

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Línea de Investigación:

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE FORMAS  
FARMACÉUTICAS

**“Microencapsulación de *L. acidophilus* LA-5 por un método de emulsificación”**

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Farmacéuticas presenta

QFB. Rogelio Olivarez Romero

Conformación del Comité Tutorial:

Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinoza

Dr. Abraham Faustino Vega

Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón

JUNIO 2017

**Vo. Bo. COMITÉ TUTORAL**

\_\_\_\_\_  
**Cotutor:** Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinoza

\_\_\_\_\_  
**Cotutor:** Dr. Abraham Faustino Vega

\_\_\_\_\_  
**Asesor:** Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón

\_\_\_\_\_  
Q.F.B. Rogelio Olivarez Romero  
2151801993

## **Jurado de Examen de grado**

---

Dr. José Juan Escobar Chávez  
**Presidente**

---

Dr. Raquel González Vázquez  
**Vocal**

---

Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón  
**Secretario**

---

Q.F.B. Rogelio Olivarez Romero  
2151801993

## Resumen

Las bacterias probióticas presentan influencia en la salud del hospedero cuando son consumidas en cantidades adecuadas por lo que se han llegado a utilizar como coadyuvante en diferentes padecimientos como son algunos tipos de diarreas, el síndrome del intestino irritable, entre otros. Sin embargo, la mayoría de células probióticas presentan la dificultad para sobrevivir en condiciones del pH ácido del estómago. Una forma de minimizar este problema es la encapsulación de las células probióticas, entendiéndose por encapsulación como el proceso mediante el cual las células son inmovilizadas dentro de un material polimérico con la finalidad de dar protección y permitir una adecuada liberación en el sitio de acción. Existen diferentes métodos de encapsulación de células probióticas como son la extrusión, emulsión y lecho fluido, que dependiendo del método elegido el tamaño promedio de las partículas puede variar logrando obtener desde el orden de micras hasta milímetros. Se ha mencionado en algunas investigaciones que el tamaño de partícula influye en la protección de las células probióticas, así como en algunas propiedades sensoriales importantes para las industrias productoras de alimentos. Por lo que para inmovilizar probióticos con un tamaño de partícula del orden de micras el método de emulsificación es uno de los más utilizados, así como el alginato de sodio es el material polimérico que con mayor frecuencia es usado, por su biocompatibilidad, bajo costo y fácil manejo.

El objetivo de este trabajo fue incrementar la sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cuando se expone de manera secuencial al estrés del tracto gastrointestinal simulado, utilizando la microencapsulación realizada por el método de emulsificación y gelación externa. La emulsión agua en aceite (W/O 32:68), consistió de alginato de sodio al 4% como fase acuosa y aceite mineral con span 80 al 1% como fase oleosa. Las condiciones de fabricación de las micropartículas fueron 250 rpm a 20 °C durante 30 minutos. La sobrevivencia relativa de los microorganismos no encapsulados no fue detectable al final de las condiciones de estrés. En contraste a pesar de la desintegración de las micropartículas inducida por el estrés, la sobrevivencia relativa de *L. acidophilus* LA-5 fue del 46.9%. Las

micropartículas generadas tuvieron la capacidad de proteger y liberar las células probióticas, ofreciendo un adecuado uso como agentes protectores para probióticos sensibles al estrés gastrointestinal, y teniendo aplicaciones en la industria alimenticia y farmacéutica.

## **Agradecimientos institucionales**

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero mediante una beca que me fue otorgada con el número de registro 426574, la cual me permitió desarrollar mis estudios en la Maestría en Ciencias Farmacéuticas.

Un agradecimiento especial al Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada así como al Laboratorio de Biotecnología pertenecientes a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, por el apoyo para realizar la parte experimental del presente trabajo.

## **Agradecimientos personales**

**A Dios** por darme la sabiduría, salud y fortaleza para cumplir con una de mis metas personales y profesionales.

### **A mi familia:**

A mi esposa Jeannette por impulsarme a retomar mis estudios, a pesar de las condiciones adversas por las que estábamos pasando. A mis hijos por donarme un poco de su tiempo.

A mis padres y hermanos por siempre estar cuando más los necesito.

Aurora, Epifanía y Josué por su presencia en mi vida durante este reto.

### **A mis amigos**

Antonio, Alfonso, Gustavo, Jesús, Vanesa, Abraham, Rosa, Doris, Aarón, Eric, Xochitl, Javier, César por su amistad.

### **A mis tutores y asesores**

Al Dr. Alejandro Alberto Azaola por darme la oportunidad de trabajar con usted y mostrarme a través de sus comentarios siempre objetivos más de mí.

Al Dr. Abraham Faustino Vega por bríndame su confianza y conocimientos, así como por las pláticas y discusiones para la mejor comprensión del tema.

Al Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón gracias por enseñarme a ser una persona más abierta al conocimiento.

A la Dra. Raquel González Vázquez por todo el apoyo para que este trabajo saliera a flote.

Al Dr. Martin por su apoyo.

### **A los miembros del Jurado**

Por su tiempo dedicado en la revisión y sus aportaciones para la mejora del trabajo.

## Índice

1.0	Introducción.....	1
2.0	Antecedentes.....	3
3.0	Marco teórico.....	5
3.1	Definición de probióticos .....	5
3.2	Características de los probióticos.....	5
3.2.1	Identificación taxonómica.....	6
3.2.2	Toxicidad .....	6
3.2.3	Resistencia de los probióticos durante su tránsito por el tracto gastrointestinal.....	6
3.2.4	Beneficios de los probióticos .....	8
3.2.5	Propiedades de uso tecnológicas .....	10
3.3	Método de protección de los microorganismos probióticos.....	11
3.3.1	Biomateriales .....	12
3.3.2	Alginato de sodio .....	14
3.3.3	Métodos de formación de micropartículas .....	15
3.3.4	Encapsulación por emulsificación.....	16
3.3.5	Encapsulación por extrusión.....	18
3.4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 .....	19
3.4.1	Viabilidad de <i>L. acidophilus</i> después de pasar por el tracto gastrointestinal.....	19
3.5	Diseño de experimentos.....	20
4.0	Planteamiento del problema.....	22
5.0	Hipótesis.....	23
6.0	Objetivo general .....	24
6.1	Objetivos específicos .....	24
7.0	Materiales y métodos .....	25
7.1	Materiales.....	25
7.2	Métodos .....	25
7.2.1	Fluidos gastrointestinales simulados .....	25

7.2.2	Generación de biomasa de <i>L. acidophilus</i> LA-5 .....	25
7.2.3	Análisis exploratorio para la producción de micropartículas .....	26
7.2.4	Optimización de las condiciones de mezclado para la formación de micropartículas .....	28
7.2.5	Formación de las micropartículas por emulsificación .....	29
7.2.6	Determinación del tamaño y morfología de las micropartículas.....	29
7.2.7	Efecto de FSS, FGS y FIS sobre células de <i>L. acidophilus</i> LA-5 encapsuladas y libres .....	30
7.2.8	Análisis estadístico .....	31
8.0	Resultados y discusión.....	32
8.2.2	Generación de biomasa de <i>L. acidophilus</i> LA-5 .....	32
8.2.3	Análisis exploratorio para la producción de micropartículas .....	32
8.2.4	Optimización de las condiciones de mezclado para la formación de micropartículas .....	34
8.2.5	Formación de las micropartículas por emulsificación .....	37
8.2.6	Efecto de FSS, FGS y FIS sobre células de <i>L. acidophilus</i> LA-5 libres .....	38
8.2.7	Efecto del FSS, FGS y FIS en <i>L. acidophilus</i> LA-5 microencapsulado.. ..	39
9.0	Conclusión.....	44
10.0	Referencias .....	45
Anexo 1	.....	50

## 1.0 Introducción

Actualmente los probióticos son comercializados a través de alimentos, suplementos alimenticios y medicamentos (Guarner *et al.*, 2011; Bhadoria & Mahapatra., 2011). Para que un probiótico ejerza un efecto benéfico sobre el hospedero, al menos  $10^8$  UFC/mL o gramo deben estar presentes en el producto alimenticio para que después de su consumo, sean liberadas en el sitio de acción entre  $10^7$  a  $10^8$  UFC/mL (Chopde *et al.*, 2014). Cuando los probióticos son ingeridos se enfrentan a las condiciones de estrés del tracto gastrointestinal el cual afecta negativamente el número de células viables consumidas por lo que los procesos de encapsulación y microencapsulación de probióticos son herramientas utilizadas para protegerlos de dicho estrés, además de conseguir que un gran número de células viables lleguen al sitio de acción (Gbassi & Vandamme., 2012).

