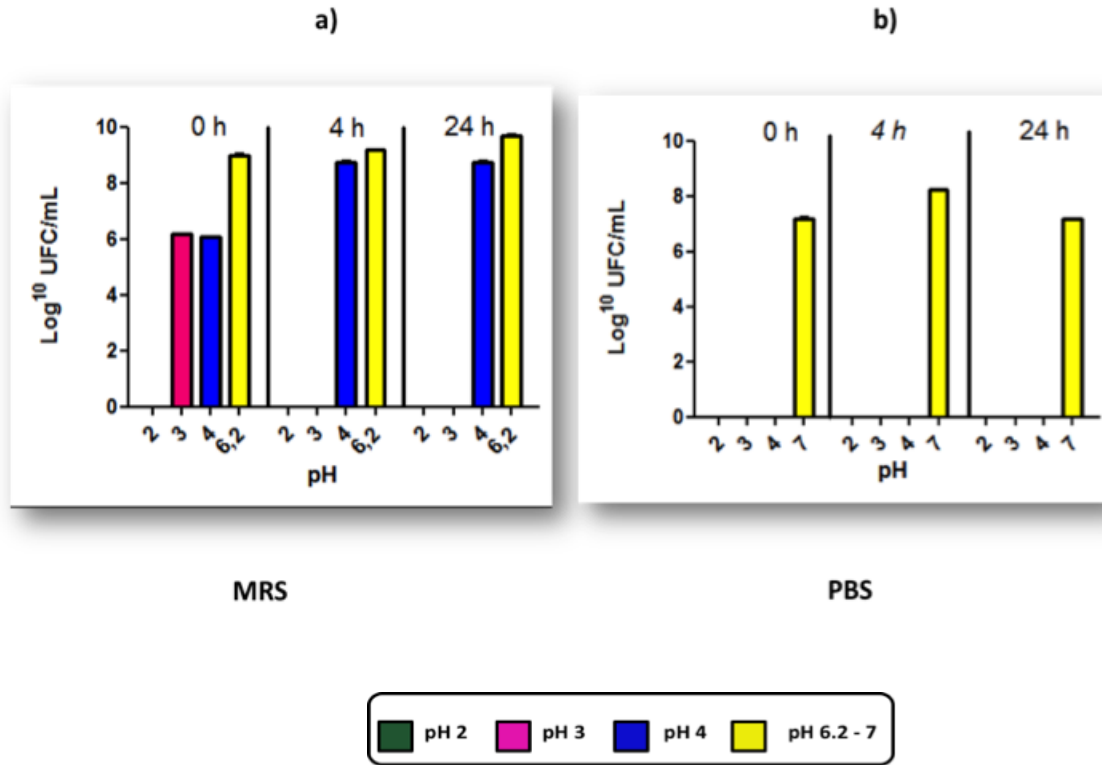


### L.Acido-4495

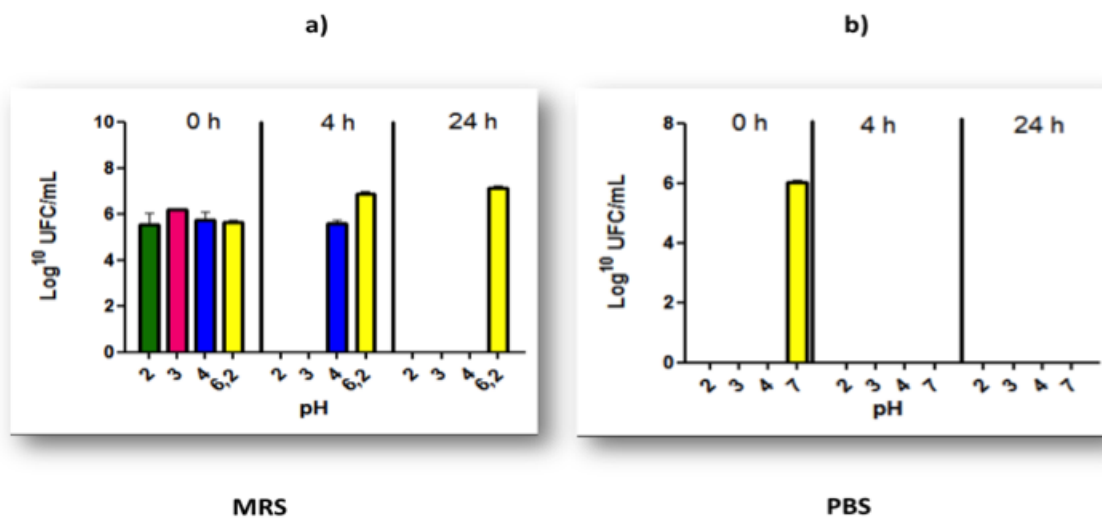


**Figura 6J.** Crecimiento (a) y resistencia (b) de diferentes cepas probióticas (L.c-L30 y L.Acido-4495) en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.

### *L.c-3968*



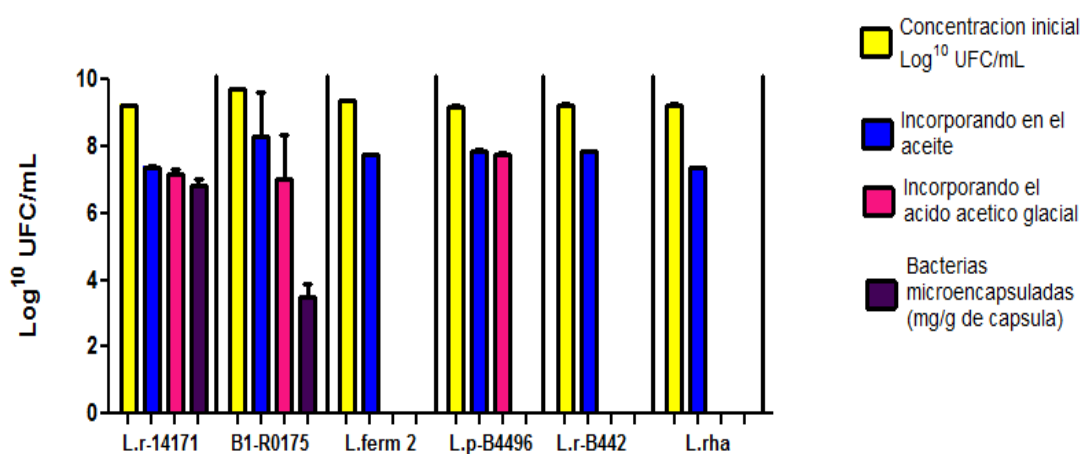
### *L.Ferm 2*



**Figura 6K.** Crecimiento (a) y resistencia (b) de diferentes cepas probióticas (*L.c-3968* y *L.Ferm 2*) en MRS y PBS, respectivamente, a diferentes valores de pH y durante diferentes tiempos de incubación.

## 6.2 Microencapsulación por emulsión (gelificación interna)

Los datos obtenidos mostraron que el proceso de microencapsulación afectó de forma cepa-dependiente la viabilidad de las 6 bacterias probióticas previamente seleccionadas, siendo L.ferm 2, L.rha, Lp-B4496 y Lr-B442 las más sensibles. Por lo tanto, se evaluó de forma independiente el efecto sobre la viabilidad de las cepas de los diferentes componentes involucrados en el proceso de microencapsulación citado en la sección 5.3 (**Figura 7**).



