



SEP

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

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

**TRABAJO PROFESIONAL
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

RUBI CRUZ RAMOS

CON EL TEMA:

**“ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS
MICROENCAPSULADAS BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES
SIMULADAS EN UN SISTEMA DINÁMICO”**

MEDIANTE:

**OPCIÓN 1
(TESIS PROFESIONAL)**

**ASESOR INTERNO: Dra. PATRICIA GUADALUPE SANCHEZ 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 09 de julio del 2014

OFICIO NUM. DEP-CT-201-2014

C. RUBÍ CRUZ RAMOS

PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
PRESENTE.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. DRA. PATRICIA GUADALUPE SANCHEZ ITURBE, ING. JAQUELINE LEYRA HERNÁNDEZ e ING. JAVIER RAMÍREZ 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:

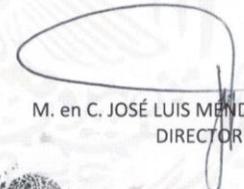
"ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS EN CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS EN UN SISTEMA DINÁMICO."

Registrado mediante la opción:
I (TESIS PROFESIONAL)

ATENTAMENTE
"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"


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

Vo. Bo.


M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO
DIRECTOR

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares
C.c.p.- Expediente
I/JLMN/I/JJAQ/I/eam


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



AGRADECIMIENTOS

A dios principalmente por darme la oportunidad de culminar mis estudios y guiado para salir adelante y enfrentar los retos que se han impuesto en este transcurso de mi vida.

A mis padres que me brindan su amor y siempre me han dado su apoyo incondicional y me han enseñado el verdadero valor que tienen las cosas cuando las realizas con responsabilidad y pasión.

Al Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG) donde adquirí los conocimientos necesarios para mi formación como profesionista y ser humano.

A mis profesores del ITTG quienes formaron parte fundamental en mi formación como profesionista ya que me compartieron de sus conocimientos y experiencias.

A mis compañeros y amigos de la carrera de Ingeniería bioquímica generación 2008, por formar parte de esta etapa tan bonita de mi vida, quienes me brindaron su apoyo incondicional durante el transcurso de la carrera y les debo parte de mi formación como profesionista y ser humano.

A mis amigas Aurora Ocampo, Eva, Karla Avendaño y Yareny Gonzalez por estar conmigo en los momentos más difíciles y por todas las experiencias vividas durante el transcurso de la carrera.

Al centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), Hermosillo, Sonora. Por brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis, y el apoyo económico.

Al Dr. Adrián Hernández Mendoza por bríndame la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y ser director de estas tesis, además de compartirme de sus conocimientos y guiarme durante el transcurso de este proyecto, quien admiro como doctor y ser humano.

A Dr. Aarón González y la Dra. Belinda Vallejo por brindarme el apoyo necesario durante mi estancia en CIAD y facilitarme lo necesario para desarrollar mi trabajo de tesis. Quienes admiro por su gran esfuerzo que hacen por impulsarnos a los jóvenes para seguir la línea de la investigación.

A mis compañeros Marisol luna, Yair Paco, Rocío Hernández, Olga Valdez, Lilia Beltrán, Samantha Loaiza, Francisco, Roger, Alejandro, Ángel, Ángeles de la Rosa, Eleazar, Priscilia Heredia, Jesús Sosa, Martin Moreno, Lourdes Santiago, NantlySarai, Jesús Monzón, Paul, Lucio, Fausto, Trinidad e Isidro, del “Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal”, por apoyarme en todo momento en

cuanto en el manejo de los equipos del laboratorio como en aclararme dudas que me surgieron durante la realización de mi tesis y sobre todo por su amistad y compañía.

A Eliza Padilla, Viridiana Vega por brindarme su amistad y apoyo dentro y fuera de CIAD.

A la M.C. Carmen Estrada por su ayuda y disponibilidad para asesorarme en todo momento para la realización de esta tesis y compartirme de sus conocimientos y brindarme su amistad.

A Ricardo Reyes por su apoyo técnico, asesoría en análisis estadístico de esta tesis, y su apoyo brindado en todo momento para la realización de esta tesis, gracias por compartirme de tus conocimientos y brindarme tu amistad.

A Ariatne Monzerrat de Paz Ramos mi mejor amiga y compañera de aventuras a quien quiero y aprecio mucho, juntas buscamos nuevas oportunidades y experiencias, gracias por su ayuda y colaboración en esta tesis además de compartir juntas el hogar durante varios meses.

A Lucio Benítez compañero de CIAD y amigo, gracias por brindarme tu amistad y tu apoyo durante el tiempo que compartimos el hogar.

A Sandra compañera de CIAD y amiga, gracias por compartir el hogar y tu compañía en los días más difíciles durante mi estancia en Hermosillo.

A Nantly Sarahí por ser mi amiga, compartir el hogar y momentos muy importantes dentro y fuera de CIAD.

Gracias !!!!!!!



Hermosillo, Son., 12 de mayo 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. **Rubí Cruz Ramos**, alumna de la carrera de Ingeniería Bioquímica del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, con número de control 08270005, realizó el trabajo de tesis experimental de licenciatura intitulado **“Estudio de la supervivencia de bacterias probióticas microencapsuladas bajo condiciones gastrointestinales simuladas en un sistema dinámico”**.

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 del 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

Palabras del autor:

La vida está llena de muchas experiencias tanto buenas como malas que uno tiene que enfrentar y aprender de ellas. Siempre existen obstáculos pero enfrentándoles siempre se logra su cometido. Sin duda alguna mi estancia en Hermosillo me ha dejado una hermosa experiencia tanto en mi carrera académica como mi vida personal.

Con esta tesis culmino una de las etapas más bonitas de mi vida universitaria, dejándome una gran satisfacción y hoy en día puedo decir que tome el camino adecuado y cada vez me enamoro más de mi carrera, no fue fácil culminar esta etapa de mi vida se presentaron muchos inconvenientes pero nada que no se pudiera superar con esfuerzo y dedicación.

Dedicatoria:

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi Madre Hortensia Ramos

A quien le debo la vida le agradezco el haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, por los ejemplos de perseverancia y constancia y sobre todo por el inmenso amor que me da cada día. “Te amo”.

A mi Padre Nelson Cruz

Por haberme educado y soportar mis errores. Gracias a los consejos, por el amor que siempre me has brindado, por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad. Le agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me brindó para culminar mi carrera profesional, “Te amo.”

A mi Hermana Gemma Cruz

Por ser el ejemplo de una hermana mayor y de la cual aprendí aciertos y de momentos difíciles. Siempre he contado con ella para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el amor que me da siempre.

A mi Cuñado José Ricardo Zacarías

Por darme su apoyo incondicional durante muchos años y estar en los momentos más difíciles e importantes de mi vida.

A mis sobrinos Zacarías Cruz

Mis pequeños amores Ámbar, Alexia, Katia, Leonardo, Naomí y Ángel, el esfuerzo que le he puesto a esta tesis es por el gran amor que les tengo y quiero que en un futuro esta experiencia de vida sea un ejemplo para ellos.

A mi prima Paola López

Que a pesar que es menor que yo siempre he contado con su apoyo y la considero como mi hermana menor.

A mis Abuelos

A Victoria Sánchez † y Ponciano Ramos † que me dieron durante muchos años amor, me enseñaron humildad y a valorar la cosas que dios me ha puesto en mi camino. Y en mí siempre están presente “Los Amo”.

A María Esperanza Díaz † y Alejandro Cruz quienes a pesar de la distancia aprendí buenos valores de ellos y les agradezco su apoyo.

A mis Familiares

Gracias a mis tíos Martina Ramos, Adolfo Ramos y José Vázquez que directamente me impulsaron para llegar hasta este lugar, a todos mis familiares que me resulta muy difícil poder nombrarlos en tan poco espacio, sin embargo ustedes saben quiénes son.

A mi mejor amiga Monzerrat De paz Ramos

Por ser mi amiga incondicional, compañera de aventuras, con tu apoyo emocional y tu colaboración logre satisfactoriamente terminar la tesis, te quiero mucho y este logro lo comparto contigo.

A mis Amigos

A Jesús Antonio López quien ha sido mi amigo durante muchos años y me ha brindado su apoyo incondicional, gracias por motivarme con tus palabras de aliento y estar en los momentos más complicados de mi vida. “Te quiero mucho amigo”.

A Mariela Sánchez, Yadira Cruz, Betzaida González que han estado en todos los momentos importantes de mi vida y con su apoyo siempre las cosas resultaron no fáciles pero tampoco imposibles.

ÍNDICE

Contenido	Página
ÍNDICE	I
LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE GRAFICAS	IV
RESUMEN	VI
SUMMARY	VIII
I. INTRODUCCION	10
II. REVISIÓN BIBLOGRAFICA	13
2.1 Bacterias Ácido Lácticas	13
2.2 Probióticos	14
2.2.1 Mecanismos de acción.....	17
2.2.2 Benéficos para la salud.....	19
2.3 Condiciones gastrointestinales y sobrevivencia de probióticos	21
2.3.1 Función del sistema digestivo.....	21
2.3.1.1 Uso de sistemas gastrointestinales simulados como herramienta para evaluar la viabilidad de probióticos.....	23
2.4 Microencapsulación de microorganismos probióticos	24
2.4.1 Sobrevivencia de los probióticos microencapsulados bajo condiciones gastrointestinales.....	25
2.4.2 Microencapsulación por el método de emulsión/gelificación interna.....	27
2.4.3 Alginato como material encapsulante.....	28
2.4.4 Quitosano como material de revestimiento en las microcápsulas.....	29
III. JUSTIFICACIÓN	31

IV. OBJETIVOS	32
4.1 General.....	32
4.2 Específicos.....	32
V. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1 Cultivos bacterianos y condiciones de propagación.....	33
5.2 Evaluación de la capacidad de crecimiento de las bacterias probióticas libres a diferentes valores de pH.....	34
5.3 Evaluación de la capacidad de resistencia de las bacterias probióticas libres a diferentes valores de pH.....	34
5.4 Microencapsulación de las bacterias probióticas por el método de emulsión/gelificación interna.....	36
5.4.1 Preparación del cultivo.....	36
5.4.2 Preparación del sistema de matrices poliméricas por el método de emulsión.....	36
5.4.2.1 Preparación del alginato de sodio, de la mezcla alginato-bacteria y del quitosano.....	36
5.4.2.2 Preparación de la emulsión y bacterias microencapsuladas.....	36
5.4.2.3 Recubrimiento con quitosano.....	38
5.5 Recuento de bacterias microencapsuladas.....	38
5.6 Evaluación de la sobrevivencia de bacterias probióticas libres y microencápsuladas durante un proceso gastrointestinal dinámico simulado.....	39
VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
7.1 Evaluación de la capacidad de crecimientos y de resistencia de las bacterias probióticas libres a diferentes valores de pH.....	43
7.2 Microencapsulación por método de emulsión.....	50
7.3 Sobrevivencia de <i>L. reuteri</i> NRRL 14171 libre y microencápsulada después de su paso por el Tracto Gastrointestinal (TGI) simulado.....	52
VIII. CONCLUSIÓN	56
IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	57

Lista de cuadros

	Título	Página
Cuadro 1	Microorganismos probióticos	17
Cuadro 2	Efectos benéficos en la salud de algunos microorganismos probióticos	19
Cuadro 3	Cultivos probióticos empleados en el estudio	33

Lista de figuras

	Título	Pág.
Figura 1	Comportamiento de los probióticos contra los patógenos	18
Figura 2	Condiciones prevalentes en el proceso gastrointestinal	25
Figura 3	Formación del gel alginato de calcio	28
Figura 4	Diagrama de flujo de la evaluación de crecimiento	35
Figura 5	Diagrama de flujo de la evaluación de la resistencia de los probióticos	35
Figura 6	Preparación de la emulsión	37
Figura 7	Filtración y lavado de las microcápsulas en condiciones asépticas	37
Figura 8	Homogenización de las microcápsulas	38
Figura 9	Diagrama de las condiciones gastrointestinales simuladas empleadas en el sistema dinámico <i>in vitro</i> para bacterias libres	40
Figura 10	Incubación de las BAL libres y Microencapsuladas en el proceso de SGI	41
Figura 11	Diagrama de las condiciones gastrointestinales simuladas empleadas en sistema dinámico <i>in vitro</i> para bacterias microencapsuladas	41
Figura 21	Cambios morfológicos de las microcápsulas antes (a) y después (b) de su paso por el sistema gastrointestinal simulado.	55

Lista de graficas

	Titulo	Pag.
Grafico 1	Evaluación del crecimiento (a, c) y resistencia (b, d), de las cepas Lc-21/1 y Lc-ROO52, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.	43
Grafico 2	Evaluación del crecimiento (a, c, e, g) y resistencia (b, d, f, h), de las cepas L.30, Lc-l9, L. r14171, y Lc.7R1, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.	44
Grafico 3	Evaluación del crecimiento (a, c, e, g) y resistencia (b, d, f, h), de las cepas, B1-RO175, L. rha, L. jhon, y L. pla 442, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.	45
Grafico 4	Evaluación del crecimiento (a, c, e, g) y resistencia (b, d, f, h), de las cepas Lc-L3968, L. ferm2, Bb-2715 y Lc-12A, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.	46
Grafico 5	Evaluación del crecimiento (a c, e, g) y resistencia (b, d, f, h), de las cepas, Lc-CRL431, Lc.B1922, Lc.-shi y L. rha 442, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.	47
Grafico 6	Evaluación del crecimiento (a, c, e, g) y resistencia (b, d, f, h), de las cepas L. 30, La-B4495, L.ac y L. B1-B12, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.	48
Grafico 7	Perdida de viabilidad de las bacterias probióticas durante el proceso de microencapsulación.	51
Grafico 8	Viabilidad de las bacterias libres después de haber sido sometidas al sistema gastrointestinal simulado.	52
Grafico 9	Porcentaje de pérdida que exhibió L.r14171 libre y microencapsulada sometidas a un sistema gastrointestinal simulado.	54

Resumen

La administración de bacterias probióticas en la dieta es un área que se ha expandido en los últimos años ya que estas bacterias han sido asociadas a diversos efectos benéficos en la salud de quienes las consumen. En principio, dichos efectos solo son posibles cuando las bacterias son capaces de implantarse y colonizar el tracto gastrointestinal (TGI) del huésped. Para ello, es necesario que estas bacterias se mantengan viables, fisiológicamente estables y en una concentración suficiente durante la elaboración y almacenamiento del producto, para así soportar su paso a través de las condiciones adversas del TGI. En este respecto, la pérdida de viabilidad de las bacterias obedece a diferentes factores y varía según la cepa. Debido a esto, la formulación de probióticos microencapsulados se ha empleado como una alternativa emergente para reducir la pérdida de viabilidad celular por factores tecnológicos y gastrointestinales. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue implementar un sistema mixto de matrices poliméricas para la microencapsulación de cepas probióticas y evaluar su eficacia para la protección de los cultivos bacterianos bajo condiciones gástricas simuladas en un sistema dinámico. De las veintidós cepas bajo estudio, el 28 % fue incapaz de resistir y/o crecer en los diferentes valores de pH evaluados. Por lo tanto, en función de su sensibilidad, seis cepas (*L. fermentum* NRRB-B1932, *L. rhamnosus* ATCC 13075 y NRRL B-442, *L. reuteri* NRRL 14171, *B. longum* R0175 y *L. plantarum* NRRLB-4496) fueron pre-seleccionadas para ser sometidas a condiciones gástricas simuladas. Los resultados evidenciaron una disminución del 40-45 % (4-4.7 ciclos logarítmicos) de viabilidad al final del proceso digestivo, por lo que dichas cepas fueron microencapsuladas mediante el método de emulsión/gelificación interna. Sin embargo, los resultados demostraron que no es factible microencapsular a todas las bacterias por este método, ya que *L. fermentum*, *L. rhamnosus* y *L. plantarum* mostraron pérdida total de viabilidad durante etapas específicas del proceso, mientras que *L. reuteri* y *B. Longum* mostraron ser más resistentes al proceso con una pérdida de viabilidad de ca. 2 y 6 ciclos logarítmicos, respectivamente. Debido a que *L. reuteri* presentó la menor pérdida de viabilidad durante el proceso de microencapsulación, manteniendo una

concentración celular $\geq 10^6$ UFC/mL, se evaluó la eficacia de las microcápsulas para protegerá este cultivos bacteriano bajo condiciones gástricas simuladas. El porcentaje de pérdida de viabilidad al final del proceso fue de 26.24 %. Estos datos de muestran una protección ejercida por las micro esferas de alginato contra las condiciones estresantes prevalentes en el sistema gastrointestinal simulado, lo que favorecería la capacidad de esta cepa para implantarse y colonizar el tracto gastrointestinal del huésped y ejercer así su efecto probiótico.