Algunos métodos que se utilizan para microencapsular células probióticas son la extrusión, emulsificación, secado por aspersión, lecho fluido, liofilización y coacervación compleja (Rokka & Rantamäki., 2010; Gerez *et al.*, 2012). La extrusión y emulsificación son los métodos que más se han reportado para la protección de probióticos (Trabelsi *et al.*, 2013). Ambos métodos están basados en la inmovilización de microorganismos dentro de materiales biocompatibles (Gbassi & Vandamme., 2012) como por ejemplo el alginato de calcio, que es frecuentemente utilizado por su fácil manejo, bajo costo y no toxicidad, características que lo hacen apropiado para usarse como aditivo en alimentos (Li *et al.*, 2009; Trabelsi *et al.*, 2013). La microencapsulación por emulsión permite producir partículas menores a  $1000\ \mu\text{m}$ , lo que permite incorporarlas en alimentos sin afectar su textura o propiedades organolépticas, y que es considerado una ventaja (Hansen *et al.*, 2002). Durante el proceso de microencapsulación por emulsificación, alguna de las variables importantes que pueden influir en el tamaño de partícula y la capacidad de carga son la viscosidad; velocidad, tiempo y la temperatura de mezclado (Silva *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008) que a su vez son parámetros importantes para asegurar que las células probióticas viables

sobrevivan al estrés gastrointestinal y así alcancen el sitio de acción (Chandramouli *et al.*, 2004; Mandal *et al.*, 2006; Smilkov *et al.*, 2014).

*Lactobacillus acidophilus* LA-5 es una bacteria probiótica ampliamente utilizada debido a que puede inhibir la multiplicación de *C. difficile* en modelos *in vitro*; además *in vivo* participa en la modulación del equilibrio de la microbiota intestinal cuando ha habido disbiosis (Nord *et al.*, 1997). Sin embargo, este probiótico presenta una capacidad limitada para sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal. Gebara *et al.* (2013) observaron una disminución de 6 órdenes logarítmicos en la viabilidad del microorganismo después de ser expuesto a una disolución de jugo gástrico simulado (pH 1.2) durante 1 h y también observaron una disminución de 5 órdenes logarítmicos después de ser incubada en disolución de jugo intestinal simulado (pH 7) durante 5 h.

En este contexto, para contribuir con soluciones tecnológicas en el desarrollo de sistemas innovadores para la microencapsulación y la adecuada sobrevivencia de células probióticas, el presente trabajo, tuvo como objetivo incrementar la sobrevivencia relativa de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cuando fue expuesto al estrés del tracto gastrointestinal simulado de manera continua o secuencial (saliva simulada, jugo gástrico simulado y jugo intestinal simulado) en micropartículas preparadas por el método de emulsificación y gelación externa, manteniendo controlada la velocidad, el tiempo y la temperatura de mezclado.

## 2.0 Antecedentes

Durante mucho tiempo se ha documentado que el consumo de ciertas bacterias a través de productos alimenticios o suplementos y que pueden colonizar el intestino o ser transitorias, pueden tener una influencia positiva en la salud y el bienestar del huésped mediante la interacción de éstos con los microorganismos del tracto gastrointestinal y con el sistema inmunológico (Johnson & Klaenhammer., 2014) ofreciendo diversos beneficios que están relacionados con sus funciones metabólicas tróficas y de protección (Guarner & Malagelada., 2003). Es por ello, que el estudio de los microorganismos con características probióticas se ha incrementado en los últimos años, un ejemplo de lo anterior es que entre el 2001 y el 2005 se publicaron cuatro veces más ensayos clínicos en humanos comparado con el periodo de 1996 a 2000, (Guarner *et al.*, 2011). De hecho, un análisis reciente del mercado global de probióticos reveló un crecimiento anual del 7% durante el año fiscal del 2012, con una previsión de \$ 48 mil millones en ganancias hasta el 2017 (Johnson & Klaenhammer., 2014).

Con el propósito de mantener la viabilidad de los probióticos una vez que éstos son consumidos, se han utilizado diferentes métodos de inmovilización de bacterias probióticas para protegerlas del estrés gastrointestinal, permitiendo que las células lleguen viables al sitio de acción (Gbassi y Vandamme., 2012) además de protegerlas de dicho estrés deben ser protegidas de las condiciones de almacenamiento (Chopde *et al.*, 2014) lo que permitirá incrementar el tiempo de vida media del probiótico debido a la función de barrera que ofrece la inmovilización. La microencapsulación por el método de emulsificación y gelación interna permite generar micropartículas de tamaño menor a 1000  $\mu\text{m}$  (Hansen *et al.*, 2002). Los polímeros utilizados para dicho efecto pueden ser diversos, un ejemplo de estos es el alginato el cual es de los más utilizados debido a sus características de no toxicidad, bajo costo y fácil manejo (Gbassi *et al.*, 2012), además de estas características se debe tener en cuenta los posibles beneficios funcionales que dependan de las sustancias utilizadas como agentes inmovilizantes. Algunos efectos esperados pueden no reproducirse al utilizar un

polímero inadecuado, por ejemplo, la elección de un polímero puede impactar en la disminución de la viabilidad de la cepa probiótica (Guarner *et al.*, 2011).

A continuación, mencionamos algunos ejemplos de inmovilización que anteceden a lo realizado en el presente trabajo: Hansen *et al.* (2002) Inmovilizaron *Bifidobacterias*, utilizando el método de emulsificación y gelación interna con alginato de sodio al 1 y al 2 % para generar micropartículas de 20 y 70  $\mu\text{m}$  respectivamente, utilizando aceite vegetal y tween 80 con una agitación magnética de 300 rpm durante 20 min para formar la emulsión y para la gelación se adicionaron 32 mL de  $\text{CaCl}_2$  62.5 mM. En este trabajo no se encontró diferencia significativa entre las células libres y las inmovilizadas cuando fueron sometidas a jugo gástrico simulado durante 2 h a pH 2 y 37 °C.

Por otra parte, Mandal *et al.* (2006) reportaron un estudio de tolerancia de *L. casei* NCDC-298 encapsulado utilizando el método de emulsificación y gelación externa. Las micropartículas se elaboraron con diferentes concentraciones de alginato (2%, 3% y 4%) con aceite de soya como fase oleosa y  $\text{CaCl}_2$  0.1M para gelificar. Posteriormente probaron la viabilidad de las células inmovilizadas o encapsuladas a pH de 1.5. Las micropartículas formadas con alginato de sodio al 4% confirieron mayor protección al probiótico con una sobrevivencia del 4.6% después de pasar por el medio ácido.