**Figura 7.** Cuenta viable de las cepas probióticas durante los diferentes pasos del proceso de encapsulación.

Estos resultados muestran que la pérdida de viabilidad de algunas cepas bacterianas estuvo asociado con la incorporación del ácido acético para la acidificación del sistema. Estos resultados son congruentes con los reportados por (Song *et al.*,2013) quienes evaluaron la microencapsulación de bacterias mediante dos técnicas diferentes, emulsión/gelificación externa, y emulsión/gelificación interna. Los autores consideraron que uso del ácido fue el factor más significativo en la pérdida de la viabilidad celular en ambas técnicas. En contraste, L.r14171 y B1-R0175 mostraron mayor tolerancia en este paso. La capacidad de adaptación y la respuesta a bajos valores de pH por algunas



bacterias Gram positivas, como *B. longum* y *L. reuteri*, implican el uso de las bombas de protones, cambios de la membrana celular, cambios de pH interno acompañados por un mayor contenido de amonio en el citoplasma, la inducción de vías de reguladores transcripcionales, alteración del metabolismo, y el papel de la densidad celular y la señalización celular (Cotter y Hill, 2003). Por otra parte, otros parámetros del proceso, tales como velocidad de agitación, concentración del emulsificante, y la relación W/O, no mostraron efecto significativo sobre la viabilidad de las células (Yun *et al.*, 2003; Gonzalez-Ramos *et al.*, 2013).

Al final del proceso de encapsulación, L.r14171 perdió ca. 2 ciclos logarítmicos; sin embargo, fue la única cepa que mostró una concentración celular mayor  $10^6$  UFC/mL, concentración mínima requerida en los alimentos para ser considerados como probióticos (Talwalkar y Kailasapathy, 2004). Por esta razón, ésta cepa fue la única seleccionada para la caracterización de las microcápsulas.

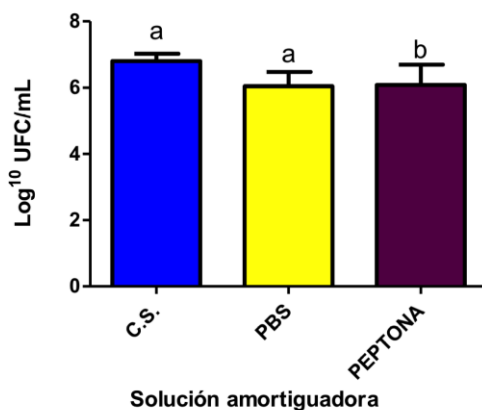
### **6.3. Caracterización de las microcápsulas**

#### **6.3.1 Eficacia de encapsulación y capacidad de liberación de las cepas**

De acuerdo a la metodología de microencapsulación implementada en este estudio, se obtuvo un promedio de 27 g de cápsulas al final del proceso. La cuenta viable de L.r14171 antes de la encapsulación fue de  $9.241 \text{ Log}^{10}$  UFC/mL. Una vez encapsulado, se realizó un ensayo comparativo de liberación empleando tres diferentes soluciones amortiguadoras (citrato de sodio, PBS y agua peptonada) para seleccionar la más eficiente (**Figura 8**). La concentración celular cuantificada fue de  $6.802 \text{ Log}^{10}$  UFC/mL cuando se usó la solución de citrato de sodio (C.S.), de  $6.082 \text{ Log}^{10}$  UFC/mL con agua peptona y  $5.891 \text{ Log}^{10}$  UFC/mL con PBS. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la C.S. y el agua peptonada, se seleccionó citrato de sodio para los siguientes estudios ya que empleando esta solución se obtiene casi un ciclo logarítmico mas de cuenta viable.

La mayor liberación observada con el C.S. podría deberse a que las cápsulas producidas por gelificación iónica con calcio son sensibles a agentes

quelantes como el citrato. Éste secuestra los iones calcio de enlace, con la consecuente desestabilización del gel (Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990).



**Figura 8.** Ensayo comparativo de la liberación de L.r14171 microencapsulado empleando diferentes soluciones amortiguadoras: citrato de sodio (C.S.), solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) y agua peptonada (Peptona).

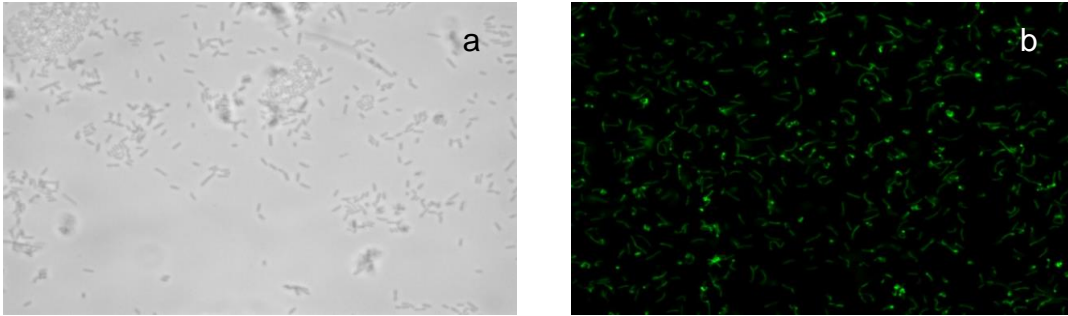
Los datos presentados en el **Cuadro 4** representan la eficiencia de microencapsulación solo para L.r14171 y B1-R0175, ya que las otras cepas perdieron su viabilidad durante el proceso de microencapsulación.

**Cuadro 4. Eficiencia de encapsulación**

Bacteria	Contenido de material activo, m.a. (%)	Eficiencia de encapsulación, EE (%)
L.r14171	34.22	73.61
B1-R0175	36.04	36.02
L.ferm 2	34.67	0
Lp-B4496	34.02	0
Lr-B442	34.13	0
L.rha	34.33	0

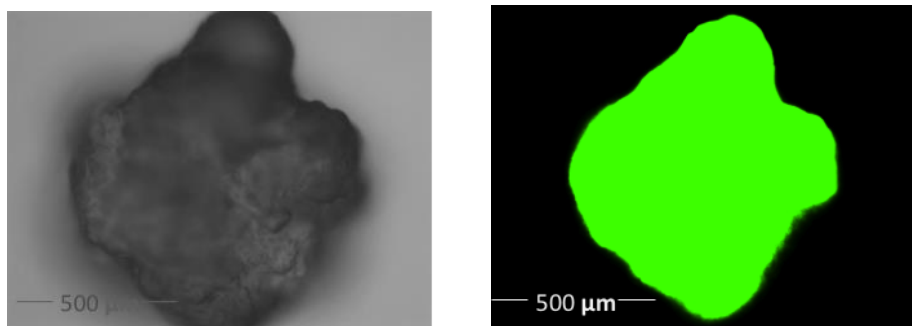
Por otra parte, en la **Figura 9** se muestran las bacterias sin marcar y marcadas con el colorante fluorogénico. Este tipo de marcaje no afecta la viabilidad de las bacterias (Logan et al., 1998), y aunque no se determinó la

duración de la fluorescencia del CFDA-SE para esta cepa, las bacterias permanecieron teñidas durante todo el experimento. Lo cual indicó que el cultivo fue marcado eficientemente sin el requerimiento de un pretratamiento.