SUMMARY

The administration of probiotic bacteria through food is an area that has been expanded in recent years due to these bacteria have been associated to beneficial effects on the health of those who consume them. Such effects are only possible when the bacteria are able to implant and colonize the gastrointestinal tract (GIT) of the host. Hence, is necessary that these bacteria remain viable, stable and in sufficient concentration during product processing and storage in order to resist its passage through the adverse conditions of the GIT. In this respect, the loss of viability of bacteria is due to various factors and varies depending on the strain. Because of this, the formulation of microencapsulated probiotics has been employed as an emerging alternative to reduce the loss of cell viability by technological and gastrointestinal factors. Therefore, the aim of this work was to implement a mixed system of polymeric matrices to microencapsulating probiotic strains and assesses its effectiveness to protect bacteria under simulated gastric conditions using a dynamic system. From twenty two strains under study, 28 % was unable to either resist or grow under the different pH values assessed. Hence, according to the sensitivity shown, six strains (*L. fermentum* NRRB-B1932, *L. rhamnosus* ATCC 13075 and NRRL B-442, *L. reuteri* NRRL 14171, *B. longum* R0175 and *L. plantarum* NRRLB-4496) were pre-selected to be subjected to simulated gastric conditions. The results showed a decrease of 40-45 % (4-4.7 log cycles) of viability at the end of the digestion process. Thus, such strains were microencapsulated by the emulsification/internal gelation method. However, the results showed that it is not feasible to microencapsulating all bacteria by this method, since *L. fermentum*, *L. rhamnosus* and *L. Plantarum* showed a total loss of viability at specific stages of microencapsulation process, whereas *L. reuteri* and *B. longum* were more resistant with a loss of viability of ca. 2 and 6 log cycles, respectively. Because *L. reuteri* showed the highest resistant ($\geq 10^6$ CFU/mL), the efficacy of microcapsule to protect this strain was assessed under simulated gastric conditions. The percentage of loss of viability at the end of the process was 26.24%. These data showed a protective effect by alginate microspheres against stressful conditions

prevalent in the simulated gastrointestinal system, which might enhance the ability of this strain to implant and colonize the gastrointestinal tract of the host and thus exert their probiotic effect.

I. INTRODUCCION

Los probióticos son microorganismos no patógenos que cuando se ingieren en cantidades adecuadas ejercen un efecto positivo en la salud de su anfitrión (FAO/OMS, 2006). Dichos efectos benéficos incluyen resistencia a patógenos, mejora del metabolismo de lactosa, aumento de la respuesta inmune, reducción de los niveles de colesterol y presión arterial, disminución al riesgo de cáncer, entre otros (Anal y Singh, 2007). Para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe de poseer ciertas características tales como no ser patógeno ni tóxico, presentar estabilidad cuando se exponen a la bilis y ácidos gástricos, poseer la capacidad de adherirse y colonizar la mucosa intestinal, entre otras (Shah y Ravula, 2000).

La forma más común de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos (e.g., leches fermentadas, yogurt, helado, quesos) que contienen especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Gonzales *et al.*, 2003). Para que un alimento se considere un vehículo eficiente de probióticos, es necesario que el cultivo de interés permanezca viable en altas concentraciones durante el proceso de elaboración del producto y durante el tiempo de almacenamiento del mismo (Gonzales *et al.*, 2003). En este sentido hay estudios que han demostrado que estos microorganismos pueden perder su viabilidad antes de llegar a su sitio de acción, el tracto intestinal humano, debido a que su estabilidad fisiológica ha sido mermada por los factores físicos-químicos del alimento, o por las condiciones tecnológicas a las que ha sido sometido en el producto durante su elaboración y/o almacenamiento. Adicionalmente, se ha reportado una pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas – en forma cepa dependiente, asociada con su paso a través del sistema digestivo del huésped, lo cual se atribuye, entre otras cosas, a las condiciones agresivas prevalentes (e.g., ácidos y sales biliares) en el tracto gastrointestinal superior (Ding y Shah, 2007; Mortazavian *et al.*, 2007; Chavarri *et al.*, 2010). Así pues, con el fin de garantizar los efectos benéficos en la salud se

recomienda que el número de bacterias viables y activas debe ser de 10^6 - 10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro o gramo (UFC/mL o g) de producto al momento de su consumo (Talwalkar *et al.*, 2004; Songet *et al.*, 2013). De esta forma, las investigaciones se han enfocado hacia el desarrollo de estrategias que permitan mantener la concentración celular mínima necesaria de los probióticos en los productos y durante su paso por el tracto gastrointestinal, sitio donde ejercerán su función (Ramos *et al.*, 2013). Una de las alternativas más empleadas en la actualidad son las técnicas de microencapsulación, las cuales proveen una barrera física que protege a la bacteria a través de un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica (Martin *et al.*, 2009).

Se han reportado diferentes métodos de microencapsulación tales como extrusión, lecho fluidizado y secado por aspersión, polimerización interfacial, coacervación y emulsión, entre otros. La selección del método para encapsular depende de los costos, el tamaño de la cápsula, las propiedades físicas y químicas de los materiales, la aplicación y el mecanismo de liberación deseado (Anal y Singh, 2007). La emulsificación es una técnica química utilizada en la microencapsulación de células probióticas vivas dando una alta tasa de supervivencia de las bacterias. El procedimiento de emulsión permite la producción de microcápsulas de diferentes tamaños específicos dependientes de la variación de la velocidad de agitación y la relación agua/aceite (Burgain *et al.*, 2011).

Por otra parte, el material protector debe reunir ciertas propiedades que dependen de las características químicas del material encapsulado, la aplicación, las condiciones de almacenamiento y del proceso al cual será expuesto. En este sentido existe una gran variedad de materiales encapsulantes, los cuales incluyen almidón, derivados de celulosa, gelatina, mezcla de xantano-gelatina, carrageno, gomas (arábica y guar), quitosano, maltodextrinas, proteínas de suero de leche y alginatos (Chávarri *et al.*, 2010; Jiménez-Pranteda *et al.*, 2012). El alginato es un hidrocoloide con alta capacidad higroscópica, de fácil manipulación e inocuidad. Además, propiedades gelificantes, estabilizantes y espesantes, razón por las

cuales ha sido de gran interés para la industria alimentaria (Gohet *al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de que el alginato ha mostrado ser adecuado para la encapsulación de diferentes microorganismos (*e.g.*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Streptococcus*), el gel presenta matrices porosas y sensibilidad a pH extremos que condicionan tanto la liberación como la protección de las bacterias. Estos inconvenientes pueden ser contrarrestados al modificar la estructura del gel, al emplear sistemas mixtos poliméricos para la formación de matriz con quitosano (Chávarri *et al.*, 2010).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue implementar un sistema mixto de matrices poliméricas para la microencapsulación de cepas probióticas y evaluar su eficacia para la protección de los cultivos bacterianos bajo condiciones gástricas simuladas en un sistema dinámico.

II. REVISIÓN BIBLOGRAFICA

2.1 Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se describen como un grupo de microorganismo Gram-positivos, no esporulados, bacilos y cocos usualmente no móviles, generalmente catalasa-negativos, nutricionalmente fastidiosos, ácido tolerantes, no reductores de nitrato, no pigmentados, tolerantes de temperatura entre 5 y 50 °C, anaerobios obligados y en ocasional excepción son anaerobios aerotolerantes, producen ácido láctico como producto final de la fermentación de carbohidratos. Los géneros que comprenden a las BAL son: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. El género *Bifidobacterium*, frecuentemente considerado como genuina BAL bajo el mismo contexto, no está relacionado filogenéticamente y tiene un modo único para la fermentación de azúcares (Pfeiler y Klaenhammer, 2007).

La característica principal por cual se les designa ácido lácticas es por su capacidad para fermentar los azúcares produciendo ácido láctico como producto principal (Settanni y Moschetti, 2010). Éstas se subdividen generalmente en dos grupos en función de su metabolismo de carbohidratos: El grupo homofermentativo, que lleva acabo la ruta glucolítica para transformar su fuente de carbono a ácido láctico. Y el grupo heterofermentativo, el cual produce cantidades equimolares de lactato, CO₂, etanol o acetato de glucosa en la explotación de la vía fosfocetolasa (Vasilijevic y Shah, 2008).

La denominación de “bacterias ácido lácticas” enfatiza la importancia comercial de su metabolismo; los usos industriales de las BAL incluyen la producción de Dextrán, la producción de ensilado y tal vez su papel más importante es la producción de ácido láctico y su subsecuente aplicación en preservación biológica de alimentos (Cueto-Vigil *et al.*, 2010).

En este sentido, una amplia variedad de alimentos son preservados por fermentación ácido láctico, incluyendo leches fermentadas, aceitunas y vinos, entre otros. Razón por la cual los principales nichos donde se pueden aislar las BAL son plantas y productos lácteos fermentados industriales o artesanales. Por otra parte, las BAL son habitantes endógenos del tracto gastrointestinal humano, y se cree que son uno de los habitantes dominantes del intestino delgado (Shuet *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2012).

Algunas BAL además de mejorar las características sensoriales y la calidad preservativa o nutrimental de los alimentos, contribuyen a mejorar la salud de quienes los consumen. Esto hace que estén involucradas en la elaboración de alimentos funcionales, término aplicado a productos que contienen niveles importantes de componentes biológicamente activos que ofrecen efectos fisiológicos deseables más allá de la nutrición básica (Gonzalez *et al.*, 2013). Estos microorganismos son llamados probióticos y los más comúnmente utilizados y reportados incluyen los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

2.2 Probióticos

El término probiótico es una palabra de origen Griego que significa “por la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos benéficos para los seres humanos y los animales. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se le atribuye a Élie Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles" (FAO/OMS, 2006). Metchnikoff destacó la longevidad y buena salud de los campesinos búlgaros que consumían grandes cantidades de yogurt. Suponía que el consumo de grandes cantidades de alimentos ricos en bacterias lácticas eliminaba las bacterias formadoras de toxinas, mientras elevaba la proporción de bacterias lácticas y la flora intestinal mejoraba la salud, incrementando las expectativas de vida (Amores *et al.*, 2004).

Por otra parte, Henry Tissier pediatra francés observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y. Estas bacterias “bífidas” eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos. Sugirió la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una flora intestinal sana. Las obras de Metchnikoff y Tissier fueron las primeras en las que se hicieron propuestas científicas con respecto a la utilización probiótica de bacterias, aun cuando la palabra "probiótico" no había sido acuñada sino hasta 1960 (FAO/OMS, 2006).

En el año 1965, surge el término “probiótico” relacionado directamente con los productos lácteos fermentados, cuando Lilly y Stilwell lo utilizaron para describir aquellas sustancias secretadas por un microorganismos que estimulan el crecimiento de otro, en contraposición al término “antibiótico”, entendido como cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Sin embargo, Parker fue el primero en usar “probióticos” de acuerdo con el sentido que hoy conocemos, es decir, organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal (Amores *et al.*, 2004).

En 1989 Fuller adaptó la definición de probiótico hecha por Parker, con objeto de destacar el carácter microbiano de los probióticos, definiendo de nuevo el término como "un suplemento dietético a base de microbios vivos que afectan beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal". Havenaar y Huis in 't Veld en 1992 propusieron una definición muy similar: "un monocultivo o cultivo mixto viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona".

En 2002, un comité de expertos, convocados por la Organización Mundial de la salud (OMS) y la Organización de las Naciones para la Agricultura y la alimentación (FAO), definieron a los probióticos como “microorganismos vivos que,

cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped” (FAO/OMS en 2006).

Las bacterias probióticas, principalmente las ácido lácticas, se utilizan como adyuvantes en los alimentos para proporcionar una amplia variedad de beneficios para la salud. La colonización del intestino por bacterias probióticas previene crecimiento de bacterias dañinas por la exclusión competitiva y mediante la producción de ácidos orgánicos y compuestos antimicrobianos (Moyano *et al.*, 2008).

En pocos años los probióticos han evolucionado desde el uso de bacterias pioneras, como *Lactobacillus acidophilus*, hasta la gran variedad que existe actualmente con varios tipos de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e incluso algunos hongos y levaduras como *Aspergillus oryzae* *Sacharomyces boulardii* (Cuadro 1). Además, se ha incluido a *E. Coli* Nissle, cepa no patógena que compite con su homólogo patógeno, que tantos problemas causa (Amores *et al.*, 2004). Sin embargo, los microorganismos probióticos más utilizados y comercializados en los alimentos en todo el mundo pertenecen a los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

El tipo de vehículo más común portador de microorganismos probióticos son las leches fermentadas, las cuales pueden ser el resultado de una fermentación desarrollada con un solo tipo de microorganismo probiótico y contener bacterias vivas y diversos compuestos generados durante la fermentación (Escalante, 2001). Sin embargo ya se han reportado otras matrices fermentadas como embutidos, cereales y pepinillos entre otros (Furtado *et al.*, 2013).

La selección de una cepa como probiótico requiere que sus efectos benéficos sean demostrados científicamente, que la cepa sea segura para uso humano, que sea estable contra ácidos y sales biliares, y que se adhiera a las células de la mucosa intestinal, así como que también excluya o reduzca la

presencia de agentes patógenos y colabore en la formación de una flora normal equilibrada (Amores *et al.*, 2004).

Cuadro 1. Ejemplo de microorganismos probióticos (Amores *et al.*, 2004)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus</i>	Otras especies
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. lactis</i>	<i>S. termophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>B. infantis</i>	<i>L. diacetyllactis</i>				<i>Leuconostoc spp.</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>					<i>E. coli</i> Nissle
<i>L. kéfir</i>	<i>B. lactis</i>					
<i>L. brevis</i>	<i>B. adolescentis</i>					
<i>L. reuteri</i>						
<i>L. helveticus</i>						
<i>L. platanrum</i>						
<i>L. johnsonii</i>						
<i>L. salivarius</i>						

2.2.1 Mecanismos de acción

En la actualidad se han propuesto diferentes vías por las cuales los probióticos ejercen sus efectos benéficos. Sin embargo, los mecanismos aun no se conocen con exactitud. Se piensa que éstos pueden actuar acidificando la luz intestinal, segregando sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Figura 1), consumiendo nutrientes específicos o uniéndose competitivamente a los receptores intestinales de forma que mantienen la flora intestinal y evitan la acción de gérmenes patógenos (Ferrer y Dalmau, 2001).

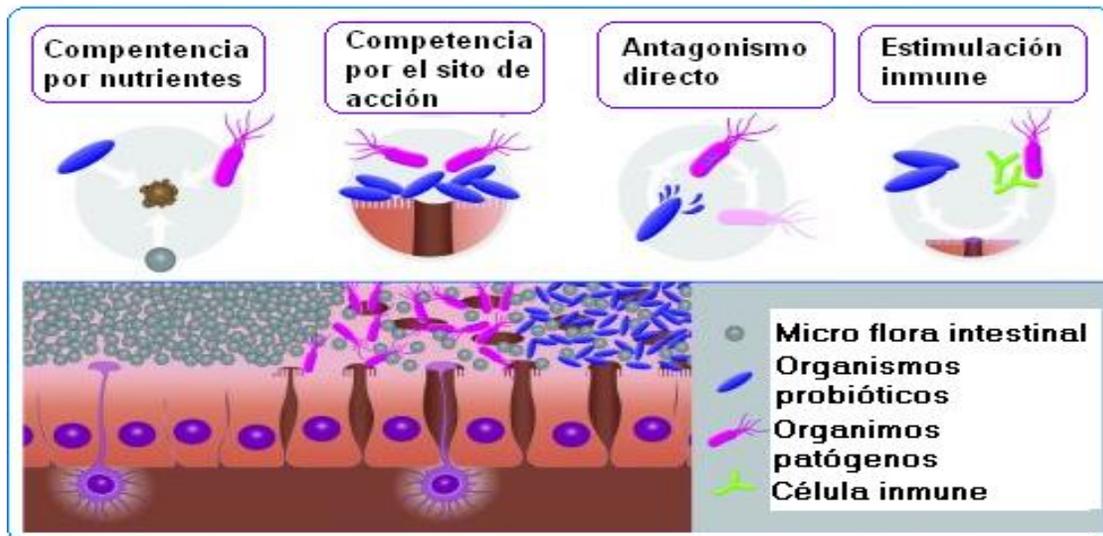


Figura 1. Comportamiento de los probióticos contra los patógenos (protexin veterinary, 2004).