Smilkov *et al.* (2014) microencapsularon el probiótico *L. casei* 01 utilizaron el método de emulsificación y gelación externa en el cual las micropartículas se elaboraron con alginato de sodio al 4% y fueron recubiertas con proteína de suero de leche, posteriormente fue evaluada su capacidad para resistir el estrés gastrointestinal utilizando una solución simulada de fluido gástrico simulado a pH 1.5, y obtuvieron una viabilidad del 22.4%.

Gebara *et al.* (2013), evaluaron la viabilidad de *L. acidophilus* LA-5 inmovilizadas con pectina y recubiertas con proteína de suero de leche utilizando el método de gelación ionotrópica. Las micropartículas fueron tamizadas para tener un tamaño de partícula de aproximadamente 125  $\mu\text{m}$ . Las micropartículas fueron sometidas al

estrés simulado del tracto gastrointestinal utilizando una solución de jugo gástrico a pH 3 durante 2 h y otra de jugo intestinal simulado a pH 7 durante 3 h. Se obtuvo un rendimiento de encapsulación del 84.35% y cuando dichas micropartículas fueron expuestas a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, se observó una viabilidad de las células probióticas encapsuladas del 3.1% comparado con las células libres que fue del 0.03%, lo que indicó que el recubrimiento proteico no tuvo algún efecto protector. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue microencapsular la cepa *L. acidophilus* LA-5 por la técnica de gelificación interna utilizando alginato para la formación de las micropartículas.

### **3.0 Marco teórico**

#### **3.1 Definición de probióticos**

Los probióticos son organismos vivos que cuando son administrados en dosis adecuadas producen efectos benéficos para la salud del hospedero. La dosis recomendada mínima es de  $1 \times 10^6$  UFC/mL pero dependerá de especie del microorganismo (Trabelsi *et al.*, 2013; Smilkov *et al.*, 2014).

#### **3.2 Características de los probióticos**

Los microorganismos probióticos deben presentar ciertas características para ser considerados como tal. Entre dichas características se encuentran ser identificados taxonómicamente (Johnson & Klaenhammer., 2014); no presentar toxicidad para el consumidor (Lee *et al.*, 2004); presentar resistencia al estrés del tracto gastrointestinal (Johnson & Klaenhammer., 2014; Consulta de Expertos, F.A.O., 2006); ofrecer un efecto benéfico para la salud (Consulta de Expertos, F.A.O., 2006) y tener propiedades tecnológicas (Gbassi & Vandamme., 2012). Otras características que pueden presentar son baja resistencia a los antibióticos (Consulta de Expertos, F.A.O., 2006), capacidad de adherencia e inhibición de microorganismos patógenos (Johnson & Klaenhammer., 2014).

### **3.2.1 Identificación taxonómica**

La identificación molecular de un microorganismo con potencial probiótico es de suma importancia ya que cuando se adscribe un efecto probiótico a una cepa, no se puede extrapolar esa propiedad a otras cepas de la misma especie. Incluso la adscripción de un efecto probiótico a una cepa depende de las condiciones de su empleo y, muy particularmente, de la dosis (González Vázquez, 2014)

### **3.2.2 Toxicidad**

Dada la prevalencia de los *Lactobacillus* en los alimentos fermentados y su carácter de colonizadores normales del cuerpo humano, además del bajo nivel de infección que se les atribuye, la seguridad de estos microorganismos ha sido revisada y se considera que su potencial patogénico es bajo (Guarner *et al.*, 2011) además son considerados como seguros (GRAS). Sin embargo, es necesario y esencial llevar a cabo ensayos de seguridad en cepas nuevas con la intención de ser adicionados en alimentos o suplementos alimenticios (Jia *et al.*, 2011).

### **3.2.3 Resistencia de los probióticos durante su tránsito por el tracto gastrointestinal**

Cuando se administran sustancias bioactivas sensibles a los ácidos por vía oral a menudo hay problemas asociados con el pH bajo del estómago que afecta negativamente su administración. Ejemplos de tales sustancias bioactivas se incluyen fármacos lábiles al medio ácido, tales como penicilina G, antígenos o microorganismos (Cook *et al.*, 2013).

Uno de los requisitos que los microorganismos probióticos deben cumplir es resistir el estrés del tracto gastrointestinal ya que cuando son consumidos primero se enfrentan al pH de la saliva, que puede estar en el rango de 5 a 6.9 (Hollebeeck *et al.*, 2013), y a la presencia de enzimas como la lisozima, posteriormente pasan rápidamente a través del esófago tomando alrededor de 10-14 s para llegar al

estómago, lugar donde se espera la mayor pérdida de viabilidad de bacterias debido al pH ácido el cual depende de factores como el tiempo transcurrido del consumo de alimentos y la edad. Se ha informado que los valores de pH del estómago se encuentran dentro de un intervalo de entre 1-2.5 en condiciones de ayuno, pero incrementa con el consumo de alimentos en un intervalo de 3-5. Además en el estómago también hay presencia de enzimas como la pepsina que se encarga de descomponer las proteínas de los alimentos. El tiempo de vaciado gástrico también es muy variable, entre 5 min y 2 horas; sin embargo, el tiempo medio de vaciado gástrico se ha estimado utilizando pruebas de aliento de  $C^{13}$  ser alrededor de 80.5 min. Por lo tanto los microorganismos probióticos tienen que enfrentar la condición ácida del estómago y la presencia de enzimas durante al menos este periodo de tiempo (Cook *et al.*, 2012).

Después del paso a través del estómago, los probióticos entrarán en el intestino delgado en el cual el pH está en el intervalo de pH de 6.15 a 7.35 en la región proximal, aumentando a pH entre 6.80 a 7.88 en el intestino delgado distal (Cook *et al.*, 2012). Otros factores que pueden afectar la viabilidad de los microorganismos en el intestino delgado son las sales biliares las cuales en el cuerpo humano se encargan de emulsificar las grasas durante el proceso de la digestión para llevar a cabo su absorción, por lo que pueden utilizar los ácidos grasos de la membrana celular de las bacterias afectando la fluidez, permeabilidad, hidrofobicidad, y carga neta de esta (González Vázquez, 2014). Después del paso a través del intestino delgado, las cápsulas alcanzarán el intestino grueso, momento en el cual el pH disminuye ligeramente a pH entre 5.26 y 6.72 en el colon ascendente y pH 5.20-7.02 en el colon descendente. El tiempo de tránsito a través del intestino se ha reportado ser de  $3.2 \pm 1.6$  h (Cook *et al.*, 2012).

Una de las cualidades esenciales de un microorganismo probiótico es su capacidad para sobrevivir al estrés del tracto gastrointestinal. Por tanto, los probióticos deben ser capaces de adaptarse a la acidez del jugo gástrico y a la bilis en el intestino delgado. Un mecanismo de adaptación de muchas BAL es

debido a que la membrana lipídica cuando es expuesta al medio ácido o con bilis tiende a modificarse con el fin de incrementar la sobrevivencia. Durante un estudio realizado en *L. rhamnosus* GG, se encontró que cuando se incorpora ácido oleico (C18:1) en su fuente nutricional, la sobrevivencia de las células bacterianas se incrementa, esto debido a la incorporación del ácido oleico dentro de la membrana y que en medio ácido el ácido oleico es reducido a ácido esteárico (Johnson & Klaenhammer., 2014). Por otro lado, las bacterias como parte de sus funciones, censan y responden a condiciones ambientales de su entorno, como lo es la concentración de protones (pH), que por medio de circuitos moleculares detectan y amplifican las señales, permitiendo la generación de una respuesta específica como lo es el sistema de expulsión de protones en respuesta al estrés gástrico (Johnson & Klaenhammer., 2014; Barba-Ostria., 2014).