**Figura 9.** Micrografías representativas de L.r14171 sin marcar (a) y marcadas con CFDA-SE (b). Todas las imágenes fueron tomadas con objetivo de inmersión (100 X)

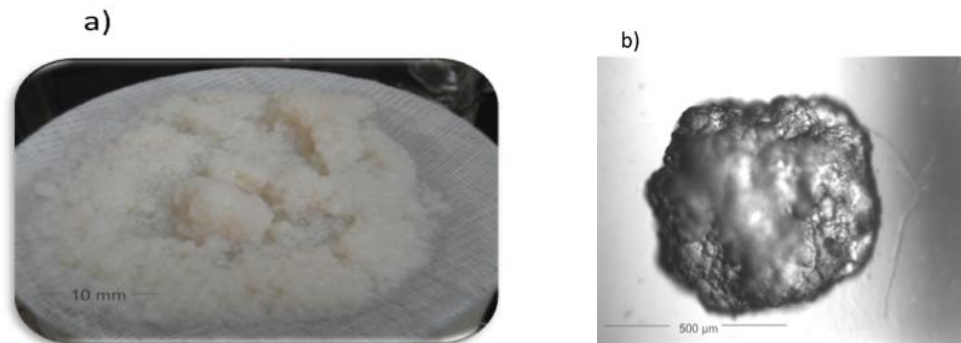
Las micrografías tomadas con el microscopio de fluorescencia mostraron de forma visual la incorporación de las bacterias en la microcápsulas de alginato (**Figura 10**). La presencia de la bacteria fue claramente distinguible por la fluorescencia emitida. La intensidad de fluorescencia en la microcápsula fue mayor a lo esperado. Sin embargo, demuestra la uniformidad de la distribución de la bacteria en la microcápsula.



**Figura 10.** Micrografías representativas de microencápsulas cargadas con L.r14171 sin marcar (a) y marcadas (b).

### 6.3.2 Propiedades micro-geométricas de las cápsulas

Macroscópicamente las cápsulas recién preparadas exhibieron formas redondeadas bien definidas (Figura 11a). Por otra parte, la caracterización microscópica permitió determinar que las microcápsulas presentaron forma esférica irregular con superficie rugosa, porosa y con cráteres (Figura 11b).



**Figura 11.** Micrografías representativas de las características macro (a) y microscópicas (b) de las microcápsulas de alginato conteniendo L.r14171.

De acuerdo a la literatura, la gelificación iónica permite obtener tamaños de microcápsulas en un rango de 1000-5000  $\mu\text{m}$ . Con el protocolo de microencapsulación utilizado en este trabajo se obtuvieron partículas con un diámetro promedio de  $0.108 \pm 0.06$  cm. Por otra parte, el análisis de las imágenes permitió determinar los valores promedio de los parámetros morfo-métricos área, volumen, siendo estos de  $0.0091$   $\text{cm}^2$  y  $0.65 \times 10^{-3}$   $\text{cm}^3$ , respectivamente.

Aunque de forma general predominó la forma esférica, también se pudieron apreciar microcápsulas con forma ovalada, especialmente en las microcápsulas de mayor tamaño. El tamaño medio de las microcápsulas es un factor importante para su estabilidad y su capacidad para proteger a la bacteria probiótica. Las microcápsulas de mayor tamaño presentan una menor capacidad para dispersar el contenido, mientras que las más pequeñas contienen menor cantidad de probiótico (Annan *et al.*, 2008; Rosas-Ledesma *et al.*, 2011). Por lo tanto es necesario llegar a un tamaño de partículas óptimo que permita tanto una buena protección como una correcta distribución del probiótico.

El tamaño de las microcápsulas es un factor importante en cuanto a sobrevivencia de probióticos; por ejemplo, en un estudio donde se evaluó la viabilidad de *Lactobacillus bulgaricus* en cápsulas de Alg-Ca que tenían un intervalo de tamaño entre 30 a 102  $\mu\text{m}$ , concluyeron que un diámetro de 30  $\mu\text{m}$  era deseable, porque cápsulas más grandes causan la aspereza de textura en el producto que los contiene, pero también señalan que las cápsulas pequeñas no proporcionaron la protección suficiente para las bacterias (Adhikari *et al.*, 2000)

Por otro lado se pudo observar que el componente que le dió mayor resistencia a la cápsula fue el alginato, a mayor concentración mejor viabilidad, semejante a lo obtenido en este trabajo. En otra propuesta para mejorar la encapsulación con alginato, Sultana (2000) sugiere, para encapsular bifidobacterias utilizar 2% almidón y 2% de alginato, el almidón ayuda a mejorar la viabilidad de las células, debido a que el alginato y el almidón tienden a ser sinérgicos y como resultado se obtiene una mejor protección y sugieren que es necesario evaluar con diferentes concentraciones de alginato y tamaños de cápsulas para ver la efectividad de las mismas.

#### **6.3.4 Efecto de la humedad relativa sobre algunas propiedades microgeométricas de las microcápsulas y viabilidad bacteriana**

De forma general, todos los parámetros geométricos (área, volumen, diámetro) se redujeron conforme disminuyó la  $a_w$  y transcurrió el tiempo de almacenamiento (**Cuadro 5**). La estructura original de las microcápsulas se perdió mas rápidamente a una  $a_w$  de 0.3574, esto posiblemente debido a la baja humedad relativa de la atmósfera que produjo una extensiva fusión de las microcápsulas. A una  $a_w$  por arriba de 0.515 el agua actúa como un plastificante de la matriz de la pared de carbohidratos conduciendo a un flujo viscoso y un eventual colapso de la estructura (Chuy y Labuza, 1994). Las moléculas de agua se ligan a sitios hidrofílicos específicos cuando los valores de  $a_w$  son bajos, pero a valores de  $a_w$  más altos la adsorción de agua es acompañada por hinchamiento y cambios conformacionales en la estructura molecular (Bertuzzi *et al.*, 2003).

























**Cuadro 5.** Cambios en los parámetros geométricos de las microcápsulas influenciados por diferentes valores de  $a_w$  a una temperatura de 30 °C.