Por otra parte, las bacterias probióticas pueden modificar la respuesta inmune aumentando la secreción de IgA específica frente a rotavirus, facilitan la captación de antígenos en la placa de Peyer. Adicionalmente se ha propuesto que los probióticos producen enzimas hidrolíticas y disminuyen la inflamación intestinal.

Se ha postulado que los probióticos presentan un efecto hipocolesterolémico a través de diferentes mecanismos a saber, aumento de la actividad de las hidrolasas de las sales biliares, las cuales se unen al colesterol y ayudan a su eliminación, mediante la producción de triglicéridos de cadena corta, los cuales inhiben la síntesis de colesterol, lo redistribuyen desde el plasma al hígado y, por conjugación de las sales biliares, el colesterol no se reabsorbe y es utilizado para la síntesis *novo* de sales biliares (Ferrer y Dalmau, 2001; Nomoto, 2005).

El efecto anticarcinogénico de los probióticos se ha asociado a la supresión del crecimiento de bacterias productoras de β -glucuronidasa y la β -glucósidasa, enzimas que convierten los procarcinógenos en carcinógenos (Amores *et al.*, 2004).

2.2.2 Benéficos para la salud

A partir de lo expuesto por Metchnikoff, se han atribuido una serie de efecto benéfico para la salud a microorganismos probióticos y a los alimentos que los contienen. Algunos de estos beneficios han sido bien documentados y establecidos; sin embargo, otros solo han demostrado un potencial prometedor en modelos animales. Un aspecto muy importante que se debe destacar sobre los beneficios a la salud impartidos por las bacterias probióticas es que éstos son cepa-específica (Cuadro 2); es decir, no existe una bacteria universal que provea todos los efectos benéficos propuestos, aun cuando se trate de cepas de la misma especie (Vasilijevic y Shah, 2008).

Cuadro 2. Efectos benéficos en la salud de algunos microorganismos probióticos (Vasilijevic y Shah, 2008).

Microorganismo	Efecto benéfico
<i>L. acidophilus</i> LC1	Equilibrio en la flora intestinal, efecto en sistema inmunitario
<i>L. acidophilus</i> NCFCO1748	Reducción de la actividad de enzimas procancerígenas, diarrea y constipación
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Reducción de la actividad de enzimas procancerígenas
<i>L. jonsonii</i> LA1	Inmuno estimulador, tratamiento de gastritis y úlceras
<i>L. rhamnosus</i> GG	Inmuno estimulador, tratamiento para diarrea e inflamación del intestino
<i>L. bulgaricus</i>	Inmuno estimulador, ayuda a la digestión de lactosa
<i>L. casei</i>	Promotor del crecimiento y de la viabilidad de probióticos
<i>B. bifidum</i>	Reducción de diarrea por rotavirus, favorece el equilibrio de la microbiota
<i>S. thermophilus</i>	Inmuno estimulador, mejora la digestión de lactosa
<i>S. boulardii</i>	Prevención de diarrea y tratamiento de colitis

Entre de las propiedades importantes que se han atribuido a los probióticos se incluyen la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales, reducción de la intolerancia a la lactosa, modulación de la respuesta inmunitaria del huésped, prevención del cáncer y de enfermedades cardiovasculares (reducción de colesterol en suero y los lípidos) (Minalliet *al.*, 2004).

La intolerancia a la lactosa es un problema que padece el 50-70% de la población mundial en distinto grado. Este problema es debido a la ingestión de productos que contienen lactosa (principalmente leche no fermentada) y los bajos niveles de b-galactosidasa intestinal. La lactosa es una sustancia osmóticamente muy activa y su presencia en la luz intestinal ocasiona la salida de fluidos e iones de la mucosa intestinal al exterior hasta alcanzar el equilibrio osmótico. Esto ocasiona una diarrea profusa. La ingestión de probióticos de forma continua, ha permitido reducir considerablemente la mala absorción de la lactosa. Este efecto parece deberse al aporte de b-galactosidasa exógena proporcionada por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* del yogurt. El tránsito intestinal se ralentiza permitiendo una mejor hidrólisis de la lactosa y la posterior adsorción de sus componentes (Marquina y Santos, 2005).

Las opiniones en cuanto a la cantidad necesaria de microorganismos para llevar a cabo los diferentes efectos benéficos es variable. De manera general, se ha establecido que la concentración mínima necesaria para que los alimentos sean considerados como probióticos, debe de ser $\geq 10^6$ UFC/mL de bacterias probióticas y éstos deben de consumirse regularmente (Furtado *et al.*, 2013).

Cuando las bacterias probióticas son empleadas para desarrollar nuevos alimentos funcionales, se desea que las bacterias sean capaces de adaptarse a un acarreador conveniente o un sustrato fermentable (*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 (Palou y Serra, 2000).

2.3 Condiciones gastrointestinales y sobrevivencia de probióticos

2.3.1 Función del sistema digestivo

El sistema digestivo abarca el conjunto de órganos relacionados directamente con el proceso de digestión y absorción de los nutrientes. Este sistema presenta seis partes claramente diferenciadas (Latarjet y Ruiz Lizard, 2008).

1) La boca, lugar de entrada de los nutrientes y donde se realiza su degustación, desintegración y lubricación. En la cavidad bucal se encuentran alojados los dientes, lengua y glándulas salivales. Los alimentos se dividen en partículas más fácilmente digeribles al ser cortados con los dientes y masticados con los posteriores. La digestión comienza cuando la saliva que procede de las glándulas salivales recubre estas partículas con enzimas digestivas. La saliva también contiene anticuerpos y enzimas, como la lisozima, que fraccionan las proteínas y atacan directamente las bacterias (Gil, 2010).

2) El esófago, es un tubo muscular de paredes finas, recubierto interiormente de una membrana mucosa, que conecta la garganta con el estómago. El alimento proveniente de la boca no baja por efecto de la fuerza de gravedad sino debido a unas ondas rítmicas de contracción y relajación muscular, que se denominan peristaltismo. El peristaltismo representa un mecanismo importante que permite mantener un número bajo de bacterias (Gil, 2010).

3) El estómago es un órgano muscular grande que consiste en tres regiones: el cardias, el cuerpo (fundus) y el antro. Éste sirve como área de almacenamiento para los alimentos, contrayéndose rítmicamente y mezclándolos con aproximadamente 2.5 L de jugos gástricos, los cuales están constituidos por sustancias importantes: moco, ácido clorhídrico y enzimas que fraccionan las proteínas (e.g., pepsina). El ácido clorhídrico provee el ambiente fuertemente ácido (pH 1.5-3.5) necesario para que la pepsina fraccione las proteínas. Esta condición representa un importante mecanismo de defensa, ya que algunos

estudios reportan que los microorganismos se enfrentan a estrés por alta acidez por un lapso promedio de 3 h (Cateris et al., 1998; Fernández et al., 2003).

4) El estómago libera su contenido al duodeno, primer segmento del intestino delgado. Cuando éste se llena, el duodeno indica al estómago que detenga el vaciamiento.

5) Intestino delgado. El duodeno, primera porción del intestino delgado, recibe enzimas del páncreas y bilis del hígado. Estos líquidos llegan al duodeno a través del esfínter de Oddi y contribuyen de forma importante a los procesos de digestión y absorción, así como a eliminar microorganismos que entran con la comida. El peristaltismo también ayuda a la digestión y a la absorción al revolver los alimentos y mezclarlos con las secreciones intestinales.

El yeyuno y el íleon forman el resto del intestino delgado, son localizados a continuación del duodeno. Esta parte del intestino es la responsable principal de la absorción de grasas y otros nutrientes. La pared intestinal libera moco y agua, que lubrican y disuelven el contenido intestinal, ayudando a disolver los fragmentos digeridos. También se liberan pequeñas cantidades de enzimas que digieren las proteínas, los azúcares y las grasas, además de que presentan actividad antimicrobiana (Gopalet *al.*, 2001).

5) El intestino grueso, dividido también en tres zonas: ciego, colon y recto, es donde se dirige el material residual, teniendo lugar en un proceso de absorción selectiva de electrolitos y agua, y la formación de las heces que serán excretadas por el ano.

6) El ano es la abertura que existe al final del tracto gastrointestinal, por la cual los materiales de desecho abandonan el organismo. El ano está formado en parte por las capas superficiales del organismo, incluyendo la piel y, en parte, por el intestino. Está recubierto por una capa formada por la continuación de la piel. Un anillo muscular (esfínter anal) mantiene el ano cerrado.

2.3.1.1 Uso de sistemas gastrointestinales simulados como herramienta para evaluar la viabilidad de probióticos

Varios sistemas han sido desarrollados para simular las condiciones fisicoquímicas *in vitro* presentes en el tracto gastrointestinal humano para el estudio de la viabilidad de bacterias probióticas. Dichos sistemas incluyen modelos sencillos, donde las bacterias probióticas son tratadas de forma discontinua con soluciones acidas y posteriormente con soluciones de bilis hepática. Sin embargo, estos modelos simplifican el evento en el tracto gastrointestinal humano y están limitados en su capacidad para simular los aspectos dinámicos de los procesos *in vivo* (Cook *et al.*, 2012).

Por otra parte, sistemas más complejos que simulan el tracto gastrointestinal humano permiten además estudiar las interacciones de las bacterias probióticas la microbiota intestinal o determinar el efecto de las bacterias probióticas y productos simbióticos dentro del entorno microbiano intestinal. En este sentido, modelos de tránsito compartimental se han desarrollado durante años y se han hecho algunos avances para desarrollar aparatos de disolución con base en modelos multicompartimentales tales como los modelos continuos constituidos de diferentes cámaras para simular los principales compartimentos del TGI, a saber estómago, el duodeno, el yeyuno y el íleon, lo cual permite evaluar las enzimas digestivas que se producen durante la digestión de alimentos, varios valores de pH y concentraciones biliares en tiempos variables con el fin de determinar la supervivencia de la cepa(s) bajo estudio (Latarjet y Ruiz-lizard, 2008).

Otros estudios de viabilidad de las bacterias probióticas se han realizado *in vivo* en intestino de cerdo. Sin embargo, debido a la complejidad de estos sistemas, algunas limitaciones tales como reproducibilidad y respetabilidad de resultado, el costo de cada prueba pueden impedir el uso de estos sistemas (Cook *et al.*, 2012)

2.3.2 Estabilidad de las bacterias probióticas antes y durante su paso por el tracto gastrointestinal humano.

La elevada acidez en el estómago y la alta concentración de componentes biliares en la porción proximal del intestino delgado son condiciones normales del tracto gastrointestinal (TGI) humano que por definición las bacterias probióticas deben de ser capaces de resistir. La estabilidad que exhiben las bacterias probióticas a éste ambiente hostil está basada en las características individuales de su pared celular y/o en la capacidad que tiene de responder a condiciones de estrés, sintetizando una gran variedad de proteínas particulares, las cuales promueven el mantenimiento del pH interno, la translocación de las sales biliares, regular la presión osmótica de la célula, así como catalizar la hidrólisis de las sales biliares conjugadas, lo que les permite sobrevivir por un corto período en estado no proliferativo bajo estas condiciones, adherirse, y colonizar asegurando así su funcionalidad. Esta capacidad varía entre cada especie, y hasta el momento no se conoce un nivel mínimo de tolerancia requerido (Davis *et al.*, 1986).

En algunas ocasiones, la estabilidad de las bacterias probióticas se ve comprometida mucho antes de que éstas sean expuestas a las condiciones normales del TGI, ya que durante el procesamiento y almacenamiento de la matriz alimentaria por la cual son administrados, su estabilidad pueden ser afectadas por factores como la acidificación del producto, producción de peróxido de hidrógeno, limitada disponibilidad de nutrientes, presencia de oxígeno debido a la permeabilidad del envase, presión osmótica, temperatura de almacenamiento y posible interacción con otras especies microbianas (Mortazavian *et al.*, 2008).

Por tal motivo, en ocasiones es necesario proteger a las bacterias probióticas de tal manera que les dé estabilidad y les permita mantener su viabilidad durante su paso a través del TGI humano.

2.4 Microencapsulación de microorganismos probióticos

Una de las alternativas para mantener la viabilidad de los probióticos durante su paso por el tracto gastrointestinal, es a través de la microencapsulación

de las bacterias, es decir inmovilizarlas en una matriz protectora. La microcapsulación es un proceso en el que las células se retienen dentro de una matriz o membrana semipermeable, esférica, ligera, y resistente que rodea un centro sólido/líquido con un diámetro que varía entre micras y milímetros. En esta tecnología se emplean biopolímeros de calidad alimentaria como el alginato, el quitosano, la carboximetilcelulosa, la carregenina, la grenetina y la pectina principalmente (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

2.4.1 Sobrevivencia de los probióticos microencapsulados bajo condiciones gastrointestinales

Los probióticos durante su tránsito gastrointestinal deben de sobrevivir y llegar en concentraciones adecuadas de modo que sea viable y pueda ejercer su función en el sitio de acción deseado. Cuando un probiótico es microencapsulado se tiene que considerar la fisiología del tracto gastrointestinal, para el control de la liberación de las microcápsulas (Figura 2).

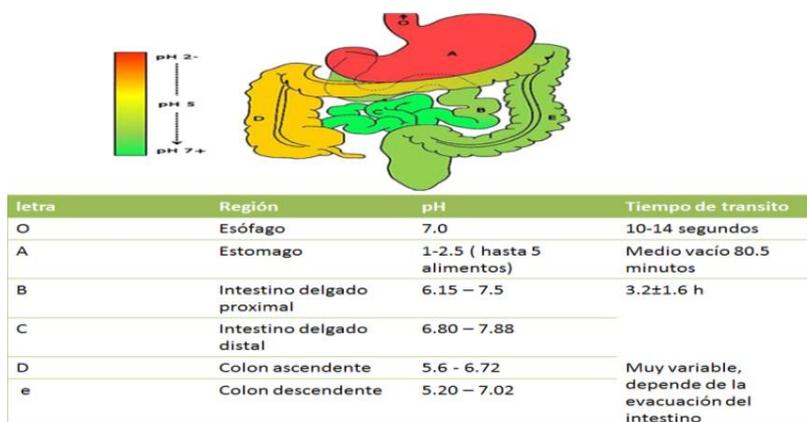


Figura 2. Condiciones prevalentes en el proceso gastrointestinal (Cook *et al.*, 2012).

La mecánica de liberación de las bacterias microencapsuladas es accionada por la degradación, la desintegración o disolución de la formulación ya que las bacterias generalmente son grandes para difundirse desde dispositivos de suministro tradicionales. A lo largo del tracto GI hay varios métodos posibles para

la entrega, basada en el pH, el tiempo, las presiones peristálticas y la fermentación bacteriana (Cook *et al.*, 2012).

Después de la ingestión, un probiótico microencapsulado pasará rápidamente a través del esófago (teniendo alrededor 5 minutos) para llegar al estómago, punto en el que se espera la mayor pérdida de viabilidad de las bacterias debido a los niveles altos de ácido (Fortran *et al.*, 1973, Kabak y Ozbey, 2012).

El pH, y el tiempo de tránsito a través del estómago varían generalmente entre los individuos, y depende de muchos factores, tales como el tipo de alimentación y la edad. Los valores de pH del estómago se encuentran dentro de 1-2.5 dependiendo del tiempo de ayuno (Crook *et al.*, 2012). El tiempo de vaciado gástrico es también muy variable y se describe con frecuencia entre 5 min y 2 h; sin embargo, el tiempo de vaciado gástrico medio se ha estimado usando pruebas de aliento alrededor de 80.5 min (McConnell *et al.*, 2008).

El vaciado del contenido gástrico es generalmente el resultado de la acción peristáltica conocido como el complejo de la migración mioeléctrica, mientras que el esfínter pilórico asegura la retención de contenidos grandes y suficientemente digeridos. Como resultado, las partículas más pequeñas se mantendrán durante un período de tiempo más corto. El estómago tiene una capacidad de fluido de hasta aproximadamente 1.5 L. pero por lo general contiene sólo 50 mL en un estado de ayuno. Además de ácido, el estómago también contiene pepsina, una enzima proteolítica, que degrada las proteínas. La pepsina es producido por la escisión auto-catalítica de su zimógeno precursor, pepsinógeno, y es activa al pH bajo del estómago (Crook *et al.*, 2012).