Cuando un microorganismo no es capaz de resistir el estrés del TGI, pero presenta efectos benéficos para la salud, puede ser utilizado como probiótico siempre y cuando se utilice un sistema de protección que ayude a resistir el estrés del TGI (Cook *et al.*, 2012).

#### **3.2.4 Beneficios de los probióticos**

En la actualidad los usos propuestos de los probióticos están en un amplio rango de enfermedades y dolencias por lo que han intentado clasificar la evidencia en función de la calidad de la evidencia que soporta las diversas aplicaciones.

En las aplicaciones con evidencia fuerte se encuentra la gastroenteritis aguda y la asociada a antibiótico. En aplicaciones con evidencia substancial de eficacia se encuentran reacciones alérgicas, dermatitis atópica. En aplicaciones que han demostrado ser prometedoras se encuentran infecciones respiratorias infantiles, caries dentales, patógenos nasales recidivantes, gastroenteritis inducida por *Clostridium* (prevención), enfermedad intestinal inflamatoria. En posibles aplicaciones futuras se encuentra la artritis reumatoide, síndrome del intestino

Irritable, cáncer (prevención), enfermedad hepática inducida por etanol, diabetes, enfermedad del injerto contra huésped (Goldin & Gorbach., 2008).

Se han reportado una variedad de beneficios de los probióticos para la salud del hospedero como son: protección contra infecciones, alivio de los síntomas del síndrome del intestino irritable, mejora la tolerancia a la lactosa, disminución de la incidencia de diarreas, disminuye el riesgo de diarrea asociada al uso de antibióticos, disminuye el riesgo de diarrea asociada a *C. difficile*, disminución de la distensión intestinal, analgésico del dolor abdominal vía receptores de  $\mu$ -opioides y canabinoides, actividad antimicrobiana, presenta exclusión competitiva de patógenos, inhibición del crecimiento de *H. pylori*, reduce la incidencia de enterocolitis necrosante, prevención de infecciones de vías respiratorias altas, tolerancia inmunológica, reducción de biomarcadores en cáncer colorectal, regeneración de la microbiota intestinal *post* antibióticos, presenta función de barrera epitelial, incrementa la actividad de la células NK, incrementa la actividad inmunológica humoral vía secreción de Ig A y baja los niveles de colesterol en sangre (Johnson & Klaenhammer., 2014).

Los mecanismos por los cuales los probióticos ejercen sus efectos benéficos se basan principalmente en el equilibrio de la microbiota intestinal ya que, compiten con bacterias patógenas por los alimentos y las fuentes de energía y producen sustancias inhibitoras que impide el crecimiento de bacterias patógenas (Gupta., 2016), tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas entre otros. Las acciones de los probióticos son útiles para ayudar a la TGI mediante la descomposición de azúcares y carbohidratos para promover una buena digestión, impulsar el sistema inmunológico, mantener el pH intestinal adecuado, y competir con éxito con los patógenos mecanismos que en algunos casos se logran debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta entre los que se encuentran el ácido láctico, acético, propiónico y butírico (Fooks & Gibson., 2002; Icaza-Chavez., 2013) El peróxido de hidrógeno es producido por muchas especies de *Lactobacillus* dependientes de oxígeno como agente antimicrobiano. Debido a que *Lactobacillus* no produce catalasa, el peróxido de hidrógeno

producido no puede degradarse y actúa como agente oxidante a través de radicales libres (Gupta., 2016). Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas proteínicas que a veces están asociadas con lípidos y carbohidratos. Las bacteriocinas han demostrado acciones inhibitorias en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Gupta., 2016).

Otros mecanismos implican el reforzamiento de la pared intestinal por la expulsión de microorganismos patógenos, por lo tanto, ayudar a prevenir su adhesión al intestino (Gupta., 2016) bloqueando los sitios de adhesión por competición; participan en la modulación del sistema inmune no específico (inmunidad innata), como la promoción de la producción de mucina, la inhibición de bacterias patógenas, la disminución de la permeabilidad intestinal, la activación de macrófagos y la capacidad fagocítica y la actividad de las células NK. Con respecto al sistema inmune específico (adaptativo), los efectos observados son un aumento en la producción de anticuerpos (Ig A, Ig M e Ig G), y también influyen en la disposición de ambas ramas del sistema inmune mediante la producción de citosinas y otros elementos reguladores (Gupta., 2016).

### **3.2.5 Propiedades de uso tecnológicas**

La sobrevivencia de probióticos es afectada por diferentes factores como son el pH, acidificación en productos fermentados durante el almacenamiento, por producción de peróxido de hidrógeno en condiciones aeróbicas, la temperatura de almacenamiento y estabilidad en forma seca o en congelación. De aquí que se estudien diferentes enfoques para incrementar la resistencia de los microorganismos sensibles contra las condiciones adversas, como son la selección de cepas resistentes a medios ácidos, así como cepas resistentes en medios con bilis, la utilización de contenedores impermeables al oxígeno, fermentaciones en dos pasos, adaptación al estrés, incorporación de micronutrientes y la microencapsulación (Chopde *et al.*, 2014). Por lo que, después de que se confirma que un microorganismo presenta un beneficio para la salud humana, éste debe cumplir con algunos criterios tecnológicos para que

pueda ser manufacturado e incorporado en productos alimenticios sin que pierda su viabilidad y funcionalidad, además no debe conferir sabores o texturas desagradables. En general algunos aspectos tecnológicos que son considerados en la selección de probióticos, incluyen lo siguiente: buenas propiedades sensoriales, viabilidad durante el proceso y estabilidad del producto durante su almacenamiento (Mattila *et al.*, 2002). Para cumplir con estas propiedades tecnológicas, las células bacterianas con potencial probiótico que no tienen la capacidad de resistir las condiciones del estrés gastrointestinal deben ser protegidas, además de no afectar las propiedades sensoriales en los alimentos. Por otro lado, siendo la microencapsulación un método efectivo para este fin; Chandramouli *et al.* (2004) mencionan que tamaños mayores a 1000  $\mu\text{m}$  confieren una textura gruesa al alimento donde se desea adicionar el probiótico, pero mencionan que tamaños menores a 100  $\mu\text{m}$  no confieren protección significativa al probiótico frente al jugo gástrico simulado en comparación con las células libres.

### **3.3 Método de protección de los microorganismos probióticos**

La microencapsulación es un método que ha sido desarrollado para usarse en la industria alimentaria permitiendo la protección de las células bacterianas. La microencapsulación se define como el proceso de atrapamiento o inmovilización de microorganismos por medio del recubrimiento con agentes poliméricos con el fin de aislarlos de su entorno y que a su vez resulte en una apropiada liberación en el medio intestinal (Chopde *et al.*, 2014).

La tecnología de encapsulación es un campo atractivo para la biofarmacia que ha emergido y se ha desarrollado rápidamente, donde un amplio intervalo de microorganismos han sido inmovilizados dentro de materiales semipermeables y biocompatibles que modulan la liberación celular basados en la encapsulación. Los términos inmovilización, atrapamiento y encapsulación han sido utilizados intercambiamente en la literatura. Mientras que la encapsulación es el proceso de recubrimiento continuo, alrededor de una matriz inerte contenida dentro de las paredes de la cápsula como un núcleo de material encapsulado, la inmovilización

por otro lado, se refiere al atrapamiento de material dentro o a través de una matriz (Gbassi & Vandamme., 2012).