Día	Diámetro (cm)			
	0.9808 $a_w$	0.7549 $a_w$	0.5711 $a_w$	0.3574 $a_w$
1	0.0779±3.1x10 <sup>-5</sup>	0.0794±6x10 <sup>-6</sup>	0.0766±2.8x10 <sup>-5</sup>	0.0775±3.9x10 <sup>-5</sup>
3	0.0561±2x10 <sup>-5</sup>	0.0558±3x10 <sup>-5</sup>	0.0546±2.9x10 <sup>-5</sup>	0.0463±3.4x10 <sup>-5</sup>
6	0.0458±3.5x10 <sup>-5</sup>	0.0352±1.1x10 <sup>-5</sup>	0.0261±2.3x10 <sup>-5</sup>	0.0054±6x10 <sup>-6</sup>
9	0.0358±2.9x10 <sup>-5</sup>	0.0107±1.5x10 <sup>-5</sup>	0.0051±5x10 <sup>-6</sup>	0.0043±2x10 <sup>-6</sup>
12	0.0249±4.5x10 <sup>-5</sup>	0.0072±1.1x10 <sup>-5</sup>	0.0043±5x10 <sup>-6</sup>	0.0034±4x10 <sup>-6</sup>
15	0.0063±1.3x10 <sup>-5</sup>	0.0035±6x10 <sup>-6</sup>	0.0025±6x10 <sup>-6</sup>	0.0021±4x10 <sup>-6</sup>
Día	Radio (cm)			
	0.9808 $a_w$	0.7549 $a_w$	0.5711 $a_w$	0.3574 $a_w$
1	0.0389±1.5x10 <sup>-5</sup>	0.0396±3x10 <sup>-6</sup>	0.0383±1.4x10 <sup>-5</sup>	0.0388±2x10 <sup>-5</sup>
3	0.0281±1x10 <sup>-5</sup>	0.0279±1.5x10 <sup>-5</sup>	0.0273±1.5x10 <sup>-5</sup>	0.0231±1.7x10 <sup>-5</sup>
6	0.0229±1.7x10 <sup>-5</sup>	0.0176±5x10 <sup>-6</sup>	0.0131±1.1x10 <sup>-5</sup>	0.0027±3x10 <sup>-6</sup>
9	0.0179±1.4x10 <sup>-5</sup>	0.0054±8x10 <sup>-6</sup>	0.0026±2x10 <sup>-6</sup>	0.0021±1x10 <sup>-6</sup>
12	0.0125±2.1x10 <sup>-5</sup>	0.0036±5x10 <sup>-6</sup>	0.0021±3x10 <sup>-6</sup>	0.0017±2x10 <sup>-6</sup>
15	0.0031±7x10 <sup>-6</sup>	0.0017±3x10 <sup>-6</sup>	0.0013±3x10 <sup>-6</sup>	0.0011±2x10 <sup>-6</sup>
Día	Área (cm <sup>2</sup> )			
	0.9808 $a_w$	0.7549 $a_w$	0.5711 $a_w$	0.3574 $a_w$
1	0.0047±2.34x10 <sup>-8</sup>	0.0049±7.84x10 <sup>-10</sup>	0.00461±1.82x10 <sup>-8</sup>	0.00472±3.64x10 <sup>-8</sup>
3	0.00247±4.9x10 <sup>-9</sup>	0.00244±1.06x10 <sup>-8</sup>	0.00234±9.8x10 <sup>-9</sup>	0.00168±9.6x10 <sup>-9</sup>
6	0.00165±1x10 <sup>-8</sup>	0.00097±5.76x10 <sup>-10</sup>	0.00054±1.22x10 <sup>-9</sup>	0.00002±4x10 <sup>-12</sup>
9	0.00101±4.09x10 <sup>-9</sup>	0.00009±1.21x10 <sup>-10</sup>	0.00002±4x10 <sup>-12</sup>	0.00001±1x10 <sup>-12</sup>
12	0.00049±4.35x10 <sup>-9</sup>	0.00004±2.5x10 <sup>-11</sup>	0.00001±1x10 <sup>-12</sup>	0.00001±1x10 <sup>-12</sup>
15	0.00003±2.5x10 <sup>-11</sup>	0.00001±1x10 <sup>-12</sup>	0.00001±1x10 <sup>-12</sup>	0.000004±1x10 <sup>-12</sup>

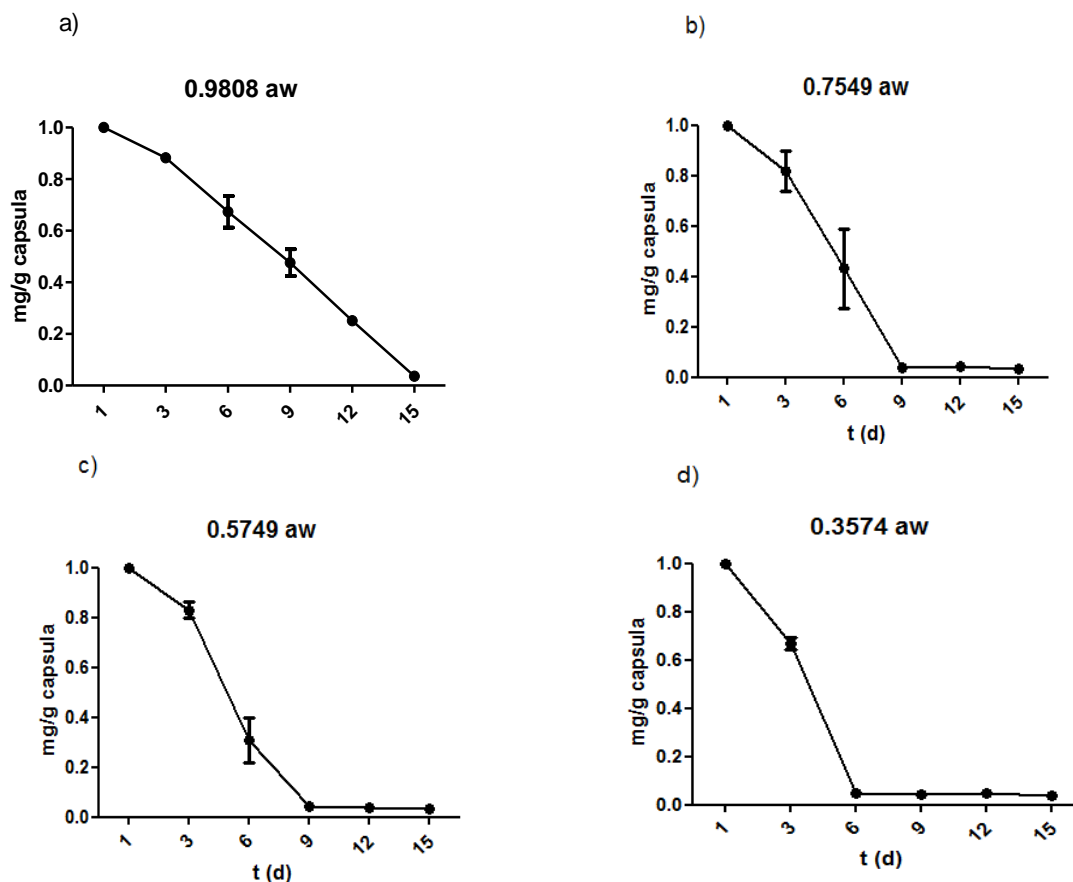
Día	Volumen (cm <sup>3</sup> )			
	0.9808 a <sub>w</sub>	0.7549 a <sub>w</sub>	0.5711 a <sub>w</sub>	0.3574 a <sub>w</sub>
1	0.246x10 <sup>-3</sup> ±2.7x10 <sup>-14</sup>	0.261x10 <sup>-3</sup> ±1.25x10 <sup>-16</sup>	0.235x10 <sup>-3</sup> ±1.75x10 <sup>-14</sup>	0.243x10 <sup>-3</sup> ±5.06x10 <sup>-14</sup>
3	0.092x10 <sup>-3</sup> ±1x10 <sup>-15</sup>	0.090x10 <sup>-3</sup> ±2.77x10 <sup>-15</sup>	0.085x10 <sup>-3</sup> ±2.19x10 <sup>-15</sup>	0.051x10 <sup>-3</sup> ±1.33x10 <sup>-15</sup>
6	0.050x10 <sup>-3</sup> ±1.33x10 <sup>-15</sup>	0.022x10 <sup>-3</sup> ±8x10 <sup>-18</sup>	0.009x10 <sup>-3</sup> ±8x10 <sup>-18</sup>	0.008x10 <sup>-5</sup> ±5x10 <sup>-15</sup>
9	0.024x10 <sup>-3</sup> ±2.16x10 <sup>-16</sup>	0.006x10 <sup>-4</sup> ±8x10 <sup>-15</sup>	0.007x10 <sup>-5</sup> ±3x10 <sup>-16</sup>	0.004x10 <sup>-5</sup> ±6x10 <sup>-16</sup>
12	0.008x10 <sup>-3</sup> ±6.4x10 <sup>-17</sup>	0.001x10 <sup>-4</sup> ±8x10 <sup>-16</sup>	0.004x10 <sup>-5</sup> ±5x10 <sup>-16</sup>	0.002x10 <sup>-5</sup> ±2x10 <sup>-18</sup>
15	0.001x10 <sup>-4</sup> ±4.3x10 <sup>-18</sup>	0.002x10 <sup>-5</sup> ±4x10 <sup>-18</sup>	0.008x10 <sup>-6</sup> ±6x10 <sup>-18</sup>	0.005x10 <sup>-6</sup> ±3x10 <sup>-18</sup>

Por otra parte, los cambios morfológicos fueron notablemente significativos durante los 15 días de almacenamiento a las diferentes humedades relativas evaluadas (**Cuadro 6**). En forma global, a mayor a<sub>w</sub> los cambios morfológicos fueron más lentos que a una menor a<sub>w</sub>.