Las microcápsulas después del paso a través del estómago, transitan en el intestino delgado donde el tiempo de permanencia fluctúa de 3.2 ± 1.6 h, con un pH estimado que se encuentre en el intervalo de 6.15-7.35 en la región proximal, aumentando a pH 6.80-7.88 en el intestino delgado que las cápsulas alcanzan el intestino grueso en cuyo punto el pH disminuye ligeramente a pH 5.6-6.72 en el colon ascendente, y el pH 5.20-7.02 en el colon descendente. Como las

microcápsulas descienden por el tracto gastro intestinal, la cantidad relativa de líquido presente disminuirá a medida que el contenido se compactan en las heces. En el intestino grueso se encuentra una microbiota endógena de especies bacterianas que ofrecen la oportunidad para la liberación de la microcápsulas, estas especies bacterianas degradan el material de la microcápsula (polisacáridos) y permite la liberación de las bacterias probióticas (Crook *et al.*, 2012).

2.4.2 Microencapsulación por el método de emulsión/gelificación interna

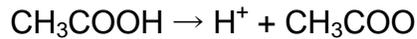
La emulsificación es una técnica química que se usa para encapsular células probióticas vivas con el uso de hidrocoloides (algínato, carragenano y pectina) como materiales de encapsulación. La técnica para formar una emulsión es fácil, escalable y permite una alta tasa de supervivencia de las bacterias. Las cápsulas obtenidas tienen un diámetro pequeño, pero el principal inconveniente de este método es que proporciona una gama de gran tamaño y forma. El procedimiento de emulsión permite la producción de microcápsulas en el que tamaño específico dependerá de la variación de la velocidad de agitación y la relación agua/aceite. Las perlas de gel se puede introducir en una segunda solución de polímero para crear una capa de recubrimiento que proporciona una protección adicional a la célula o tal vez dar mejores propiedades organolépticas (Burgainet *al.*, 2011).

La gelificación iónica se basa en la liberación de ión calcio un complejo insoluble en una solución de alginato de sodio. Esto se lleva a cabo por acidificación de un sistema aceite-ácido soluble, con participación en la fase acuosa del alginato (Songet *al.*, 2013). De acuerdo con esta técnica, a la fase acuosa, generalmente formada por el alginato y el carbonato de calcio, se le adiciona la fase oleosa (aceite vegetal, Span⁸⁰ y ácido acético) y se producen las siguientes reacciones:

- a) Difusión del ácido acético desde la fase oleosa a la acuosa



b) El hidrogenión es liberado del ácido acético a la fase acuosa



c) El calcio es liberado por la reacción entre el hidrogenión y la sal insoluble de calcio

d) El gel de alginato se forma gradualmente a través de la reacción entre el calcio y los residuos de los ácidos glucurónicos de la cadena, formándose la estructura que se conoce como “caja de huevos” (Figura 3) en la que, metafóricamente, los huevos serían los iones de calcio

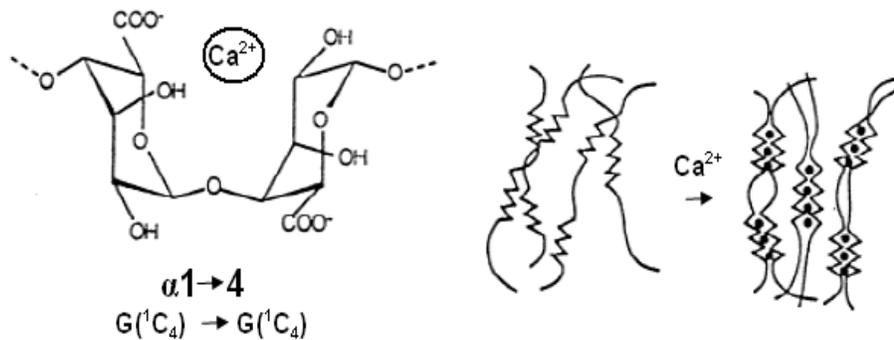
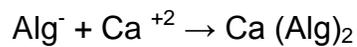


Figura 3. Formación del gel alginato de calcio (Martin et al., 2009).

El gel de alginato de calcio formado es permeable a moléculas solubles en agua, cuyos pesos moleculares sean menores a 5000 Dalton. Moléculas mayores también pueden difundir a través del gel, pero si el peso molecular excede los 10,000 Dalton, la difusión no ocurre. La excepción a esto, la constituyen los lípidos, que permanecen en la matriz aun cuando sean de peso molecular bajo (Martin et al., 2009).

2.4.3 Alginato como material encapsulante

El alginato es un polímero natural, polisacárido lineal no ramificado compuesto de proporciones de 1-4 enlazadas β - D -manurónico (M) y α - L gulurónico-(G) ácidos, que tiene la capacidad de formar un gel ligeramente cuando

se encuentra con algún catión divalentes tales como Ca^{+2} (preferiblemente usado debido a la biocompatibilidad) y Ba^{+2} . Es reconocido como un material generalmente seguro (GRAS, por sus siglas en ingles) por la FDA, y la ingesta diaria admisible es “no especificada”, que es la clasificación más alta posible para los aditivos alimentarios (Songet *al.*, 2013). El alginato ha sido ampliamente utilizando como matriz para la microencapsulación de los probióticos durante varios años. Por otra parte, las propiedades mecánicas y fisicoquímicas del gel de alginato se puede mejorar utilizando polímeros tales como quitosano y poli-L-lisina (Yu *et al.*, 2010).

Los hidrogeles de alginato se utilizan ampliamente en la encapsulación de células y alginato de calcio se prefiere para la encapsulación de los probiótico debido a su sencillez, no toxicidad, biocompatibilidad y bajo costo. Sin embargo, algunas desventajas se atribuyen al uso de alginato. Por ejemplo, perlas de alginato son sensibles al ambiente ácido, que no es compatible para la resistencia de las micropartículas en las condiciones del estómago. Además, las micropartículas obtenidas son muy porosas, lo cual es un inconveniente cuando el objetivo es proteger las células de su entorno. Sin embargo, los defectos pueden ser compensados por la mezcla de alginatos con otros compuestos de polímero de recubrimiento, las cápsulas por otro compuesto o la aplicación de modificación estructural del alginato mediante el uso de diferentes aditivos (Mortazavian *et al.*, 2008).

Por ejemplo, alginato mezclado con quitosano se usa comúnmente y se ha demostrado que este método da como resultado una mejora de la eficacia de encapsulación de probióticos (Burgain *et al.*, 2011).

2.4.4 Quitosano como material de revestimiento en las microcápsulas

El quitosano, biopolímeros producto de la desacetilación de la quitina polisacárido que está ganando importancia en el campo de la alimentación y farmacéutica debido a su carácter único polimérico catiónico, buena biocompatibilidad, no toxicidad y biodegradabilidad. El quitosano puede ser aislado

de caparazones de crustáceos, cutículas de insectos y las membranas de hongos. Las propiedades del quitosano varían de acuerdo a su fuente de aislamiento. Los términos quitina y quitosano no se refieren a compuestos específicos, sino a dos tipos de copolímeros, que contiene los dos residuos de monómero anhidro- *N* - acetil- *D* -glucosamina y anhidro- *D* -glucosamina, respectivamente. Con el fin de lograr una estabilidad suficiente, perlas de gel de quitosano y microesferas pueden ser reticuladas iónicamente con polifosfatos y alginato sódico (Anal y Singh, 2007).

Este componente no ha mostrado una buena eficacia para aumentar la viabilidad celular mediante la encapsulación y se utilizan preferentemente como capa, pero no como una cápsula (Mortazavian *et al.*, 2008). De hecho, la encapsulación de bacterias probióticas con alginato y un recubrimiento de quitosano (Figura 2) forman una matriz que ya no está en condiciones porosas y no presenta sensibilidad a pH extremos proporcionando protección en condiciones simuladas de gastro y por lo tanto, es una buena manera de entrega de células bacterianas viables al tracto intestinal (Burgain *et al.*, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

Los principales factores que influyen la viabilidad de los probióticos en condiciones del TGI son la matriz alimentaria, las condiciones adversas del TGI generadas por la lisozima en la saliva, el pH muy bajo en el estómago, y las sales biliares y gastro-enzimas en el intestino delgado. Las técnicas de microencapsulación permiten la protección de diferentes principios activos, incluyendo microorganismos, que bajo tales condiciones sufren degradación y pérdida de sus propiedades benéficas para la salud. El alginato es un material adecuado para la microencapsulación por ser biocompatible, no tóxico y degradable. Al emplear sistemas mixtos poliméricos con quitosano para la formación de la matriz se mejoran las propiedades físico-químicas del sistema, se incrementa la eficiencia de encapsulación y rinde mayores tiempos en la liberación del principio activo. En este orden de ideas, es factible la posibilidad de combinar técnicas de microencapsulación incorporando sistemas mixtos poliméricos resultando en un producto final que permita proteger a los compuestos encapsulados de factores adversos mejorando así su estabilidad y biodisponibilidad.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Implementar un sistema mixto de matrices poliméricas para la microencapsulación de cepas probióticas y evaluar su eficacia para la protección de los cultivos bacterianos bajo condiciones gástricas simuladas en un sistema dinámico.

4.2 Específicos

- ✚ Determinar la capacidad de crecimiento y resistencia de bacterias probióticas libres a bajos valores de pH y seleccionar aquellas sensibles.
- ✚ Caracterizar el sistema de matrices poliméricas por el método de emulsión para la obtención de microcápsulas
- ✚ Obtener bacterias probióticas microcápsulas en una matriz de alginato-kitosano.
- ✚ Evaluar la eficacia de la microencapsulación para proteger la viabilidad de las bacterias probióticas bajo condiciones gástricas simuladas empleando un sistema dinámico.

V. Materiales y Métodos

5.1 Cultivos bacterianos y condiciones de propagación

Los 22 cultivos bacterianos utilizados en el presente estudio pertenecen al cepario de Química y Biotecnología de Productos Lácteos de la Coordinación de Tecnología de Alimentación de Origen animal (CTAOA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C). Algunas de las cepas fueron cedidas por colaboradores de diferentes Centros de Investigación, mientras que otras fueron aisladas de diferentes productos probióticos (Cuadro 3) siguiendo la metodología propuesta por Hernández-Mendoza et al., (2009). Todos los cultivos fueron almacenados a -80 °C en glicerol (50 % v/v) hasta su uso.

Cuadro 3. Cultivos probióticos empleados en el estudio

Cepa	Código	Proveedor/Fuente
<i>B. longum</i> R0175	B1-R0175	Maramor chocolates TM
<i>L. heveticus</i> ROO52	Lc-ROO52	
<i>L. fermentum</i> NRRB-B1932	L. ferm 2	Universidad de la Américas, Puebla. Lab. Dr. Aurelio López Malo
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 13075	L. rha	
<i>L. rhamnosus</i> NRRL B-442	L. rha 442	
<i>L. casei</i> NRRLB-1922	Lc-B1922	
<i>L. plantarum</i> NRRLB-4496	L. pla 4496	
<i>L. acidophilus</i> NRRLB-4495	La-B4495	
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4796	L. ac	
<i>L. casei</i> DPC3968	Lc-3968	
<i>L. reuteri</i> NRRL-14171	Lr-14171	
<i>B. bifidum</i> NCFB 2715	Bb-2715	
<i>L. casei</i> CRL431	Lc-CRL431	Yogurt Albert Heijn®
<i>B. lactis</i> Bb12	B1-BB12	Universidad de Wisconsin, Lab. Dr. James Steele
<i>L. casei</i> L30	Lc-L30	
<i>L. casei</i> L9	Lc-L9	
<i>L. casei</i> ATCC 334	Lc-334	
<i>L. casei</i> 12A	Lc-12 ^a	
<i>L. casei</i> 21/1	Lc-21/1	
<i>L. casei</i> 7R1	Lc-7R1	Swiss-typechees, USA
<i>L. johnsonii</i> ATCC 33200	L. jhon	
<i>L. casei</i> Shirota	Lc-shi	Yakult®, Japan Inc.

Previo a cada experimento, las cepas fueron reactivadas en caldo MRS (de Man, Rogosa and Sharpe, BD-Difco™, Le Pont de Claix, Francia, pH 6.2) y propagadas mediante cuatro sub-cultivos rutinarios. Cada sub-cultivo involucró un inóculo del 1% (v/v) con incubación a 37°C durante 48, 24, 18 y 12 h, respectivamente.

5.2 Evaluación de la capacidad de crecimiento de las bacterias probióticas libres a diferentes valores de pH

Las bacterias obtenidas a partir del último sub-cultivo (12 h) de propagación, fueron recuperadas por centrifugación (5000 rpm, 10 °C, 10 min) y suspendidas en 1 mL de una solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS, pH 7) estériles. De ésta suspensión se tomó una alícuota (2%) y se inóculó en caldo MRS preparado a diferentes valores de pH (2, 3, 4, 6.2). Los cultivos fueron incubados durante 24 h a 37°C (Figura 4). Durante el periodo de incubación se determinó el crecimiento bacteriano por el método de vaciado en placa, tomando muestras a diferentes tiempos (0, 4, 24 h). Las placas fueron incubadas en anaerobiosis a una temperatura de 37°C durante 48 h. La cuenta viable se realizó por duplicado y todas las colonias visibles fueron contadas, los resultados fueron expresados como \log_{10} UFC/mL.

5.3 Evaluación de la capacidad de resistencia de las bacterias probióticas libres a diferentes valores de pH

A partir de los cultivos bacterianos suspendidos en PBS (ver sección anterior), se transfirió una alícuota (2%) a diferentes soluciones de PBS (7M) ajustadas a valores de pH (2, 3, 4, 7). Dichas soluciones fueron incubadas durante 24 h a 37°C (Figura 5). La capacidad de resistencia fue determinada evaluando la cuenta viable en muestras tomadas a las 0, 4, 24 h.

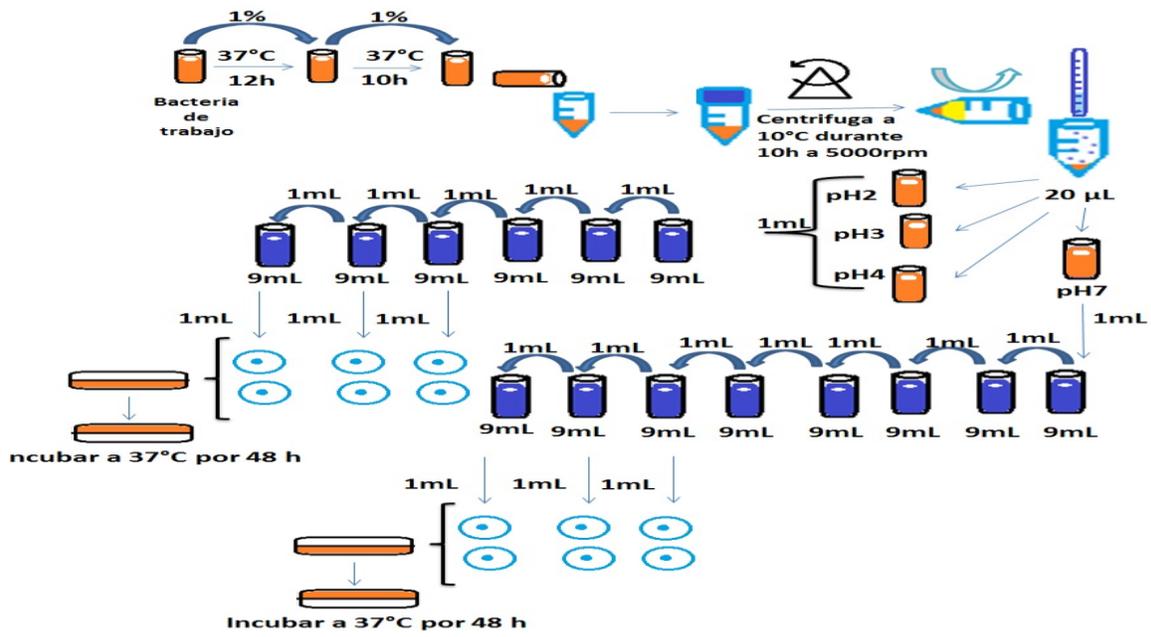


Figura 4. Diagrama de flujo de la evaluación de crecimiento de los probióticos.