La encapsulación tiende a estabilizar las células, potenciando su viabilidad y estabilidad durante la producción, almacenamiento y manipulación. Un entorno inmovilizado también confiere protección adicional a las células probióticas durante la rehidratación (Gbassi & Vandamme., 2012).

La elección del biomaterial es crucial, porque éste determina la efectiva protección, además esta protección debe resistir durante su paso a través del estómago, desintegrarse y liberar las células en el intestino. Los disolventes involucrados en la tecnología de encapsulación deben ser no tóxicos; además, evaluar las condiciones de liberación de los probióticos encapsulados en un modelo del tracto gastrointestinal es un enfoque esencial, lo que dará una idea del comportamiento de las células probióticas (Gbassi & Vandamme., 2012).

### **3.3.1 Biomateriales**

Los biomateriales son macromoléculas orgánicas e inorgánicas, que consisten de cadenas repetidas de monómeros unidos por enlaces covalentes. Su estructura química y la conformación de la cadena de monómeros nos dan su funcionalidad específica como lo es la capacidad de formar geles (Gbassi *et al.*, 2012).

Las características que se consideran cuando se seleccionan los biomateriales para la encapsulación de probióticos son: (a) propiedades fisicoquímicas (composición química, morfología, fuerza mecánica, estabilidad en fluidos gástrico e intestinal) (b) análisis toxicológico (c) procesos de manufacturación y esterilización (Gbassi *et al.*, 2012).

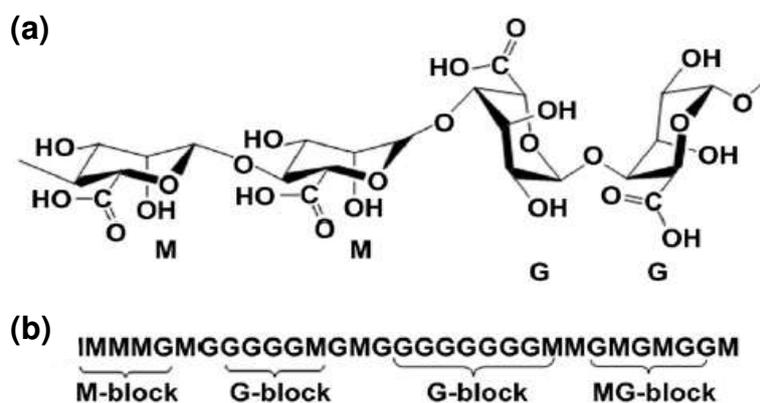
De los materiales biocompatibles que pueden ser utilizados para la microencapsulación están el alginato, quitosán, almidón, goma xantana, grasas, gelatina, carragenina, acetato ftalato de celulosa, proteína de leche y derivados del glicerol. Los alginatos son los materiales más comúnmente utilizados en la

microencapsulación en la industria alimentaria por su baja toxicidad, bajo costo, por su biocompatibilidad y por su fácil aplicación (Gbassi *et al.*, 2012).

Por otra parte, los alginatos son susceptibles a diversas condiciones químicas adversas como son: pH bajo, presencia de materiales policatiónicos como la gelatina, quitosan, poli-L-lisina; estos compuestos pueden formar interacciones de intercambio iónico con las cargas negativas de la estructura de los alginatos, por lo que cuando se trabaja con ellos, deben tomarse en cuenta estos factores (Haghshenas *et al.*, 2015).

### 3.3.2 Alginato de sodio

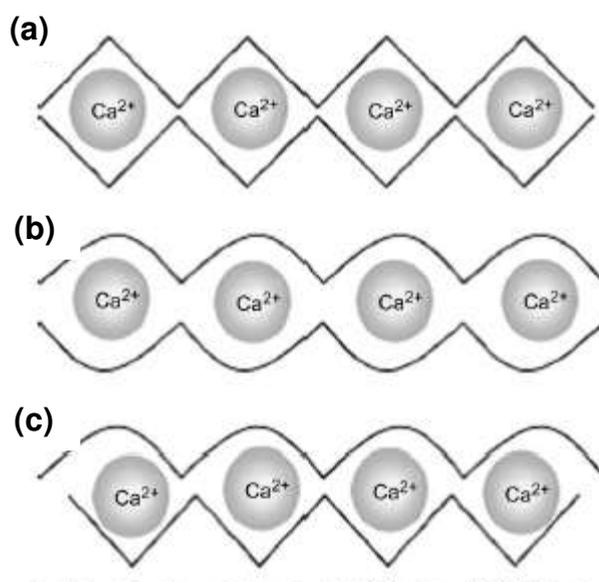
Los alginatos considerados polisacáridos que consisten de uniones 1-4  $\beta$ -D- ácido manurónico (M) y su epímero, el  $\alpha$ -L- ácido gulurónico (G). El alginato de sodio es un copolímero natural, es una molécula importante en el contenido estructural de las algas cafés y también forma parte del exoesqueleto de algunas bacterias. Este polímero está compuesto de secuencias de monómeros de M, de secuencias de monómeros de G, y de residuos intercalados de MG (Figura 1). La composición del copolímero, secuencia y peso molecular varía dependiendo de la fuente y la especie que produce el copolímero (Pawar & Edgar., 2012).



**Figura 1.** Representación de la estructura de alginato (a) cadena en conformación (b) distribución de block. Figura tomada de Pawar & Edgar. (2012).

El alginato es quelado con cationes divalente para formar hidrogeles, la formación del gel es conducida por la interacción entre los bloques de G en asociación con la unión de iones divalentes por ejemplo el  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Sin embargo, el  $Ca^{2+}$  es el ion más comúnmente usado. La unión del ion calcio con el alginato se presenta por la interacción del grupo carboxílico de un monómero de G o M con el ion calcio y éste con otro monómero de G o M de la misma o diferente cadena, la fuerza de unión se verá afectada dependiendo de las uniones entre GG, GM y MG siendo las más fuertes entre GG, (Pawar & Edgar., 2012).

Los posibles puntos de unión de las cadenas del alginato con el calcio (Figura 2) para formar redes, pueden ser realizados por dos métodos, uno es por difusión del calcio a través del alginato y la segunda es colocando una fuente de calcio que sea insoluble en un inicio, que posteriormente será solubilizado para liberar el calcio y finalmente interaccione con las cadenas de alginato (Pawar & Edgar., 2012).



**Figura 2.** Posibles puntos de unión en el alginato (a) GG/GG (b) MG/MG y (c) GG/MG. Figura tomada de Pawar & Edgar. (2012).

### 3.3.3 Métodos de formación de micropartículas

Los métodos comúnmente aplicados para microencapsular probióticos son: emulsión, extrusión, secado por aspersión (Rokka & Rantamäki., 2010; Cook *et al.*, 2012). El tamaño de las micropartículas obtenidas por emulsión varía desde 20  $\mu\text{m}$  a 2 mm y la extrusión de 2 a 4 mm y con nueva tecnología de extrusión se puede obtener hasta 150  $\mu\text{m}$ . Por extrusión se puede conseguir más uniformidad en el tamaño y forma de las micropartículas que por emulsión (Rokka & Rantamäki., 2010). Sin embargo, la emulsificación es más fácil de escalar a nivel laboratorio sin necesidad de equipo especializado (Cook *et al.*, 2012). En el

secado por aspersión se han encontrado hasta un tamaño de partícula de 5 a 80  $\mu\text{m}$  (Rokka & Rantamäki., 2010).