**Cuadro 6.** Cambios morfológicos de las microcápsulas sometidas a diferentes valores de a<sub>w</sub>, a 30<sup>o</sup>C durante 15 d.

Día	0.9808 aw	0.7549 aw	0.5711 aw	0.3574 aw
1				
3				
6				
9				
12				
15				

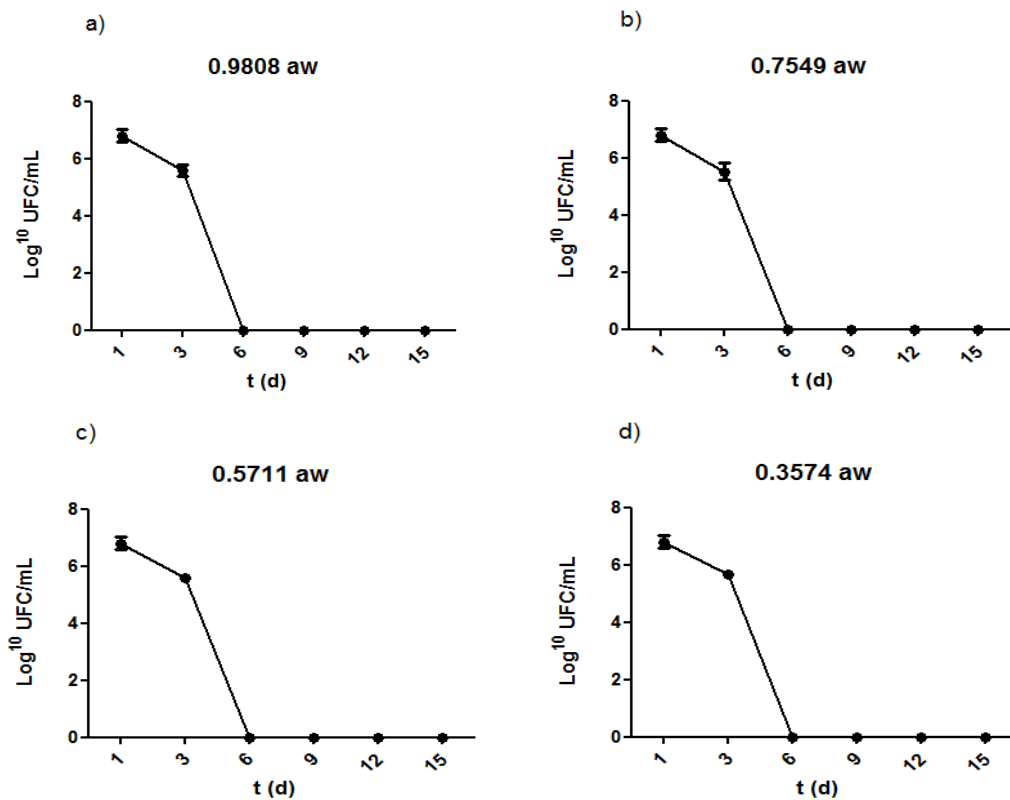
Estos resultados indican una relativa hidratación de la microcápsula, lo que permite mantener por más tiempo su forma esférica. Esto como resultado de la naturaleza hidrofílica del recubrimiento de alginato de calcio. La humedad del aire es retenida por la microcápsula a través de la condensación capilar (Visser, 1995), lo que contribuye a una pérdida de peso más lenta en valores de  $a_w$  cercanos a 1 (**Figura 12**). En el caso de valores de  $a_w$  de 0.7549 y 0.5749 la máxima pérdida de peso se observó a los 9 días, después de este tiempo, las pérdida de peso fue mínima y permaneció constante. Para el caso de valores de  $a_w$  de 0.3574, la máxima pérdida de peso se observó a los 6 días, mientras que a una  $a_w$  cercana a 1 la pérdida de peso fue constante y gradual y la máxima pérdida se registró hasta los 15 días.



**Figura 12.** Comportamiento del peso de las microcápsulas almacenadas 15 d a 30 °C y a diferentes valores de  $a_w$ : a) 0.9808, b) 0.7549, c) 0.5711, d) 0.3574



Por otra parte, desde el tercer día se observó una reducción significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la viabilidad de la cepa probiótica en las diferentes concentraciones de  $a_w$  evaluadas. Además, en todos los casos se registró pérdida total de la viabilidad a partir de los 6 días (**Figura 13**). La pérdida de la viabilidad bacteriana puede estar relacionada con el proceso de erosión que sufren las microcápsulas, proceso que está determinado por la biodegradabilidad intrínseca del polímero y las características del medio de disolución en que se encuentran. La erosión trae consigo el cambio constante de la geometría de las microcápsulas y como resultado de ello la liberación, y por ende, muerte de las bacterias (Parra-Huertas, 2010).



**Figura 13.** Comportamiento de la viabilidad de las bacterias probióticas almacenadas 15 d a  $30^{\circ}\text{C}$  y a diferentes valores de  $a_w$ : a) 0.9808, b) 0.7549, c) 0.5711, d) 0.3574

### 6.3.5 Determinación de la hidrofobicidad superficial de las microcápsulas

Las microcápsulas de alginato conteniendo L.r14171 exhibieron elevados porcentajes (61.15 %) de hidrofobicidad. En la **Figura 14** se puede observar como la fase acuosa presenta una ligera turbidez ya que las microcápsulas se adhirieron a la fase orgánica, lo cual fue favorable en la microencapsulación. A pesar de que el alginato de sodio es un poliosacárido hidrofílico, *L. reuteri* exhibe una superficie hidrofóbica (Klantschitsch *et al.*, 1996), lo cual sugiere que la incorporación de la bacteria en la matriz sólida polimérica no afecta su carácter hidrofóbico.

La mayoría de los polisacáridos son hidrofílicos predominantemente y no poseen una actividad superficial alta (McClements, 1999). Sin embargo, el alginato de sodio está dentro de los polisacáridos naturales que tienen porcentaje de carácter hidrofóbico o han sido químicamente modificados introduciendo grupos no-polares. Los grupos hidrofóbicos consisten de una o más cadenas de hidrocarburos, entre 10 y 20 átomos de carbono por cadena. Las cadenas pueden estar saturadas o insaturadas, pueden ser lineales o ramificadas, alifáticas o aromáticas (Hameyer y Jenni, 1996; McClements, 1999).



**Figura 14.** Adhesión de las microcápsulas de alginato conteniendo L.r14171 a la fase hidrofóbica.

### 6.3.6 Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad de las bacterias microencapsuladas y sobre algunas propiedades micro-geométricas de las microcápsulas.

Para caracterizar la integridad y estabilidad de las microcápsulas durante almacenamiento, se utilizan algunos parámetros micro-geométricos como morfología, área, volumen y diámetro, entre otros. Por lo tanto, las microcápsulas cargadas con células se examinaron utilizando un microscopio óptico para evaluar la influencia de diferentes temperaturas de almacenamiento en los parámetros antes mencionados.