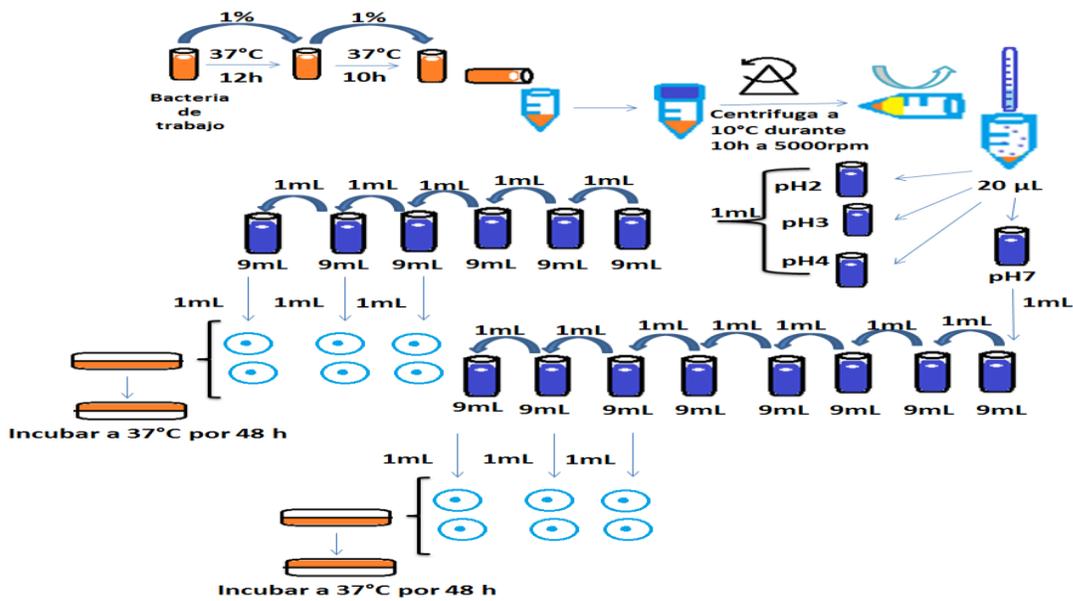


Figura 5. Diagrama de flujo de la evaluación de la resistencia de los probióticos.

5.4 Microencapsulación de las bacterias probióticas por el método de emulsión/gelificación interna

5.4.1 Preparación del cultivo

Aquello cultivos que mostraron la menor capacidad para crecer y sobrevivir en condiciones de bajos valores de pH, fueron seleccionados para ser microencapsulados y evaluar su viabilidad bajo condiciones gastrointestinales simuladas. Para ello las cepas fueron propagadas mediante dos sub-cultivos en caldo MRS (pH 6.2) que involucraron un inóculo del 1%, incubación durante 18 y 12 h, respectivamente, a una temperatura de 37°C. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación (5000 rpm, 10°C, 10 min), y el paquete celular obtenido fue resuspendido en 5 mL de PBS para obtener una concentración celular de 10^9 UFC/mL de cada cepa.

5.4.2 Preparación del sistema de matrices poliméricas por el método de emulsión

5.4.2.1 Preparación del alginato de sodio, de la mezcla alginato-bacteria y del quitosano

La solución de alginato de sodio se preparó de acuerdo a la metodología propuesta por Chandramouli *et al.* (2004). En breve, 1.8 g de alginato de sodio (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, Estados Unidos de Norteamérica) fueron diluidos en agua destilada y aforados a un volumen de 100 mL. La solución preparada presentó un valor de pH de 6.9. Posteriormente, 0.5 g de quitosano (Sigma) fueron disueltos en 100 mL de una solución de ácido acético (Sigma) al 0.25%. La solución final presentó un valor de pH de 5. Por otra parte, se preparó una solución (0.4 %) de CaCl_2 (Sigma). Todas las soluciones fueron esterilizadas en autoclave (121 °C, 15 min) (Ding y Shah, 2009).

Finalmente, las bacterias probióticas resuspendidas en 5 mL de PBS fueron incorporadas en los 100 mL alginato de sodio (Ding y Shah, 2009).

5.4.2.2 Preparación de la emulsión y bacterias microencapsuladas

Para preparar la emulsión, la mezcla de alginato-bacteria fue incorporada en 250 mL de aceite de girasol grado comestible (Liquids Chemical of México, S.A.

de C.V.) adicionado con 4mL de sorbitan monooleato (Span[®] 80, Sigma). La mezcla se agitó (700 rpm) con ayuda de un agitador magnético durante 15 min (Figura 6). Posteriormente, se adicionaron 5 mL de ácido acético glacial y se agitó por otros 15 min. Una vez transcurrido el periodo de agitación se adicionó 50 mL de la solución de CaCl₂ y se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Finalmente, la mezcla se dejó reposar hasta obtener una separación visual de las microcápsulas. Éstas fueron recuperadas por filtración y se lavaron (3 veces) con polisorbato (Tween[®]80, Sigma) y agua libre de iones (Figura 7) (Poncelet *et al.*, 1992, Ding y Shah, 2009, Chandramouli *et al.*, 2004).



Figura 6.Preparación de la emulsión



Figura 7. Filtración y lavado de las microcápsulas en condiciones asépticas.

5.4.2.3 Recubrimiento con quitosano

Las microcápsulas obtenidas en la sección anterior fueron sumergidas en una solución de quitosano al 0.5% y mantenidas en agitación durante 30 minutos. Posteriormente, las microcápsulas recubiertas con quitosano fueron filtradas y lavadas con agua libre de iones. Finalmente, fueron depositadas sobre papel filtro (Whatman™, GE Healthcare, Amersham Inglaterra Ltd.) Y almacenadas en condiciones estériles a temperatura ambiente (25°C) durante 24 h para eliminar cualquier resto de humedad (Junzhan *et al.*, 2008).

5.5 Recuento de bacterias microencapsuladas

Para determinar la concentración de bacterias viables atrapadas en las microcápsulas se empleó la metodología propuesta por Chandramouli *et al.* (2004) y Chavarri *et al.* (2010), con algunas modificaciones. En breve, 1g de cápsulas se resuspendieron en 10 mL desolución amortiguadora de citrato de sodio (0.1M, pH7, Sigma) estéril. La solución fue incubada durante 1 h a 37°C. Posteriormente, ésta fue homogenizada mediante agitación mecánica (Seward Ltd STOMACHER®80 biomaster, Alemania) a una velocidad de 300 rpm durante 15 min (Figura 8). Una vez transcurrido el periodo de agitación, muestras de 1 mL fueron diluidas en agua peptonada estéril con posteriores diluciones seriadas. Alícuotas de 1 mL fueron plaqueadas por el método descrito en la sección 5.2.



Figura 8. Homogenización de las microcápsulas

5.6 Evaluación de la sobrevivencia de bacterias probióticas libres y microencapsuladas durante un proceso gastrointestinal dinámico simulado

Todos los reactivos empleados para este ensayo fueron adquiridos en Sigma. El sistema gastrointestinal dinámico de tres compartimentos (Figura 9 y 10) empleado en este estudio fue similar al propuesto por Kabak y Ozbey (2012). Las bacterias probióticas libres fueron propagadas y obtenidas (10^9 UFC/mL) de acuerdo a las metodologías citadas en las secciones 5.1 y 5.2, respectivamente; mientras que las bacterias microencapsuladas fueron preparadas de acuerdo a la metodología previamente citada en las secciones 5.4.2.2 y 5.4.2.3. Las soluciones gastrointestinales fueron preparadas de acuerdo a la metodología propuesta por Fernández de Palencia *et al.*, (2008).

Las células libres, así como las células microencapsuladas fueron resuspendidas en 6 mL de saliva simulada (Figura 9 y 10, respectivamente) compuesta por una solución electrolítica estéril [6.2 g/L de NaCl, 2.2 g/L de KCl, 0.22 g/L de CaCl_2 y 1.2 g/L de NaHCO_3 , (w/v)] ajustada a pH 6.2, con 1 M de NaHCO_3 , y adicionada con lisozima (concentración final de 0.01 % w/v). Las mezclas fueron incubadas por 5 min a 37 °C con agitación (85 rpm).

Una vez transcurrido el periodo de incubación, las muestras fueron sometidas al entorno gástrico simulado. Para ello, 12 mL de solución electrolítica estéril (pH 5) añadida con 0.3 % (p/v) de pepsina se incorporó en las suspensiones de saliva simulada. El pH inicial se disminuyó con HCl 1 M hasta alcanzar un valor de 2.5. Las mezclas fueron incubadas por 120 min a 37 °C con agitación (85 rpm) (Figura 10).

Al finalizar el periodo de incubación, las células fueron sometidas a las condiciones intestinales simuladas (Figura 9-11). Para ello, las muestras fueron ajustadas a pH 6.5 con NaHCO_3 1 M. Inmediatamente después, se mezclaron con 12 mL de una solución electrolítica estéril (5 g/L de NaCl, 0.6 g/L de KCl y 0.3 g/L de CaCl_2), añadida con 0.45 % (p/v) de sales biliares y 0.1 % (p/v) de pancreatina. Después de 120 min de incubación a 37 °C con agitación (85 rpm), las células libres y microencapsuladas fueron recuperadas por centrifugación y se estimó la

supervivencia bacteriana de acuerdo a los procedimientos descritos en las secciones 5.2 y 5.5, respectivamente.

Por otra parte, la morfología de las microcápsulas, antes y después de su paso por el sistema gástrico simulado, fueron determinadas mediante imágenes (n=10) adquiridas con una cámara digital monocromática de 5 megapíxeles (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) acoplada a un microscopio óptico ModularAxioScope.A1 (Carl Zeiss).

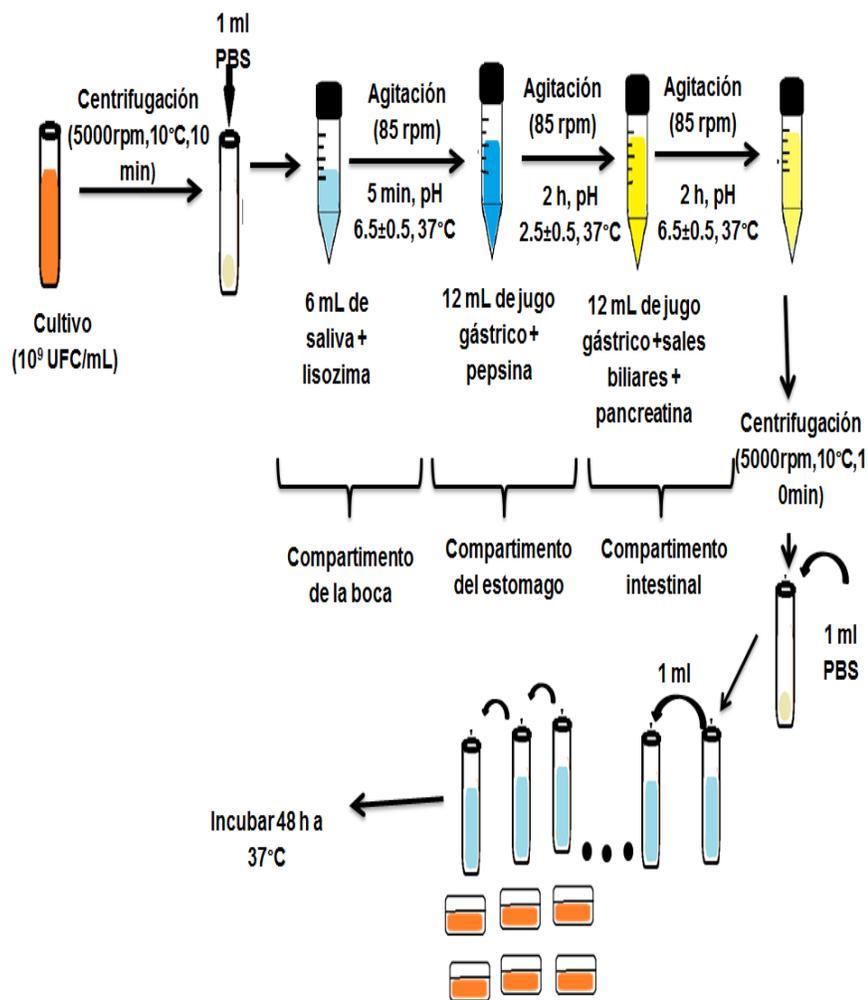


Figura 9. Diagrama de las condiciones gastro-intestinales simuladas empleadas en el sistema dinámico *in vitro* para bacterias libres (Kabak y Ozbey, 2012).



Figura 10. Incubación de las BAL libres y microencapsuladas en el proceso de SGI.

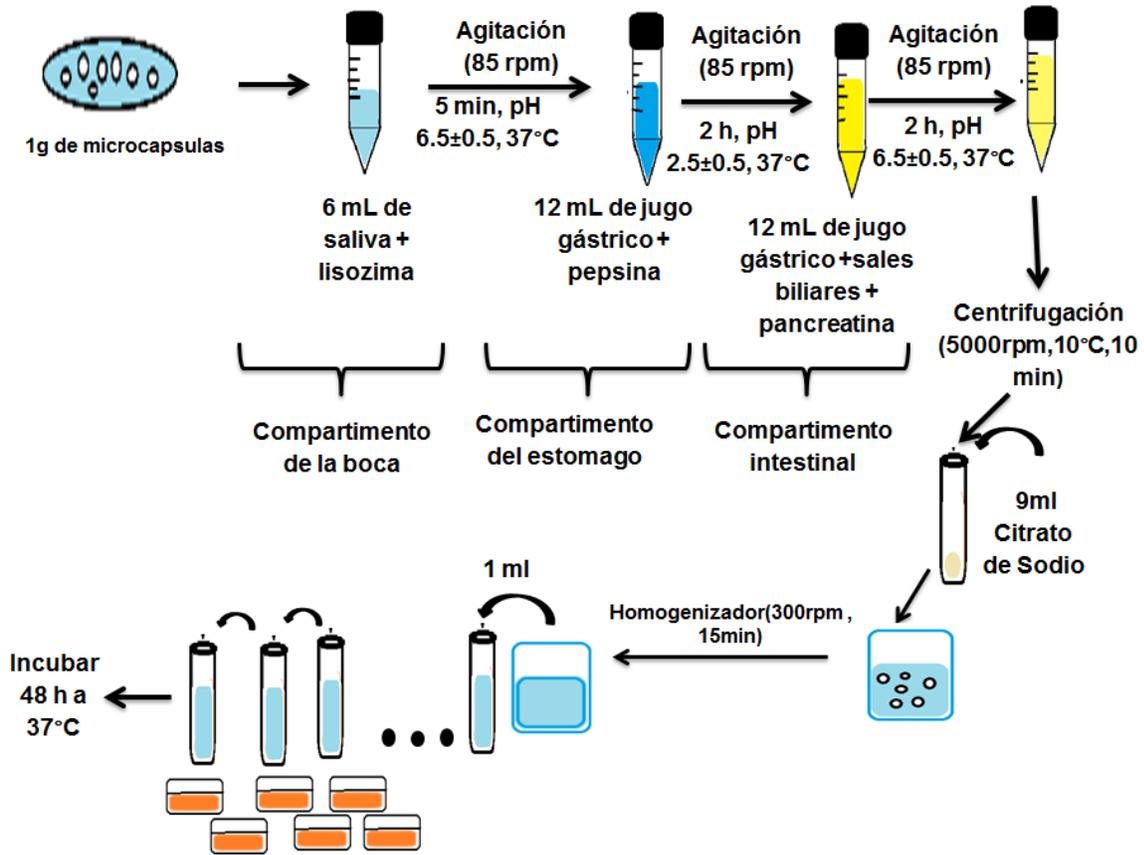


Figura 11. Diagrama de las condiciones gastrointestinales simuladas empleadas en sistema dinámico *in vitro* para bacterias microencapsuladas (Kabak y Ozbey, 2012).