### 3.3.4 Encapsulación por emulsificación

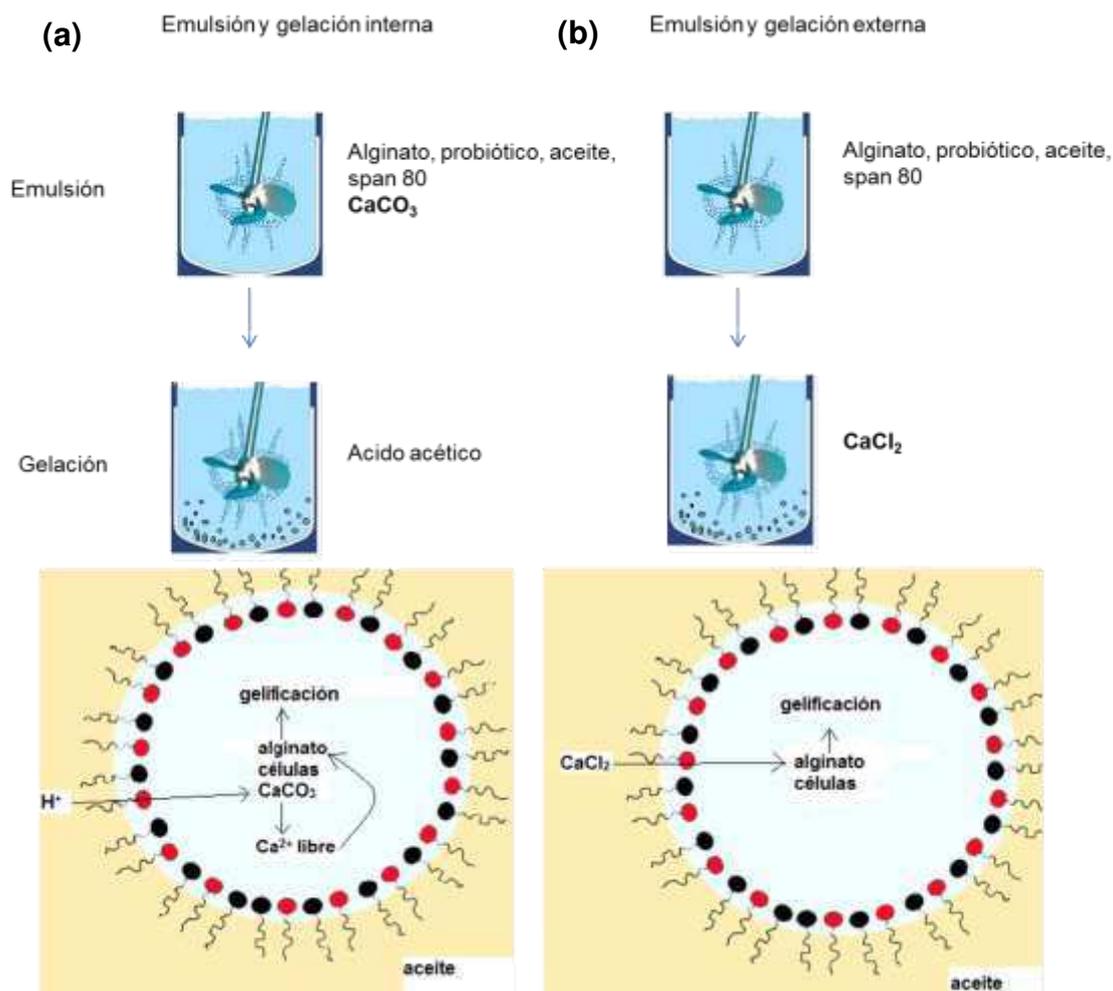
El método de emulsificación se obtiene mediante la formación de una fase acuosa (fase discontinua) que es dispersada en una fase oleosa (fase continua). La emulsión de agua en aceite se formará por agitación continua. La velocidad de agitación es un paso crítico porque éste afecta el tamaño y la forma de las gotas formadas (Gbassi & Vandamme., 2012). El tamaño promedio de las gotas está determinado por varios parámetros como son el diseño del aparato, viscosidades de las fases inmiscibles y la velocidad de mezclado. La ecuación 1 ha sido propuesta como guía para controlar el tamaño de las microesferas.

#### Ecuación 1.

$$\bar{d} \propto K \frac{D_V R V_d \gamma}{D_S N V_m C_s}$$

Dónde: ( $\bar{d}$ ) es el tamaño de la gota promedio, (K) simboliza parámetros como el diseño de aparatos, ( $D_V$ ) diámetro del vaso, ( $D_S$ ) diámetro del agitador (R) proporción de volumen de la fase acuosa, (N) velocidad de agitación, ( $C_s$ ) concentración del estabilizador, ( $V_d$ ) viscosidad de la fase acuosa, ( $V_m$ ) viscosidad de la fase oleosa y ( $\gamma$ ) tensión superficial de las fases inmiscibles (Silva *et al.*, 2006).

Existen dos mecanismos de microencapsulación en base a la interacción del calcio con el alginato gelación interna figura 3a y gelación externa figura 3b.



**Figura 3.** Métodos de formación de micropartículas por emulsión (a) gelación interna (b) gelación externa.

### 3.3.4.1 Encapsulación por emulsificación y gelación interna

La encapsulación por el método de emulsificación y gelación interna consiste en la formación de una dispersión de agua en aceite de alginato en disolución la cual contiene una sal de calcio insoluble y la gelación se consigue cuando el calcio es solubilizado por la acidificación de la dispersión, utilizando un ácido solubilizado en aceite ver figura 3a (Silva *et al.*, 2006)

Song *et al.* (2013) inmovilizaron células de levaduras Y235; utilizaron una suspensión de alginato de sodio al 1.5% que contenía  $\text{CaCO}_3$  finamente

dispersado en la suspensión, se mezcló con 50 mL de aceite mineral que contenía Span 85 al 0.5% (v/v), se agitó a 200 rpm durante 30 min, una vez formada la emulsión se adiciona lentamente ácido acético para liberar el calcio, el cual interaccionó con el alginato para realizar la gelación. El resultado de viabilidad al final del proceso de fabricación fue de 77 %.

#### **3.3.4.2 Encapsulación por emulsificación y gelación externa**

El método de emulsificación y gelación externa consiste primero en mezclar la bacteria con potencial probiótico en una disolución de alginato, después se mezcla en la fase oleosa que contiene el emulsificante, se adiciona una disolución de  $\text{CaCl}_2$  para formar las micropartículas por entrecruzamiento de las cadenas de alginato con los iones calcio ver figura 3b, la emulsión se rompe y finalmente las micropartículas son separadas por centrifugación (Rokka & Rantamäki., 2010).

Song *et al.* (2013) encapsularon células de levaduras Y235, utilizando una disolución de alginato de sodio al 1.5 % y aceite mineral con span 85 al 0.5% (v/v) se agitó a 200 rpm durante 30 min y una vez formada la emulsión se adicionó 10 mL de  $\text{CaCl}_2$  50 mM para promover la gelación. El resultado de viabilidad al final del proceso de fabricación fue de 80%.

#### **3.3.5 Encapsulación por extrusión**

El método de extrusión es cuando a una disolución de material polimérico capaz de formar micropartículas se le adiciona un probiótico, posteriormente ésta es pasada a través de una aguja de jeringa o boquilla con un tamaño de orificio controlado, la disolución comienza a gotear sobre una disolución de  $\text{CaCl}_2$  y al entrar en contacto con la disolución de calcio se forman las micropartículas (Rokka & Rantamäki., 2010).

El probiótico *L. acidophilus* 547 fue microencapsulado por el método de extrusión utilizando disoluciones de alginato de sodio al 2% y  $\text{CaCl}_2$  0.05 M, el

porcentaje de sobrevivencia después de fabricación fue del 99.9% y el tamaño de partícula fue de 1.62  $\mu$ m de forma globular. Posteriormente se evaluó la viabilidad después de pasar de manera secuencial por jugo gástrico y jugo intestinal simulado, obteniéndose una disminución de la sobrevivencia de alrededor de 5 órdenes logarítmicos (Krasaekoopt *et al.*, 2004).