Los **cuadros 7 y 8** muestran los cambios micro-geométricos de las cápsulas almacenadas durante 15 días como se puede observar, inicialmente no se registró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en algunos parámetros como área, radio y volumen. Además, en general las microcápsulas mostraron una superficie lisa, con contorno esférico definido y buena integridad. Sin embargo, a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento se registró una reducción de las características geométricas (**Cuadro 7**), y la superficie de las microcápsulas pasó a ser rugosa e irregular y se observó un encogimiento de la estructura (**Cuadro 8**). A menor temperatura de almacenamiento se observaron mejores características morfológicas. Estos resultados son congruentes con los reportados previamente por (Yuan-Gang et al., 2013), quienes evaluaron el efecto de la temperatura de almacenamiento en microcápsulas preparadas con alginato-poli L-ornitina-alginato.

**Cuadro 7.** Cambios en los parámetros geométricos de las microcápsulas almacenadas a dos diferentes temperaturas (4 y 25 °C) durante 15 d.

Día	Diámetro (cm)		Radio(cm)	
	4 <sup>o</sup> C	25 <sup>o</sup> C	4 <sup>o</sup> C	25 <sup>o</sup> C
<b>1</b>	0.1165±9x10 <sup>-5</sup>	0.1081±6x10 <sup>-5</sup>	0.0582±4x10 <sup>-5</sup>	0.0540±3x10 <sup>-5</sup>
<b>3</b>	0.1113±3x10 <sup>-5</sup>	0.0991±7x10 <sup>-5</sup>	0.0557±2x10 <sup>-5</sup>	0.0496±4x10 <sup>-5</sup>
<b>6</b>	0.1046±3x10 <sup>-5</sup>	0.0965±6x10 <sup>-5</sup>	0.0523±2x10 <sup>-5</sup>	0.0482±3x10 <sup>-5</sup>

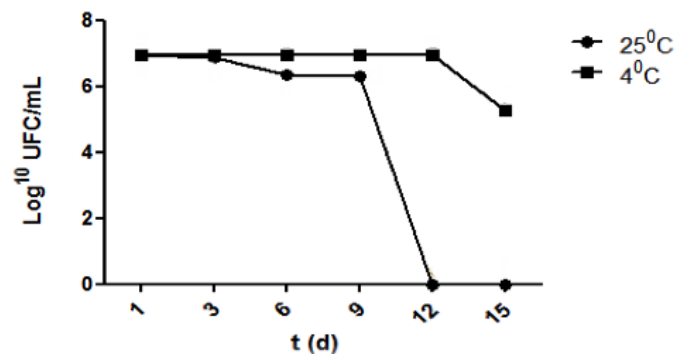
9	$0.1040 \pm 9 \times 10^{-5}$	$0.0792 \pm 4 \times 10^{-5}$	$0.0520 \pm 5 \times 10^{-5}$	$0.0396 \pm 2 \times 10^{-5}$
12	$0.1006 \pm 4 \times 10^{-5}$	$0.0703 \pm 3 \times 10^{-5}$	$0.0503 \pm 2 \times 10^{-5}$	$0.0351 \pm 1 \times 10^{-5}$
15	$0.0931 \pm 1 \times 10^{-4}$	$0.0573 \pm 2 \times 10^{-5}$	$0.0466 \pm 5 \times 10^{-5}$	$0.0286 \pm 1 \times 10^{-5}$
Día	Área(cm <sup>2</sup> )		Volumen(cm <sup>3</sup> )	
	4 <sup>o</sup> C	25 <sup>o</sup> C	4 <sup>o</sup> C	25 <sup>o</sup> C
1	$0.1 \times 10^{-3} \pm 4.1 \times 10^{-4}$	$0.091 \times 10^{-3} \pm 2.6 \times 10^{-4}$	$0.83 \times 10^{-6} \pm 8 \times 10^{-5}$	$0.66 \times 10^{-6} \pm 5 \times 10^{-5}$
3	$0.097 \times 10^{-3} \pm 1.6 \times 10^{-4}$	$0.077 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-4}$	$0.72 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-5}$	$0.51 \times 10^{-6} \pm 5 \times 10^{-5}$
6	$0.085 \times 10^{-3} \pm 1.5 \times 10^{-4}$	$0.073 \times 10^{-3} \pm 2.4 \times 10^{-4}$	$0.60 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-5}$	$0.47 \times 10^{-6} \pm 4 \times 10^{-5}$
9	$0.084 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-4}$	$0.049 \times 10^{-3} \pm 1.3 \times 10^{-4}$	$0.59 \times 10^{-6} \pm 7 \times 10^{-5}$	$0.26 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-5}$
12	$0.079 \times 10^{-3} \pm 1.4 \times 10^{-4}$	$0.038 \times 10^{-3} \pm 9 \times 10^{-5}$	$0.53 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-5}$	$0.18 \times 10^{-6} \pm 1 \times 10^{-5}$
15	$0.068 \times 10^{-3} \pm 4.2 \times 10^{-4}$	$0.025 \times 10^{-3} \pm 6 \times 10^{-5}$	$0.42 \times 10^{-6} \pm 7 \times 10^{-5}$	$0.10 \times 10^{-6} \pm 1 \times 10^{-5}$

**Cuadro 8.** Cambios morfológicos de las microcápsulas almacenadas a dos diferentes temperaturas(4 y 25 °C) durante 15 días.

Día	4°C	25°C
1		
3		
6		
9		
12		
15		

Por otra parte, la viabilidad de las bacterias microcapsuladas con alginato de sodio con quitosano como revestimiento mantenidas a 25 °C y 4 °C se muestra

en la **Figura 15**. Los datos no mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la viabilidad entre ambas temperaturas durante los primeros 9 días de almacenamiento. Después las bacterias almacenadas a 25 °C mostraron una reducción significativa de viabilidad y a los doce días ya no fue posible hacer el recuento de las células viables. De forma contraria, en el caso de la bacteria encapsulada y almacenada a 4 °C solo se registró una reducción de ca. 1 ciclo logarítmico de su cuenta viable después de 15 días de almacenamiento. Otros estudios han demostrado que la supervivencia de bacterias inmovilizadas en alginato puede depender del tamaño de las microcápsulas (Lee y Heo, 2000). De esta manera, considerando que a 4 °C de almacenamiento las cápsulas mantuvieron su tamaño más estable, es razonable pensar que este factor benefició la supervivencia de las bacterias más tiempo a dicha temperatura. Por otra parte, también se ha reportado que a bajas temperaturas, el metabolismo de las bacterias disminuye, lo que minimiza la acumulación de productos tóxicos derivados del metabolismo basal de los microorganismos (Rosas-Ledesma *et al.*, 2011), factor que también explicaría las diferencias en la viabilidad de las bacterias encapsuladas y almacenadas a las diferentes temperaturas.



**Figura 15.** Viabilidad de L.r14171 microencapsulado y almacenado a dos diferentes temperaturas durante 15 días.

## VII Conclusiones

Los resultados de este trabajo de tesis mostraron que la microencapsulación por emulsificación con gelificación interna es una alternativa viable para la microencapsulación de bacterias probióticas.

En particular, *L. reuteri* NRRL 14171 pudo ser encapsulado exitosamente usando alginato de sodio y quitosano como recubrimiento.

Por otra parte, los datos mostraron que las propiedades micro-geométricas de las cápsulas afectan significativamente la viabilidad de las bacterias microencapsuladas. De tal manera que la microencapsulación mejoró la sobrevivencia de las bacterias cuando estas fueron almacenadas a 4 °C. Las condiciones de almacenamiento de las microcápsulas repercutieron en la viabilidad de *Lr.14171*, ya que se registró una reducción de ca. 1 ciclo logarítmico de su cuenta viable después de 15 días de almacenamiento. A pesar de esto, la cuenta viable permaneció cercana a la recomendada para los alimentos probióticos.