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis consistió en una distribución de probabilidad por medio de una “t de student”. Se aplicó el análisis a los datos obtenidos a partir del ensayo del modelo gastrointestinal simulado. Se calculó el porcentaje de pérdida de viabilidad para dos muestras diferentes suponiendo varianzas desiguales a un 95% de confianza.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación de la capacidad de crecimientos y de resistencia de las bacterias probióticas libres a diferentes valores de pH

Una de las principales propiedades que una bacteria probiótica debe poseer es la tolerancia a condiciones ácidas y a los cambios drásticos de pH (Amores *et al.*, 2004). Diferentes autores han reportado que el comportamiento ante estas condiciones es cepa-dependiente, es decir, que depende los mecanismos de cada cepa para mantener el pH interno, a saber: respuesta homeostática, respuesta de tolerancia al ácido y la síntesis de proteínas de 'shock' ácido (Zhang *et al.*, 2012). Por lo anterior, la evaluación del crecimiento y resistencia de las cepas probióticas se realizó con el objetivo de seleccionar aquellas con mayor sensibilidad para sobrevivir y crecer en diferentes valores de pH. Como resultado de los respectivos ensayos se observan en los siguientes gráficos:

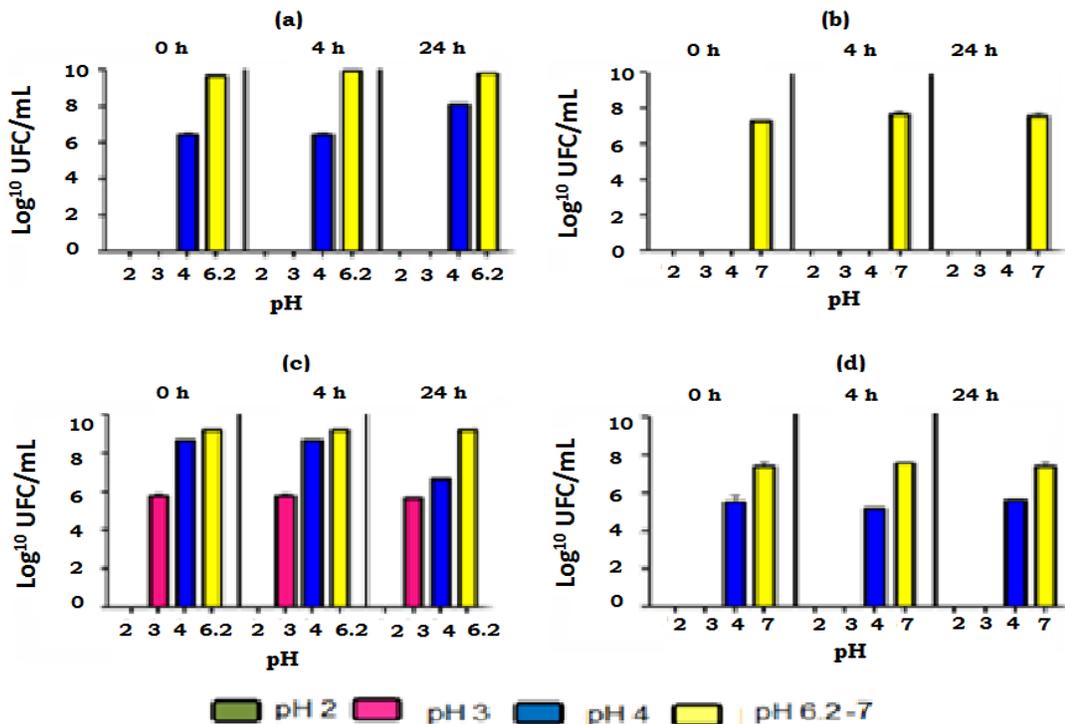


Gráfico 1. Evaluación del crecimiento (a, c) y resistencia (b, d), de las cepas Lc-21/1 y Lc-ROO52, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.

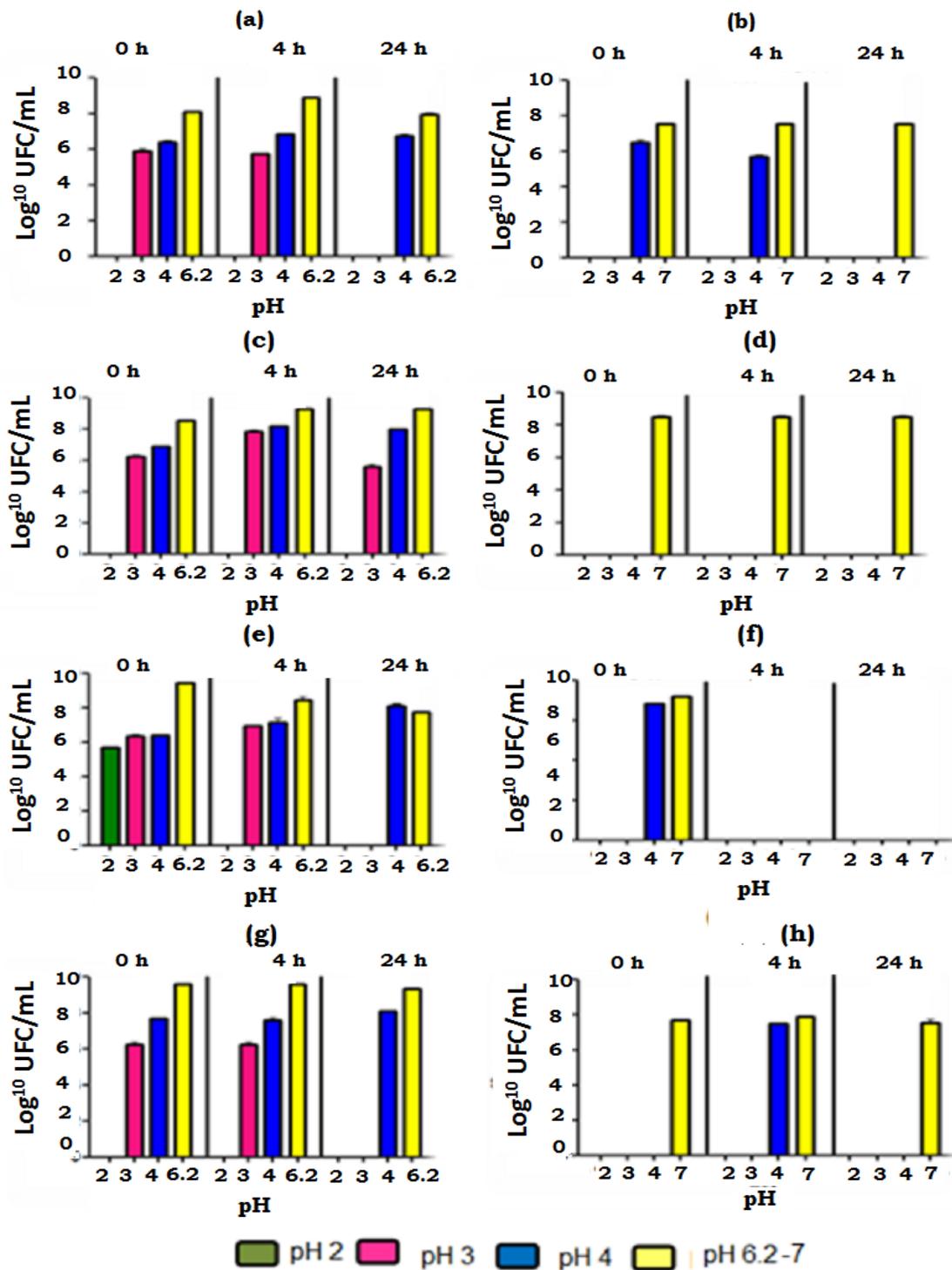


Gráfico 2. Evaluación del crecimiento (a, c, e, g) y resistencia (b, d, f, h), de las cepas L.30, Lc-L9, L.r14171, y Lc-7R1, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.

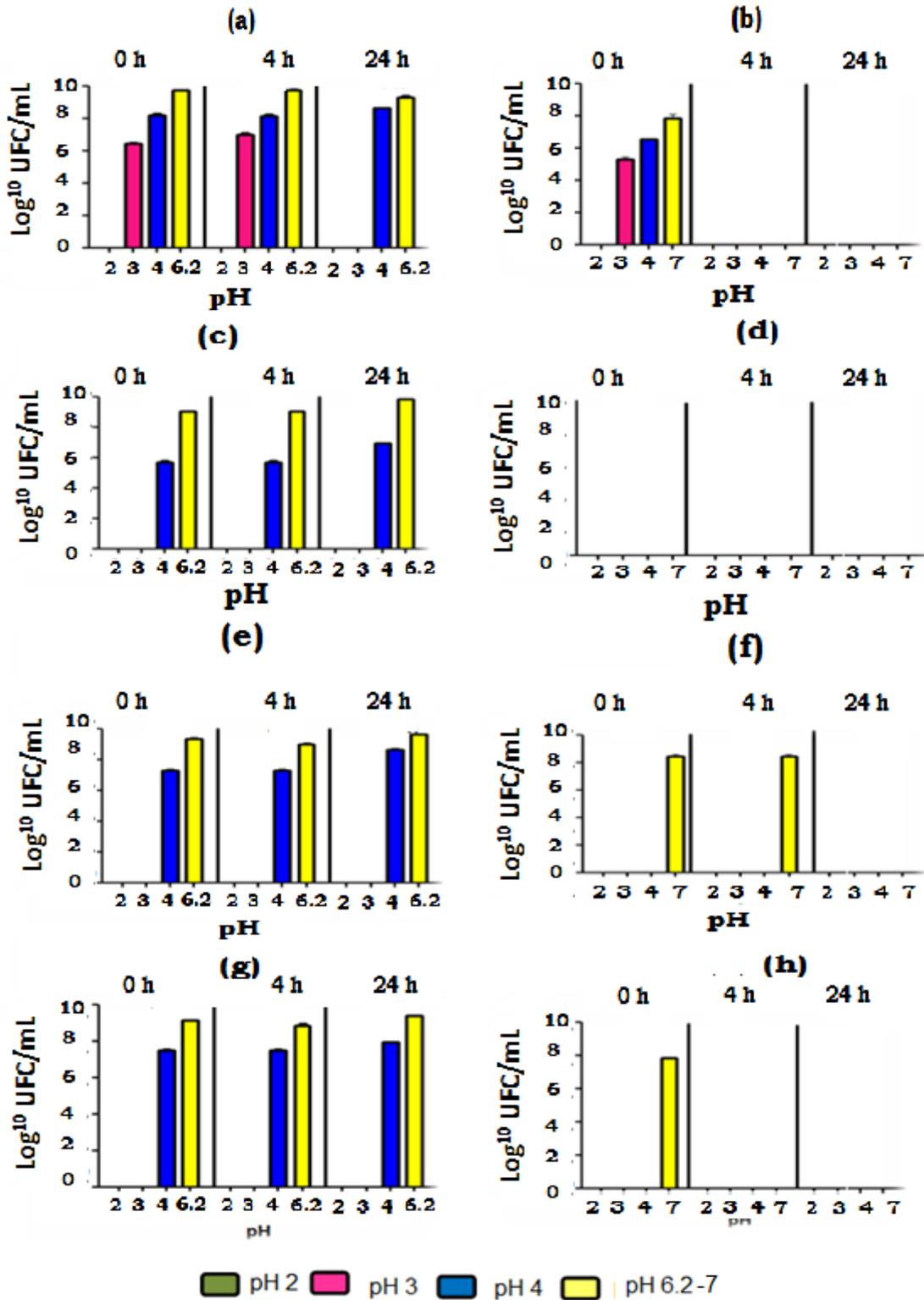


Grafico 3. Evaluación del crecimiento (a, c, e, g) y resistencia (b, d, f, h), de las cepas, B1-RO175, L. rha, L. jhon, y L. pla 4496, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.

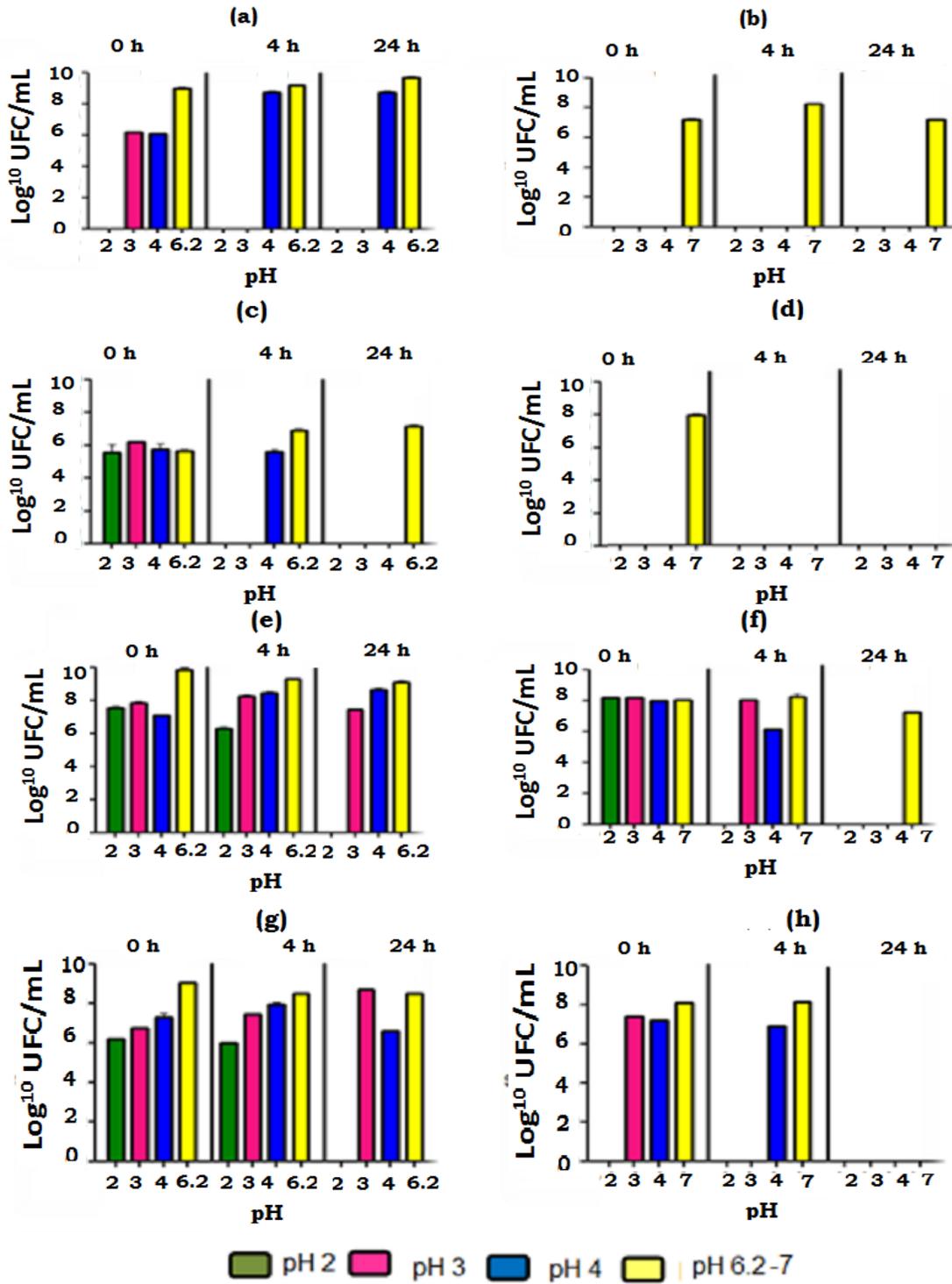


Grafico 4. Evaluación del crecimiento (a, c, e, g) y resistencia (b, d, f, h), de las cepas Lc-L3968, L. ferm2, Bb-2715 y Lc-12A, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.

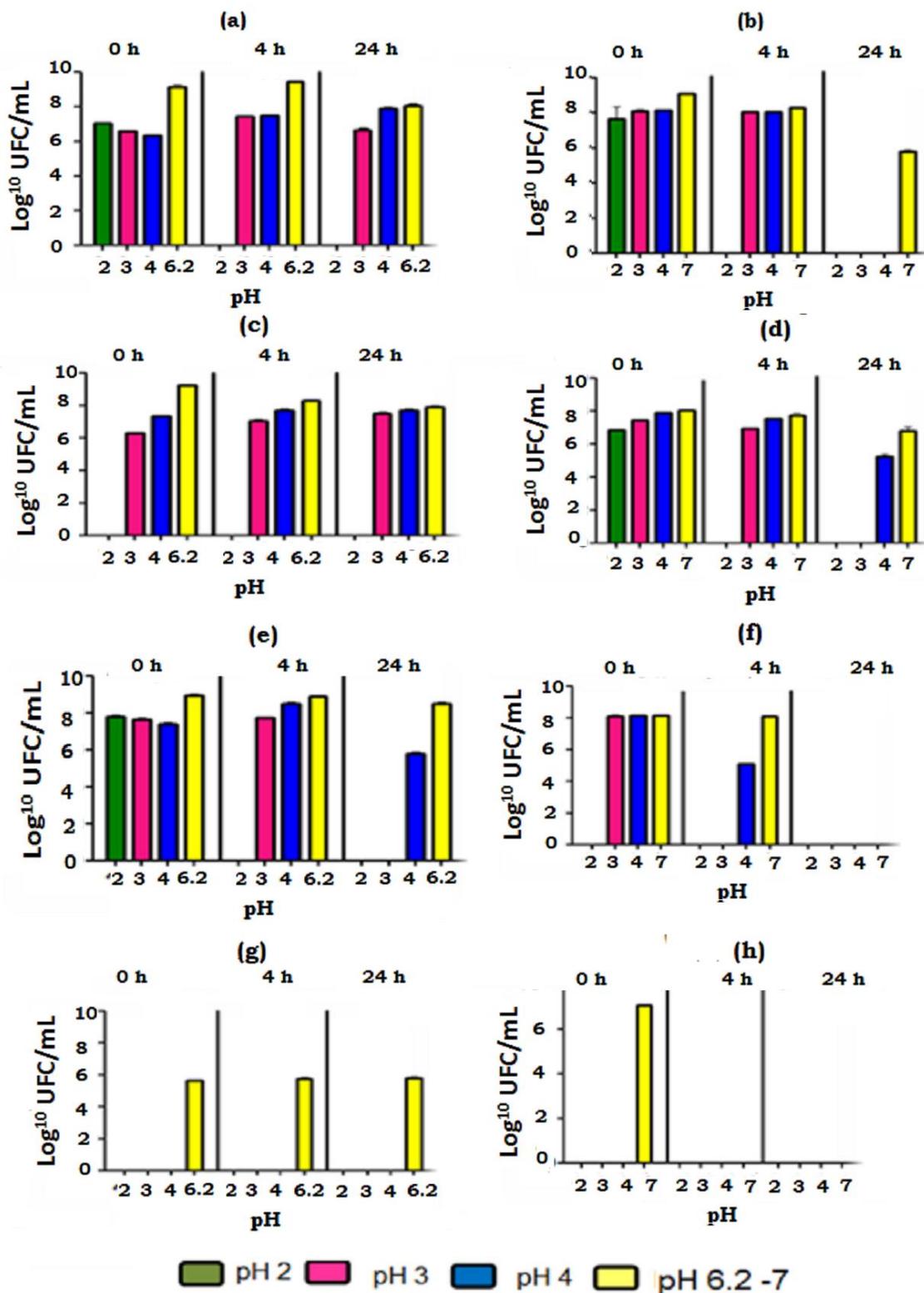


Grafico 5. Evaluación del crecimiento (a, c, e, g) y resistencia (b, d, f, h), de las cepas, Lc-CRL431, Lc-B1922, Lc-shi y L. rha 442, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.