### **3.4 *Lactobacillus acidophilus* LA-5**

La cepa *L. acidophilus* LA-5 ha mostrado tener efectos benéficos para la salud influyendo en la modulación de la microbiota intestinal, así como en la disminución del dolor estomacal (Matias *et al.*, 2016). La bacteria *L. acidophilus* LA-5 es un microorganismo que coloniza el intestino y que cuando se establece se convierte en una parte importante de la microbiota del tracto gastrointestinal. Esta bacteria ha mostrado ser efectiva contra infecciones enterohemorragicas causadas por *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7. Medellín-Peña y Griffiths, (2009) han mostrado que *L. acidophilus* LA-5 es capaz de impedir que *E. coli* O157:H7 se adhiera a la pared intestinal ya sea por la producción de algunas moléculas que no han sido bien caracterizadas pero que pueden estar conformadas por cadenas cortas de aminoácidos y que son resistentes a cambios de pH y temperatura ya que estas moléculas pueden influir en la transcripción de genes de EHEC involucrados en la colonización del tracto gastrointestinal.

#### **3.4.1 Viabilidad de *L. acidophilus* después de pasar por el tracto gastrointestinal**

La microencapsulación de *L. acidophilus* LA-5 por gelación ionotrópica usando como matriz pectina y recubierta de proteína de suero de leche presentó un alto rendimiento de encapsulamiento (84.35%); mientras que cuando fueron sometidos a jugo gástrico pH 3.0 y jugo intestinal pH 7.0 simulados presentaron una disminución de 1.59 órdenes logarítmicos, mientras que la disminución de las células sin encapsular fue de 3.54 órdenes logarítmicos bajo las mismas

condiciones de estrés. La viabilidad de *L. acidophilus* fue determinada por cuenta de células viables en microorganismos libres y en microorganismos recientemente microencapsulados. Las micropartículas fueron desintegradas por la adición de 9 mL de disolución de citrato de sodio (2% m/v) estéril pH 7 a 1 g de micropartículas seguido de una agitación vigorosa de 5 min. Después de la desintegración los microorganismos liberados y contabilizados por diluciones seriadas en agua peptonada estéril 0.01 % (m/v) sembrado en agar MRS, incubado a 37 °C durante 72 h en condiciones anaeróbicas (Gebara *et al.*, 2013).

### **3.5 Diseño de experimentos**

Se puede definir un experimento como una prueba o serie de pruebas en la que se hacen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema para observar e identificar las razones de los cambios que pudieran observarse en la respuesta de salida, por lo que un diseño de experimentos consistirá en la planeación y realización de experimentos así como del análisis de los datos resultantes a fin de obtener conclusiones válidas y objetivas.

Existen diferentes estrategias o enfoques en el diseño de experimentos, basadas en los factores que pueden afectar los resultados, estos podría ser el enfoque de la mejor conjetura, el enfoque de un factor a la vez y diseño factorial.

El enfoque correcto para trabajar con varios factores es conducir un experimento factorial y este se trata de una estrategia experimental en la que los factores se hacen variar en conjunto en lugar de uno a la vez. Dentro de las aplicaciones típicas del diseño de experimentos en la fase inicial del desarrollo de un proceso se encuentran:

- 1) Mejoras en el rendimiento del proceso
- 2) Mejoras en la precisión y exactitud
- 3) Reducción del tiempo de desarrollo
- 4) Reducción de los costos globales

En el diseño de ingeniería las aplicaciones son

- 1) Evaluación y comparación de configuraciones de diseños básicos
- 2) La evaluación de materiales alternativos
- 3) En estudios de robustez
- 4) Determinación de los parámetros claves del diseño del producto

El diseño factorial se usa ampliamente en experimentos que incluyen varios factores y cuando es necesario estudiar el efecto conjunto de los factores sobre una respuesta. El caso más importante es el de  $k$  factores, cada uno con solo dos niveles. De los resultados obtenidos se genera un resumen de la estimación de los efectos y la suma de cuadrados de los factores manejados en el experimento, el valor de la estimación de los efectos nos indica la importancia de cada término del modelo. La tabla de análisis de variancia puede usarse para confirmar la magnitud de estos efectos y si estos son significativos (utilizando el valor de  $P$ ). El modelo de regresión se utiliza para construir la gráfica de superficie de respuesta y la gráfica de contornos para la respuesta observada (Montgomery., 2010).

#### **4.0 Planteamiento del problema**

*Lactobacillus acidophilus* LA-5 es un microorganismo que actualmente se comercializa como probiótico ya que tiene influencia sobre la modulación del equilibrio intestinal. Sin embargo, en cuanto a la resistencia al estrés gastrointestinal, presenta capacidad limitada. Por tal motivo, requiere ser protegido para llegar vivo al sitio de acción y ejercer su efecto benéfico sobre el hospedero.

Considerando también, que el probiótico se desea adicionar a matrices alimenticias, es importante tomar en cuenta las propiedades organolépticas que al producto pueda conferirle, siendo el tamaño de partícula un parámetro importante para dicho fin. Un método de fabricación, que nos ofrece tamaños menores a 1000  $\mu\text{m}$  es la emulsificación, el cual es un método factible de realizar.

## **5.0 Hipótesis**

El alginato no solo actuará como un sistema microencapsulante del probiótico, sino también le conferirá por sí sólo mayor resistencia contra las condiciones de estrés del tracto gastrointestinal, ya que se ha reportado que cuando se inmovilizan los microorganismos con este biopolímero, estos pueden ser protegidos.

## **6.0 Objetivo general**

Microencapsular la cepa *L. acidophilus* LA-5 por la técnica de gelificación interna utilizando alginato para incrementar la sobrevivencia de las células probióticas.

### **6.1 Objetivos específicos**

- 1) Adecuar la técnica de gelificación interna para obtener micropartículas
- 2) Incorporar *L. acidophilus* LA-5 a las micropartículas de alginato
- 3) Determinar la viabilidad de *L. acidophilus* LA-5 al final del proceso de fabricación.
- 4) Evaluar la liberación y viabilidad de *L. acidophilus* LA-5 microencapsulado bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.
- 5) Comparar la viabilidad de *L. acidophilus* LA-5 sin encapsular y encapsulado

## 7.0 Materiales y métodos

### 7.1 Materiales

Alginato de sodio (Sigma-Aldrich, USA); Lisozima y cloruro de calcio (Merck, Alemania); hidróxido de sodio y ácido clorhídrico (JT Baker, México); fosfato de potasio monobásico (Fermont, México); aceite mineral NF55 (Droguería Cosmopolitan, México); Span 80® (Fluka, Alemania), medio de cultivo caldo y agar Man Rogosa Sharpe (MRS) (Difco, USA); pepsina y Oxgall (Meyer, México); La cepa *L. acidophilus* LA-5 fue donada por Laboratorios Christian Hansen, Ciudad de México.

### 7.2 Métodos

#### 7.2.1 Fluidos gastrointestinales simulados

Fluido de saliva simulada (FSS), fue preparada usando una disolución amortiguadora de fosfatos estéril de 60 mM (pH 6.2) y lisozima ( $\geq 250$  KU/mL) 0.01% (p/v). El fluido gástrico simulado (FGS) consistió de una disolución de cloruro de sodio (pH 2) y pepsina (2000- 3500 U/g) 3 g/L. El fluido intestinal simulado (FIS) consistió de una disolución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8) suplementado con Oxgall al 0.5% (p/v).