Estos resultados sugieren que las microesferas pueden ser una vía de administración de estos microorganismos probióticos a través de productos fermentados refrigerados. Sin embargo aun hacen falta estudios complementarios para evaluar el papel protector de las microcápsulas en condiciones gastrointestinales simuladas.

## VIII REFERENCIAS

1. Adhikari, K., Mustapha, A., Grün I. U., y Fernando, L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *J Dairy Sci.* 83(9):1946-1951.
2. Al-Muhtaseb H.A., W.A.M. McMinn, T.R.A. Magee. 2004. Water sorption isotherms of starch powders Part 1: mathematical description of experimental data. *J Food Eng.* 61 297–307
3. Álvarez-Olmos, M. I., y Oberhelman, R. A. 2001. Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32:1567-1576.
4. Amin, T., Thakur, M., y Jain, S.C. 2013. Microencapsulation – The future of probiotic cultures. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 3(1):35-43.
5. Amores ,R.,Calvo,A.,Maestre,J.R. y Martinez ,D. 2004. Probioticos. *Rev.Vol* 17 (N<sup>o</sup>2):131-139.
6. Anal, A. K., y Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. Technol.* 18(5):240–251.
7. Annan, N. T., Borza, A. D., & Hansen, L. T. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 41(2), 184–193.
8. Araya LH, Lutz RM. 2003. Alimentos Funcionales y Saludables. *Rev. Chil. Nutr.* 30(1): 8-14.
9. Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A., Tsakalidou, E., Nychas, G. J., Panagou, E. Z., y Tassou, C. C. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by invitro tests. *Food Microbiol.* 33:282-291.
10. Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, Y., Dong, X., Wang, Y., Zhang, H. 2010. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control.* 21(5):695-712.

11. Bertuzzi MA, Armada M, Gottifredi JC. 2003. Thermodynamic analysis of water vapour sorption of edible starch based films. *Food Sci. Tech. Int.* 9(2): 115-17. 44(6): 388-393.
12. Bruschi, G. B. y Záchia, A.M.A. 2011. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration and yogurt. *J. Food Eng.* 103:123-128.
13. Champagne, C. P., y Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18(2):184-190.
14. Chan, L. W., Lee, H. Y., y Heng, W. S. 2006. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydr. Polym.* 63(2):176-187.
15. Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., Jones, M., 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *J. Microbiol. Methods*, 56(1) 27-35.
16. Chuy LE, Labuza TP. 1994. Caking and stickiness of dairy-based food powders as related to glass transition. *J. Food Sci.* 59: 43-46.
17. Cotter, P.D., y Hill, C. 2003. Surviving the acid test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(3):429-453.
18. Collins, M.D., Gibson, G.R., 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 69,1042S-1057S.
19. Cueto-Vigil, M.C., Acuña-Monsalve, Y., y Valenzuela-Riaño, J. 2010. Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas asiladas de suero costeño. *Actual Biol.* 32(93):129-138.
20. De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., y Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. Dairy J.* 20(4): 292-302.
21. Draget, K. L., Skjåk-Bræk, G., y Smidsrød, O. 1997. Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules.* 21(1-2):47-55.



22. Ding, W.R., Shah, N.P., 2009. Acid, Bile, and Heat Tolerance of free and microencapsulated Probiotic Bacteria. *J. Food Sci.* 72(9), 443-450.
23. FAO/OMS. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder.
24. FAO/OMS. 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada. 30 de Abril y 1 de Mayo de 2002.
25. FAO/OMS. 2001. Consulta de expertos FAO/OMS sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico. Córdoba, Argentina.
26. FAO/OMS. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ont., Canadá.
27. FAO/OMS. 2003. Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Series 916, Geneva.
28. FAO/WHO Experts Report. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
29. Fedorka-Cray, P.J., Bailey, J.S., Stern, N.J., Cox, N.A., Ladely, S.R., Musgrove, M., 1999. Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. *J. Food Prot.* 62, 1376-1380.
30. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl. Bacteriol.* 66(5):365-378.
31. Funami, Takahiro; Fang, Yapeng; Noda, Sakie; Ishihara, Sayaca; Nakauma, Makoto; Draget Kurt I. Nishinari, Katsuyoshi and Phillips, Glyn O. 2009. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup>binding. *Food Hydrocolloids.* 23(7):1746-1756.
32. Feucht, A., y Kwak, H. S. 2013. Microencapsulation of Lactic Acid Bacteria. *Korean J. Food Sci. An.* 33(2):229-238.

33. Fox S. 1994. Probióticos en la nutrición animal. Mundo Porcino- No 17 Ene-Feb 1994. 28-32p.
34. García-Ceja, A. y López-Malo, A. 2012. Biopolímeros utilizados en la encapsulación. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 6(1): 84-97.
35. Genovese, K.J., Anderson, R.C., Harvey, R.B., Nisbet, D.J., 2000. Competitive exclusion treatment reduces the mortality and faecal shedding associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in nursery-raised neonatal pigs. *Can. J. Vet. Res.* 64, 204-207.
36. Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125:1401-1412.
37. Gibbs, Bernard F.; Kermasha, Selim; Alli, Inteaz and Mulligan, Catherine N. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 50(3):213-224.
38. Gonzalez-Ramos D. 2013. Genome-scale analyses of butanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* reveal an essential role of protein degradation. *Biotechnol Biofuels* 6(1):48
39. Gouin, S. 2006. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Technol.* 15(7-8):330-347.
40. Hameyer P. y Jenni R.K. 1996. Emulsifiers for multiple emulsions. *Cosmetics & Toiletries* 111: 39-48.
41. Havenaar, R., y Huis in't Veld, J.H.J. 1992. Probiotics: A general view. In: *The lactic acid bacteria in health & disease*. B. J. B. Wood (Ed.). Elsevier Applied Science, London. Vol.1. pp.151-170.
42. Heidebach, T., Forst, P. y Kulozik, U. 2009. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19(2), 77–84.
43. Heller, K. J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2) 374s-379s.

44. Hernandez-Mendoza et al. 2009. Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Lactobacillus reuteri* under different growth conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 84:180-185.
45. Hernandez-Mendoza et al. 2009. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. *Food and Chemical Toxicology*. 47(6): 1064-1068.
46. Hölzel, A., Gänzle, M.G., Nicholson, G.J., Hammes, W.P. y Jung, G. 2000. The First Low Molecular Weight Antibiotic from Lactic Acid Bacteria: Reutericyclin, a New Tetramic Acid. *Angew. Chem. Int.* 39(15): 2766-2768.
47. Holzapfel, W.H., Geisen, R. y Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 343-362.
48. Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut* 50 (3):iii54-iii59.
49. JunZhan Wang , JianJun Qu , WeiMin Zhang. 2012. Glacier extraction based on ASAR, DEM and texture feature of ASAR using SVM in the Western Qilian Mountains, Northwest China. *Sciences in Cold and Arid Regions* : 0195–0200.
50. Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3(2), 39–48.
51. Kasra-Kermanshahi, R., Fooladi, J., y Peymanfar, S. 2010. Isolation and microencapsulation of *Lactobacillus* spp. from corn silage for probiotic application. *Iran. J. Microbiol.* 2(2):98-102.
52. Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, I. S., Cha, D. S., y Park, H. J. 2008. Effect of micro encapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT – Food Sci. Technol.* 41(3):493-500.
53. Klantschitsch, T., Spillmann, H., y Puhan, Z. 1996. *Lactobacillus reuteri*: A Newcomer in Dairy Technology. *Mljekarstvo* 46 (3) 183-196.

54. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., y Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. I. Dairy J. 13(1):3-13.
55. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., y Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. I. Dairy J. 14:737-743.
56. Lastras, P. 2009. Probióticos, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, Suplementos nutricionales, Salud BIO, 12 p.
57. Lázaro C. 2005. Efecto de probióticos en el alimento de marranas sobre los parámetros productivos de lechones. Rev. investig. vet. Perú, 16(2), pp.97-102.
58. Lee, J. S., Cha, D. S., y Park, H. J. 2004. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. J. Agri. Food Chem. 72:7300-7305.
59. Lee, K-Y., y Heo, T-R. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. Appl. Environ. Microbiol. 66:869-873.
60. Lee, Y. K., Ho, P. S., Low, C. S., Arvilommi, H., y Salminen, S. 2003. Permanent colonization by *Lactobacillus casei* is hindered by the low rate of cell division in mouse gut. Appl. Environ. Microbiol. 70(2):670-674.
61. Lilly, D. M., y Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. Sci. 147:747-748.
62. Lin, J., Yu, W., Liu, X., Xie, H., Wang W., y Ma, X., 2008. *In vitro* and *in vivo* characterization of alginate-chitosan-alginate artificial microcapsules for therapeutic oral delivery of live bacterial cells. J. Biosci. Bioeng. 105(6):660-665.
63. Logan, R. P., A. Robins, G. A. Turner, A. Cockayne, S. P. Borriello, and C. J. Hawkey. 1998. A novel flow cytometric assay for quantitating adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. J. Immunol. Methods 213:19-30
64. Lopretti, M.; Barreiro, F.; Fernandes, I.; Damboriarena, A.; Ottati C. y Olivera A. 2007. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica.

- INNOTEC (Publicación anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay). 2:19-23.
65. Maragkoudakis, A., Zoumpopoulou, G., Miarisa, C., Kalantzopoulou, G., Potb, B., y Tsakalidou, F. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* 16(3): 189-199.
  66. Martín-Villena, M. J., Morales-Hernández, M. E., Gallardo-Lara, V. y Ruiz-Martínez, M. A. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharm.* 50(1):43-50.
  67. Marteau Pr, de vrese M, Celler CJ, Scherezenmeir J. 2001. protection from gastrointestinal diseases with the uses of probiotics .*Am J Clin Nutr*;73:430S-436S
  68. McClements D.J. 1999. *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques.* CRC Press. Boca Raton, FL., EUA.
  69. Metchnikoff, E. 1907. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: Optimistic studies.* W. Heinemann, London: 161-183.
  70. Mortazavian, A., Ravazi, S. H., Ehsani, M. R., y Sohrabvandi, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian J Biotechnol.* 5(1):1–18.
  71. Morelli, L. 2007. *In vitro* assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *Int Dairy J.* 17(11):1278–1283
  72. Nava, J. 2008. Evaluación de Bacterias Ácido Lácticas Comercializadas como Probióticas. Universidad de los Andes. Departamento de Biología. Merida Colombia. 15-16p.
  73. Ng, S.C., Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J., Knight, S.C. 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases* 15:300–310.
  74. Pardio VT, Krzysatof N, Waliszewski KN, Robledo G. 2000. Los probióticos y su futuro. *Arch Latinoam Nutr* ;46(1):6-10.
  75. Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health.* 29:4–8.

76. Parra-Huerta, R. A. 2010. Revisión: Microencapsulación de alimentos. Rev. Facultad Nacional Agron Medellín. 63(2): 5669-5684.
77. Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M. A., Tortoló-Cabañas, K., Gastón-Peña, C. 2013. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 47(1): 14-25.
78. Picot, D., y Poncelet, D. 2011. Selection of coating materials for stabilization of probiotic micro-organisms. Bioencapsulation Innovations. March/April: 9-32.
79. Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J. P., Neufeld, R. J., y Fournier, A. 1992. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. Appl Microbiol Biotechnol. 38:39-45.
80. Reddy, R. K. y Reddy, S. P. 2010. Effect of different co-polymers on sodium alginate microcapsules containing isoniazid. Int. J. PharmTech Res. 2(4):2198-2203.
81. Roman, M., Castillo, J., Picciteli, V., China, K., Arribas, G., y China, C. 2008. Caracterización morfológica de sistemas poliméricos biodegradables utilizando técnicas de UV y fluorescencia láser confocal. Rev. Iberoam. Polím. 9(6): 526-537.
82. Rosas-Ledesma P., J.M. León-Rubio, F. J. Alarcón, M. A. Moriñigo y M. C. Balebona. 2011. Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: assessment of optimal conditions for encapsulation. Aquaculture Res., 2011, 1-11.
83. Rousseaux, C., Thuru, X., Gelot, A., Barnich, N., Neut, C., Dubuquoy, L., Dubuquoy, C., Merour, E., Geboes, K., Chamillard, M., Ouwehand, A., Leyer, G., Carcano, D., Colombel, J.F., Ardid, D., y Desreumaux P. 2007. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. Nat. Med. 13:35–37.
84. Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y. y Gorbach, S.L. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. p. 211-253. En: Lactic acid bacteria:

- Microbiology and functional aspects, 2nd ed., (Ed. Salminen, S., Wright, A.V.), Marcel Dekker, Inc., New York.
85. Sanz, Y., Collado, M. C., y Dalmau, J. 2006. Contribución de la microbiota y del género “Bifidobacterium” a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. *Acta Pediatr Esp.* 64: 74-78.
  86. Shah, N. P. 2007. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J.* 17(11):1262-1277
  87. Sheu, T. Y., & Marshall, R. T. 1993. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *J. Food Sci.*, 54, 557–561.
  88. Sohail, A., Turner, M.S., Coombes, A., Bostrom, T. y Bhandari, B. 2011. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols methods. *Int. J. Food Microbiol.* 145:162-168.
  89. Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., y Ma, X. 2013. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydr Polym.* 96(1):181-189.
  90. Smidsrød, O., y Skjåk-Bræk, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 8:71-78.
  91. Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy .2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* 62:47-55.
  92. Talwalkar, A.I. y Kailasapathy, K.A., 2004. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.*, 58:36-39.
  93. Tissier, H. 1906. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *C. R. Soc. Biol.* 60:359-361.
  94. Vallejo, M., Marguet, R. Etchechoury E.. 2008. Potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos patagónicos. *Rev. Salud Púb Nutr.*
  95. Van Loo, J., Coussement, P., DeLeenheer, L., Hoebregs, H. y Smits, G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35:525-552.

96. Vasiljevic, T. y Sha, N.P. 2008. Probiotics From Metchikoff bioactives. Rev. International Dairy Journal. 18: 714– 728
97. Visser, J. 1995. Particle adhesion and removal: A review. Particulate Sci. Technol. 13(3-4):169-196.
98. Yuan-Gang, L., Yan, B., Shi-Bin, W., Ai-Zheng, C., y Wen-Guo, W. 2013. Effect of the storage temperatures on BRL-encapsulated-alginate-PLO-alginate (APornA) microcapsules. J. Biomin Biomater Tissue Eng. 18(2): <http://dx.doi.org/10.4172/1662-100X.1000110>
99. Yun, J.S., Wee, Y.J. y Ryu, H.W. 2003. Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enz. Microbial Technol.* 33: 416-423.