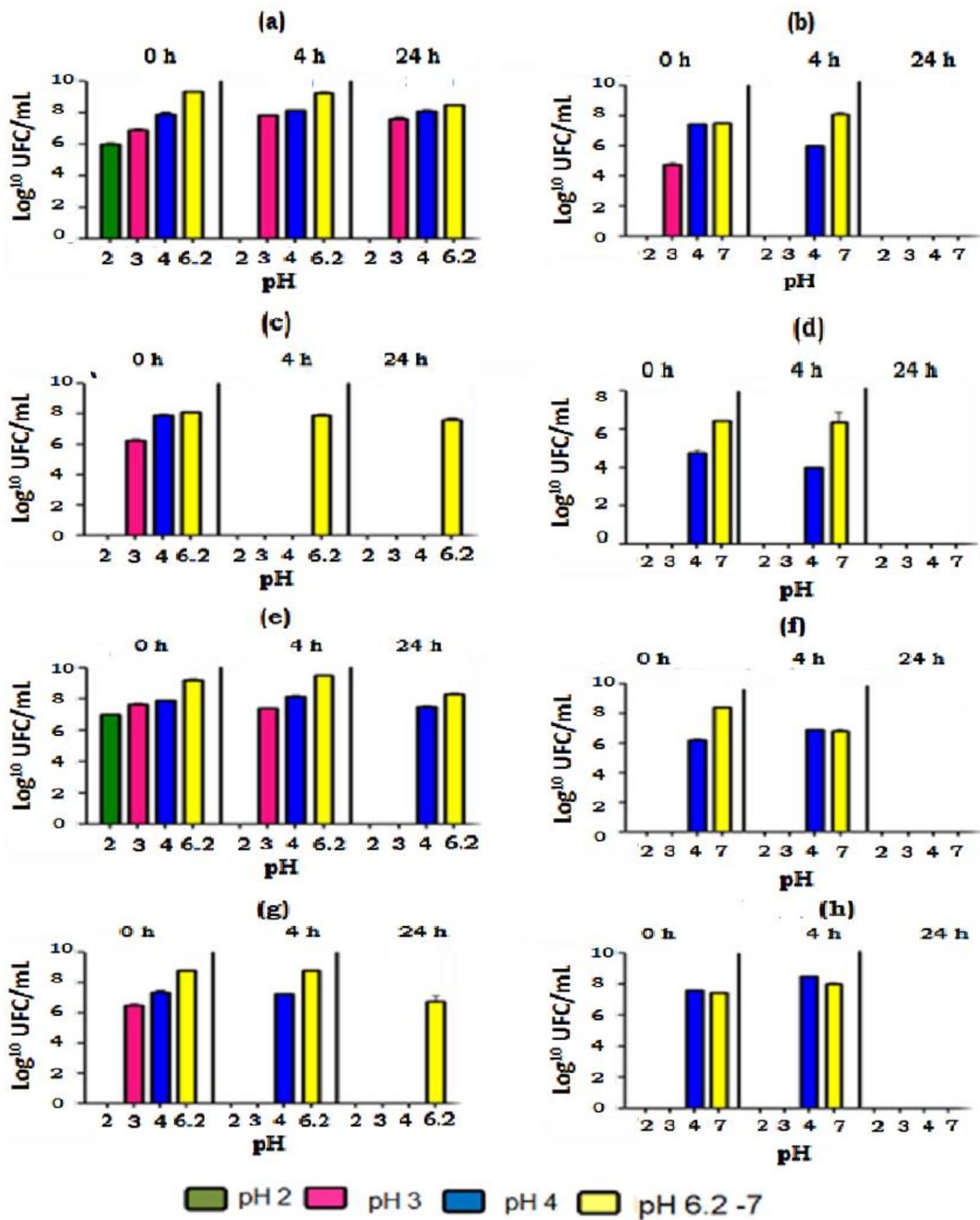


Grafico 6. Evaluación del crecimiento (a, c, e, g) y resistencia (b, d, f, h), de las cepas L. 30, La-B4495, L.ac y L. B1-B12, respectivamente, bajo diferentes valores de pH.

Como resultado de esta evaluación se revela que todas las cepas crecieron y resistieron de manera variable (Grafica 1-6). El 68 % de las cepas demostraron tener mayor capacidad de crecimiento y/o resistencia (arriba de 6 ciclos logarítmicos) a los valores de pH sometidos, es decir, las cepas se consideran tolerantes a condiciones acidas, propiedad deseable para cualquier cepa probiótica, característica que favorece su sobrevivencia durante los tratamientos tecnológicos y su paso a través del tracto gastrointestinal (FAO/OMS, 2002). Maragkoudakis *et al.* (2006) encontraron que la cepa *L. rhamnosus* ACA-DC 112 presentó un porcentaje de sobrevivencia del 80% cuando fue inoculado en medio de cultivo ajustado a pH 2, después de 2 h, del mismo modo Bao *et al.* (2010) reportó 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. Las cepas que cumplen con los criterios de la FAO/OMS no fueron consideradas para los posteriores ensayos ya que en este estudio se busca cepas que su capacidad de crecimiento se ha de bajo de 6 ciclos logarítmicos y sensibles a condiciones a pH bajos.

Las cepas *L. reuteri* NRRL 14171 (Grafica 2a-b), *B. longum* R0175, , *L. rhamnosus* ATCC 13075 , *L. plantarum* NRRLB-4496 (Grafico 3a-d, g-h) y *L. fermentum* NRRB-B1932 (Grafico 4c-d), revelaron tener capacidad de crecimiento a las 24 horas a pH 4-6.2, se cree que su sobrevivencia se debe a que fueron inoculadas en un medio de cultivo donde se encuentran nutrientes que ayudan a su sobrevivencia, aun con los pH ajustados a valores bajos, pero dichas cepas al ser inoculadas en diferentes soluciones amortiguadoras de fosfato salino (PBS, pH 2, 3, 4, 7), revelan que no presenta la capacidad de sobrevivir en ninguna de las condiciones sometidas. Se desconoce con exactitud la razón por la cual algunas bacterias son más sensibles a valores de pH bajo que otras. Se ha reportado que el pH del medio puede influir sobre la expresión de genes y regular el transporte de protones, la degradación de los aminoácidos, y la adaptación a condiciones acidas o básicas. Las células perciben los cambios del pH ambiente a través de diferentes mecanismos. La protonación y desprotonación de los aminoácidos inducida por el pH, puede alterar la estructura proteínica secundaria y por lo tanto

la función que señala el cambio. La célula puede responder sólo a una de las formas de las moléculas de señal. Por ejemplo, los ácidos orgánicos atraviesan la membrana citoplasmática solamente en la forma protonada y un aumento de la concentración intracelular indicaría un incremento en la acidez ambiental. El gradiente de protones a través de la membrana puede servir, por sí mismo, como un sensor para ajustar los procesos dependientes de la energía, cuando los mecanismos de cada cepa, para mantener el pH interno cuando se ven sobrepasados o no funcionan eficientemente, la viabilidad de la bacteria puede ser comprometida (Carrillo, 2003).

La cepa *L. rhamnosus* NRRL B-442 al igual que las cepas antes dichas demostró ser sensible a la presencia de condiciones acidas, como antes se menciono el comportamiento ante condiciones acidas es cepa-dependiente (Zhang *et al.*, 2012), se resalta esto por que dicha cepa mostro nula capacidad de resistir a los horarios de exposición a los diferentes pH evaluados tanto en la prueba de crecimiento y resistencia (Grafico 6g-h).

Por lo anterior de las 22 cepas probióticas evaluadas en cuanto su crecimiento y resistencia, en función de su sensibilidad, seis cepas (*L. fermentum* NRRB-B1932, *L. rhamnosus* ATCC 13075 y NRRL B-442, *L. reuteri* NRRL 14171, *B. longum* R0175 y *L. plantarum* NRRLB-4496) fueron pre-seleccionadas por su comportamiento a ser candidatas para microencapsularlas y probar su resistencia en condiciones gastrointestinales *invitro*.

7.2 Microencapsulación por método de emulsión

Los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo demostraron que no es factible microencapsular a todas las bacterias por este método, ya que algunas de ellas mostraron perdida de viabilidad durante etapas específicas del proceso (Grafico 7).

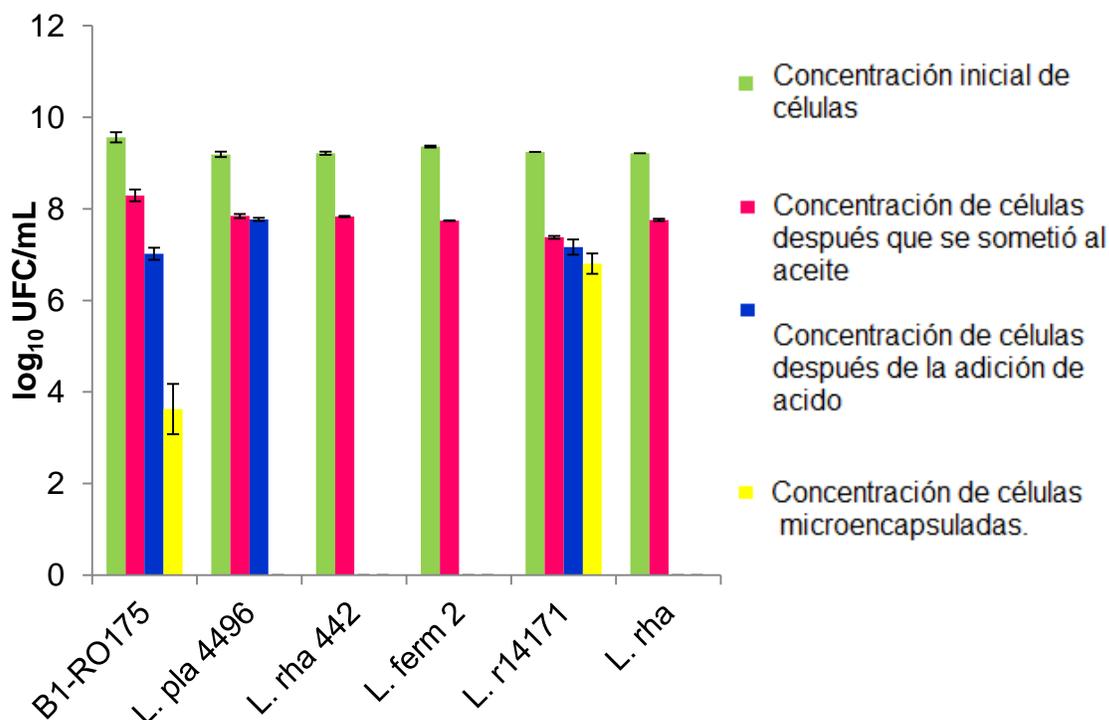


Grafico 7. Perdida de viabilidad de las bacterias probióticas durante el proceso de microencapsulación.

Se ha reportado que los reactivos y la serie de operaciones a las cual son sometidas las bacterias durante el proceso de microencapsulación pueden tener efectos adversos en la viabilidad celular de forma cepa-dependiente (Ramos *et al.*, 2013). En este respecto, Song *et al.* (2013) Realizaron un estudio sobre el efecto de la técnica de microencapsulación (emulsión/gelificación externa, emulsión/gelificación interna) sobre la viabilidad de células probióticas de levadura (Y235). Los resultados del estudio demostraron que ambas técnicas afectan la viabilidad celular; sin embargo, durante el proceso de cultivo celular, la técnica de emulsión/gelificación interna las microcápsulas presentaron mayor crecimiento celular y la menor pérdida de células. Se considera que el principal factor que provoca la pérdida de la viabilidad celular en la técnica de emulsión/gelificación interna, puede ser el uso del ácido acético ya que este baja el pH de la emulsión y afecta la pared de la célula bacteriana. Otros parámetros del proceso, tales como

velocidad de la agitación, la concentración del emulsificante, y la relación W/O, se considera que no tienen efecto sobre la viabilidad de las bacterias (Yuet *al.*, 2009).

Estos hallazgos coinciden con los resultados obtenidos en este estudio, donde se observó pérdida de la viabilidad de las cepas L. ferm2, L. rha, L. rha 442 y L. pla 4496 después de la adición de ácido acético (Grafico 7). La cepa L. r14171 y B1-RO175 fueron las dos únicas que mostraron recuentos después del paso de liberación de las microcápsulas, siendo la cepa L. r14171 aquella que presentó la menor pérdida de viabilidad (ca. 2 ciclos logarítmicos), manteniendo una concentración celular de L. r14171 dentro del rango sugerido (10^6 - 10^9 UFC/mL) para que pueda ejercer un efecto a la salud después de su administración (Talwalkaret *al.*, 2004). Es por ello que dicha cepa fue seleccionada para someterla en condiciones gastrointestinales *in vitro* libre y microencápsulada.

7.3 Sobrevivencia de *L. reuteri* NRRL 14171 libre y microencápsulada después de su paso por el Tracto Gastrointestinal (TGI) simulado.

A pesar de que solo se seleccionó a L. r14171 para el siguiente ensayo, también se evaluó el efecto de las condiciones del TGI sobre la viabilidad de las bacterias libres de L. ferm2, L. rha, L. rha 442 y L. pla 4496 (Grafico 8).

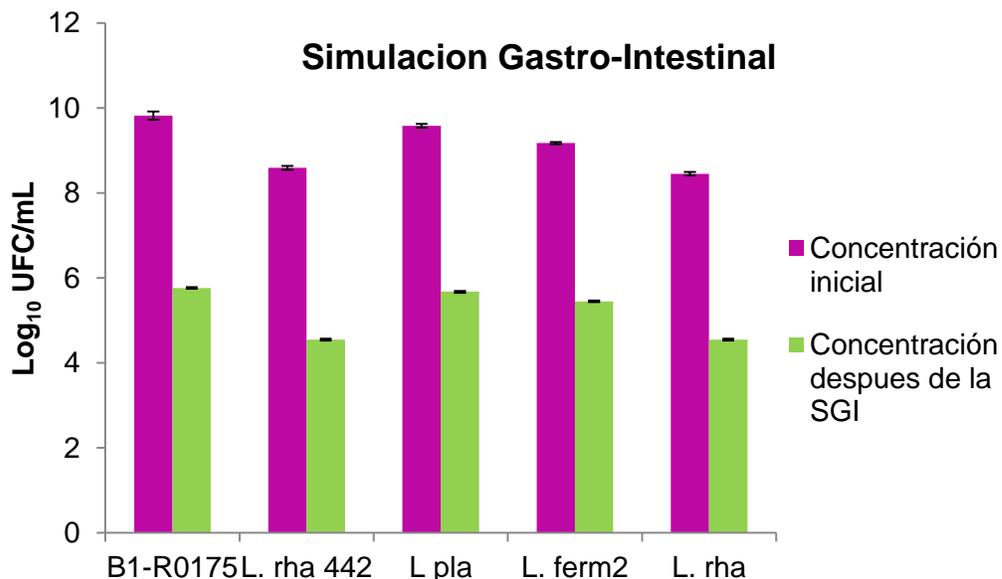


Grafico 8. Viabilidad de las bacterias libres después de haber sido sometidas al sistema gastrointestinal simulado.

Los datos obtenidos a partir del ensayo evidenciaron una disminución (4-4.7 ciclos logarítmicos) de la viabilidad de todas las cepas al final de su paso por el TGI. Estos resultados podrían estar asociados a factores como el tiempo de residencia bajo condiciones de baja acidez y a la presencia de las sales biliares. En este sentido, algunos reportes han indicado diferencias entre cepas respecto a su viabilidad en ambientes con estas condiciones (Le Vay, 1998). En un estudio realizado con 6 cepas de *L. rhamnosus* sometidas a condiciones gastrointestinales, se observó una reducción significativa en la concentración celular con respecto al número de bacterias al final del proceso digestivo. Los autores del estudio sugirieron que los factores principales que afectaron la viabilidad fue el pH inicial del estómago y su disminución durante el sistema digestivo (Pitino *et al.*, 2011). Adicionalmente, se ha reportado que la exposición a los ácidos biliares puede generar trastornos en la homeostasis celular, provocando la disociación de la bicapa de lípidos y las proteínas integrales de las membranas bacterianas, dando lugar a fugas del contenido citoplasmático, y en última instancia la muerte bacteriana. Como el estrés biliar tiene lugar después del estrés del pH, se ha postulado que estos factores tienen un efecto separado pero aditivo sobre la viabilidad de las bacterias (Sahadeva *et al.*, 2011).

Por otra parte, para determinar la posibilidad de que la cepa L.r14171, sobreviviera su paso a través del TGI después de su administración oral, las células libre y microencapsuladas fueron sometidas con una concentración inicial de 10^6 UFC/mL a un sistema gastrointestinal simulado. El porcentaje de pérdida de viabilidad se muestra en la Grafico 9. Se observó una disminución significativa ($p \leq 0.05$) cuando la bacteria fue sometida en forma libre (44.68%) que cuando fue sometida en forma microencapsulada (26.24 %).

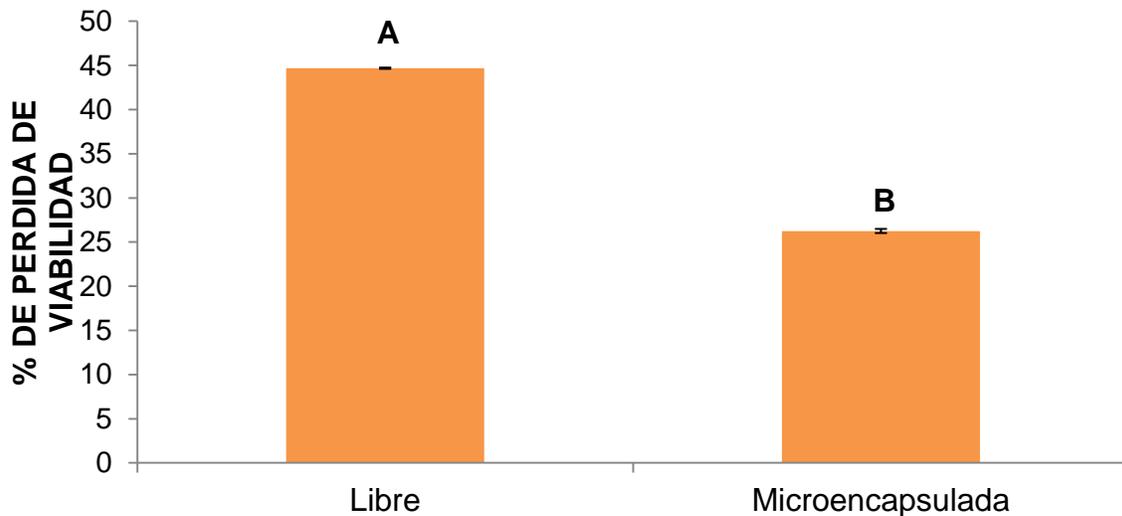


Grafico 9. Porcentaje de pérdida que exhibió *L.r14171* libre y microencápsulada sometidas a un sistema gastrointestinal simulado.

A pesar de que aun en el caso de las bacterias microencapsuladas se observó reducción de la viabilidad. Estas permanecieron viables en concentraciones de 10^6 UFC/mL, lo cual demostró que las bacterias fueron protegidas. El alginato, aunque es adecuado para la microencapsulación de bacterias por sus condiciones suaves de gelificación, éste es degradado por las condiciones de acidez presentes en el estómago, es por ello que se revistió con quitosano, ya que el quitosano es un polímero que presenta una rigidez alta dependiendo del sistema disolvente (Li et al., 2011). En este respecto existen estudios donde se ha demostrado la alta sobrevivencia de células cuando son revestidas con quitosano (Krasaekoopt *et al.*, 2004). En estudios realizados por Cook *et al.* (2011, 2012) se obtuvieron microcápsulas de alginato, las cuales fueron revestidas con quitosano (1%). Los resultados demostraron que se mejoró la viabilidad gastrointestinal de *Bifidobacterium breve* con niveles de supervivencia de varios órdenes de magnitud mayor que alginato solo.

La protección ejercida por las microesferas de alginato puede deberse a que el revestimiento de quitosano proporciona protección en solución de sales biliares

debido a una reacción de intercambio iónico que se lleva a cabo cuando las microesferas absorben las sales biliares. Por lo tanto, la difusión de éstas en las microesferas puede ser limitada (Chávarri et al., 2010).

Los cambios morfológicos que presentaron las microcápsulas después de su paso por el TGI simulado fueron registrados. Las imágenes (Figura 21) mostraron que aunque la integridad de las microcápsulas se vio comprometida, la viabilidad se mantuvo en valores aceptables lo que sugiere que las bacterias se encontraban inmersas en el centro de las capsulas más que en la zona superficial.

La morfología de las microcápsulas mostró la formación de grietas en la superficie de las microcápsulas las cuales pueden ser debido al estrés mecánico asociado al movimiento peristáltico simulado y a la consecuente penetración del medio de disolución en las microcápsulas originando la pérdida de estabilidad del polímero y liberación de las bacterias.

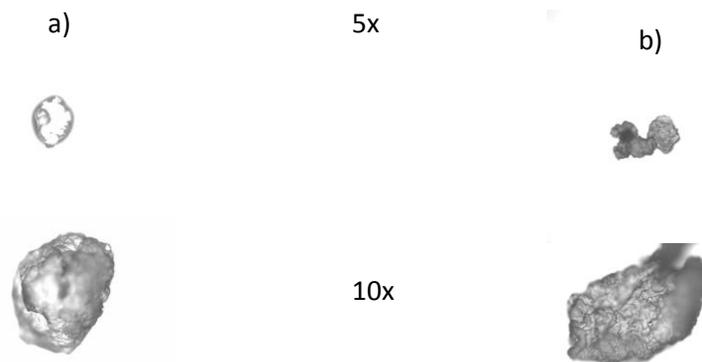


Figura 21. Cambios morfológicos de las microcápsulas antes (a) y después (b) de su paso por el sistema gastrointestinal simulado.

VIII. CONCLUSIÓN

Se concluye que las bacterias ácido lácticas probióticas evaluadas en este trabajo pueden ser afectadas de forma cepa-dependiente en su capacidad de crecimiento y de resistencia cuando son sometidas a condiciones de estrés prevalentes en el sistema gastrointestinal.

El efecto puede ser reducido mediante la microencapsulación con un sistema mixto de matrices poliméricas, aunque cabe señalar que este sistema no es apropiado para todas las cepas ya que algunas son sensibles a los componentes de microencapsulación.

La microencapsulación de emulsión/interna es un método que solo puede ser aplicado a cepas que no se han sensibles a los componentes utilizados durante el proceso, en lo específico por los resultados obtenidos en este trabajo la cepa L. r14171 se logro su encapsulación con alginato-quitosano exitosamente, demostrando su viabilidad durante el TGI y manteniendo al final de la trayectoria una concentración de 10^6 UFC/mL.

IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. **Amores, R., Calvo, A., Maestre J.R., Martínez D., 2004.** Probióticos. Revista Española Quimioterapia, 17(2), 131-139.
2. **Anal, A.K., Singh, H., 2007.** Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends Food Science and Technology, 18(5), 240–251.
3. **Burgain, J., Gaiani. C., Linder, M., Scher J., 2011.** Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. Journal of Food Engineering, 104(4), 467-483.
4. **Bao, 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.
5. **Careris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.k., 1998.** Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotics *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 84(5): 759-768.
6. **Carrillo, L., 2003.** Vida y muerte de los microorganismos, En: Microbiología agrícola. Cap. 2, Pp. 1-20
7. **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. Journal of Microbiological Methods, 56:27 35.
8. **Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F.C., Marzo, F., Villarán, M.C., 2010.** Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. International Journal of Food Microbiology, 142, 185-189.
9. **Cook M.T., Tzortzis, G., and Charalampopoulos. D., Khutoryanskiy. 2011.** Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. Biomacromolecules, 12: 2834-2840.

10. **Cook M.T., Tzortzis, G., and Charalampopoulos. D., Khutoryanskiy. 2012.** Microencapsulation of probiotic for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1), 56-67.
11. **Davis, S.S., Hardy, J. G., Fara, J.W., 1986.** Transit of pharmaceutical dosage forms through the small-intestine. *Gut*, 27:886–892
12. **Ding, W.R., Shah, N.P., 2007.** Acid, Bile, and Heat Tolerance of free and microencapsulated Probiotic Bacteria. *Journal of Food Science*, 72(9), 443-450.
13. **Escalante, A., 2001.** El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. *Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, AC*, 21(3) ,106-114.
14. **FAO/OMS, 2002.** Guadelines 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.
15. **FAO/WHO, 2006.** Probiotics in food. Health and Nutritional Properties and Guide Lines for Evaluation. In: *FAO food and Nutrition Paper 85* Roma, 2006.
16. **Fernandez, M. R., Boris, S., Barbe, C., 2003.** Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3): 449-455.
17. **Ferrer, B., Dalmau, J., 2001.** Alimentos Funcionales probióticos. *Acta Pediátrica Española*, 59, 150-155.
18. **Fordtran, J.H., Walsh, 2012.** Gastric-acid secretion rate and buffer content of stomach after eating-results in normal subjects and in patients with duodenal-ulcer. *Journal Clinical Investigation*, 52:643-657.
19. **Furtado, M.E., Mota, R.A., Lago, V.E., Stringheta, P.C., Pinto, O.C. Martins. 2013.** *Food Research International*. 51(2): 764-770.
20. **Gil, A., 2010.** Tratado de Nutrición. EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA, 1(2), 184-200.
21. **González, B.K., Gómez, M., Jiménez Z., 2003.** Bacteriocinas de probióticos. *Revista de salud Pública y Nutrición*.4 (2), 50-56.

22. **Goh, C.H., Heng, P.W., Chan, L.W., 2012.** Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*. 88, 1-12.
23. **Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, Gill, H.S., 2001.** In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacteriumlactis* DR10 strains and their antagonist activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3):207-216.
24. **Hernandez-Mendoza, A., Guzman-de-Peña, D., y Garcia, H.S. 2009.** Key role of teichoic acids on aflatoxin B1 binding by probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 395-403.
25. **Jesen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson, L., 2012.** *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 216-222.
26. **Kailasapathy, K., Sultana, K., 2003.** Survival and b-D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteriumlactis* in ice-cream. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58 (3), 223–227.
27. **Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., 2003.** Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13:3-3.
28. **Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., 2004.** The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivalbility of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14: 737-743.
29. **Kanmani, P., Kumar, R.S., Yuvaraj, N., Paari, V. Pattukumar, Venkatesan A., 2011.** Cryopreservation and microencapsulation of a probiotic in alginate chitosan capsules Improves Survival in simulated gastrointestinal conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16, 1106-1114.
30. **Le Vay, D., 1998.** 13 Digestions. *Human Anatomy Physiology*, third ed. Hodder & Stoughton, Sevenoaks, Kent, pp. 231e233.
31. **Latarjet, M., Ruiz liard, A., 2008.** Anatomía humana. EDITORIAL PANAMERICANA S.A. 4(2) 103-1084.

32. **Martin, M.J., Morales M.E., Gallardo, V., Ruiz M.A., 2009.** Técnica de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*, 5(1), 43-50.
33. **Maragkoudakis, A., Zoumpopoulou, G., Miarisa, C., Kalantzopoulou, G., Potb, B., Tsakalidou, F., 2006.** Probiotic potential of *Lactobacillus strains* isolated from dairy products, *International Dairy Journal*, 16(3) 189-199.
34. **McConnell E.L., Fadda, H.M., Basit, A.W., 2008.** Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery, *International Journal. Pharm.*, 364:213–226.
35. **Mortazavian, A., Razavi, S.H., Ehsani, M.R., Sohrabvandi., 2007.** Principales and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(1), 1-14.
36. **Moyano, S.R., Martin, A., Benito, M.J., Nevado, F.P., Córdoba, M.G., 2008.** Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *MeatScience*, 80:715-721.
37. **Mortazavian, A.M., Azizi, A., Ehsani, M.R., Razavi, S.H., Mousavi, S.M., Sohrabvandi, S., Reinheimer, J.A., 2008.** Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft*, 63 (4), 427–429.
38. **Marquina, D., Santos A., 2005.** Probióticos, Prebióticos y Salud. *Microbiología Internacional*, 1(1): 32-36.
39. **Minelli, E.B., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario, R., Hendriks, H., Delgado, F., 2004.** Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal* 14: 723-736.
40. **Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A., Orlando P., 2009.** Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal condition. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 319-32.
41. **Nomoto, K., 2005.** Prevention of Infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(6), 583-592.
42. **Ramos, C.M.G., Hernández, G.L.E., Fernández, M.S.G, Froto, M.M.L., Vázquez, M.L, 2013.** Estrategias para mejorar la sobrevivencia de probióticos en helados. *Biotecnia*, 15(2), 31-38.

43. **Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., De Dea, P., Pecorini, C. Pirani, S., Rebucci, R., Savoini, G., Stella, S., Stenico, A., Tirloni, E., 2011.** Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe*, 17: 97-105.
44. **Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K.H., Tan, C.H., Chan, H.Y. Tong, E.V., Wong, S.Y.W, Chan, H.K., 2011.** Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*, 18(4), 1515-1522.
45. **Settanni, L., Moschetti, G., 2010.** Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691-697.
46. **Shah, N. P., Ravula, R. R., 2000.** Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55(3), 139–144.
47. **Shu, Q., Zhou, J.S., Rutherford, K.J., Birtles, M.J., Prasad, J., Gopal, P.K., Gill, H.S., 1999.** Probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* HN017, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019) have no adverse effects on the health of mice. *International Dairy Journal*, 9(11), 831-836.
48. **Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., Ma, X., 2013.** Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled whit internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers*, 96,181-189.
49. **Paluo, A., Serra, F., 2000.** Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. *Alim. Nutri. Salud*, 7(3), 76-90.
50. **Pérez, G. N., Fajardo, B. P., Mendez, J., Cachaldora, P., Pastrana C.L., 2007.** Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 134(1-2), 89-107.
51. **Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R., 2007.** The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, 15(12), 546-553.
52. **Picot, A., Lacroix, C., 2004.** Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in stimulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal* 14 (6), 505–515.

53. **Pitino, L., Randazzo, C.L., Mandalari, G., Lo Curto, A., Faulks, R.M., Le Marc, Y., Bisignano, C., Caggia, C., Wickham, M.S.J, 2010.** Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiology*, 27(8), 1121-1127.
54. **Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J.P., Neufeld, R.J., Fournier, A., 1992.** Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 38:39-45.
55. **Talwalkar, A.I. y Kailasapathy, K.A., 2003.** Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58:36-39.
56. **Viseljevic T. Shah, N.P., 2008.** Probiotics- from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18:714-728.
57. **Yu, W.T., Lin, J.Z., Liu, X.D., Ma, X, J., 2009.** Preparation of microcapsules for immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* by emulsification-internal gelation technology. *CIESC Journal*, 60:710-717.
58. **Yu, W.T., Lin, J.Z., Liu, X, D., Xie, H.G., Zhao, W., Ma, X.J., 2010.** Quantitative characterization of membrane formation process of alginate-chitosan microcapsules by GPC. *Journal of Membrane Science*, 346: 296-301.
59. **Zhang, J., Chongde, W., Guocheng, D., Chen, J., 2012.** Enhanced acid tolerance in *Lactobacillus casei* by adaptive evolution and compared stress responded during acid stress. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17:283-289.