#### 7.2.2 Generación de biomasa de *L. acidophilus* LA-5

Un liofilizado de *L. acidophilus* LA-5 se adicionó a un caldo de cultivo MRS, se incubó a 37 °C durante 48 h, el cultivo fue centrifugado a 13130 × g a 4 °C durante 15 min usando una centrifuga Sorvall® RC-5B (Dupont Instrument, USA), el paquete celular fue suspendido en medio fresco suplementado con dextrosa (5%) se incubó a 37 °C durante 48 h (Gebara *et al.*, 2013). Posteriormente las células fueron concentradas por centrifugación a 13130 × g a 4 °C durante 15 min y almacenadas a -20 °C hasta su uso en caldo MRS que contenía glicerol al 20%. Para la determinación de células viables se utilizó el método modificado de Reyes-

Nava *et al.* (2016), el cual consistió en realizar 6 diluciones decimales seriadas utilizando como disolvente agua destilada estéril y de cada dilución se inocularon 5  $\mu$ L en agar MRS, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las colonias de cada dilución fueron contadas y se expresó como UFC/mL. Los experimentos fueron realizados por triplicado

### **7.2.3 Análisis exploratorio para la producción de micropartículas**

#### **7.2.3.1 Producción de micropartículas por gelación interna**

Primero se realizó un análisis exploratorio para implementar el método de emulsificación y gelación interna reportado por Silva *et al.* (2006) el cual consistió en lo siguiente: una disolución de alginato de sodio al 2% (m/v) fue mezclada con una disolución de CaCO<sub>3</sub> al 5% (m/v) en una proporción en masa de 7.3% Ca/alginato (m/m) y posteriormente homogeneizada, la mezcla fue dispersada en aceite mineral con span 80 al 1% (v/v) para formar una emulsión agua en aceite (W/O) (30:70) con agitación a 400 rpm utilizando un mezclador (IKA® RW20, USA) con una propela de 50 mm de diámetro (IKA® R1342, USA), después se adicionó a la emulsión 20 mL de aceite mineral que contenía ácido acético con agitación continua, para lograr una proporción final del ácido/Ca de 3.5 molar.

#### **7.2.3.2 Producción de micropartículas por gelación externa**

Para la formación de micropartículas por este método se utilizó una concentración de alginato de sodio al 2% (m/v) y aceite mineral con span 80 al 1% (v/v) para lograr una emulsión W/O 30:70, empleando una velocidad de mezclado de 400 rpm durante 15 minutos y transcurrido el tiempo de mezclado, se adicionó 90 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM.

##### **7.2.3.2.1 Medición del tamaño de partícula**

El tamaño de las micropartículas fue evaluado usando un analizador de distribución del tamaño de partícula (Horiba LA-950V2, Japón) utilizando agua destilada como medio de dispersión y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 7.2.3.2.2 Incremento del tamaño de partícula

Los factores tiempo de mezclado (30, 15, 10, 2 y 1 minutos), velocidad de mezclado (400 y 300 rpm) y concentración de alginato (2 y 4%) fueron modificados con la finalidad de obtener un tamaño de partícula de alrededor de 100  $\mu\text{m}$ . Este tamaño se ha sugerido que puede mejorar la protección cuando se enfrentan las micropartículas a condiciones simuladas de estrés del tracto gastrointestinal (Mandal *et al.*, 2006), así como también no afecta las propiedades organolépticas de los productos donde se incluyen (Wang *et al.*, 2014). Los experimentos en general consistieron en mezclar 30 mL de la disolución de alginato de sodio al 2% o 4% con 70 mL de aceite mineral y span 80 al 1% utilizando un mezclador (IKA® RW20, USA) con una propela de 50 mm de diámetro (IKA® R1342, USA). Para 2% de alginato la concentración de  $\text{CaCl}_2$  fue 85 mM y para 4% fue de 170 mM. Las condiciones de tiempo y velocidad de mezclado, así como la concentración de alginato de sodio están indicadas en la tabla 1.

**Tabla 1.** Parámetros evaluados: concentración de alginato de sodio, tiempo y velocidad de mezclado.

Experimento	Tiempo de mezclado (minutos)	Velocidad de mezclado (rpm)	Concentración de alginato (% m/v)
1	15	400	2
2	10	400	2
3	2	400	2
4	1	400	2
5	15	300	2
6	30	300	2
7	30	300	4

Pasado el tiempo de mezclado se adicionó 90 mL  $\text{CaCl}_2$  170 mM y se continuó la agitación a la velocidad indicada en el experimento durante 15 minutos más. Las micropartículas fueron separadas por centrifugación y observadas al microscopio.

#### 7.2.4 Optimización de las condiciones de mezclado para la formación de micropartículas

Para la optimización de las condiciones de mezclado se realizó un diseño factorial  $2^3$  completo con tres replicas donde la velocidad, tiempo y temperatura de mezclado (Tabla 2) fueron tomadas como las variables independientes del experimento y la variable de respuesta fue la media del tamaño de partícula (Tabla 2). Además, la concentración de  $\text{CaCl}_2$  y alginato se fijaron durante la optimización a 170 mM y 4% (m/v) respectivamente.

**Tabla 2.** Codificación y valores de cada variable independiente experimental evaluada.

Tratamiento	Orden aleatorio	Nivel de mezclado			Valor de mezclado			Tamaño de partícula
		Vel. (rpm)	Tiempo (min)	Temp. (°C)	Vel. (rpm)	Tiempo (min)	Temp. (°C)	Media (µm)
1	5	-1	-1	-1	250	30	15	77
a	4	1	-1	-1	350	30	15	70.2
b	7	-1	1	-1	250	45	15	84.5
ab	2	1	1	-1	350	45	15	56.8
c	6	-1	-1	1	250	30	20	93.4
ac	8	1	-1	1	350	30	20	56.1
bc	1	-1	1	1	250	45	20	89.3
abc	3	1	1	1	350	45	20	67.8

### **7.2.5 Formación de las micropartículas por emulsificación**

Las micropartículas fueron formadas sin y con *L. acidophilus* LA-5.

Las micropartículas sin probiótico fueron preparadas por emulsión (W/O, 30:70) mezclando 16 mL de alginato de sodio (4%) con 35 mL de aceite mineral y span 80 al 1% usando un mezclador con propela (IKA® RW20, USA) con un diámetro de propela de 50 mm (IKA® R1342, USA) bajo las condiciones descritas en la tabla 2. La temperatura fue mantenida usando un baño recirculador (LAUDA Alpha RA 12, USA). Una vez que la emulsión fue formada se adicionaron 44 mL de CaCl<sub>2</sub> (170 mM) a una velocidad aproximada de 10 mL/min, con agitación continua durante 15 min hasta que la emulsión se rompió, produciendo una suspensión del sistema de microencapsulación (SSM). La gelación fue completada por refrigeración (4 °C) de la SSM durante 18 h.

Después de analizar los resultados obtenidos de los tratamientos de la tabla 2; para la formación de las micropartículas con probiótico se usaron las siguientes condiciones: velocidad de mezclado 250 rpm, temperatura de mezclado 20 °C y tiempo de mezclado 30 min. Para formar las micropartículas se siguió la misma metodología usada para la formación de micropartículas sin probiótico pero utilizando 600 µL de una solución concentrada de *L. acidophilus* LA-5 que contenía aproximadamente  $9.06 \times 10^5$  UFC y que fue adicionada a la solución de alginato (4%).

### **7.2.6 Determinación del tamaño y morfología de las micropartículas**

El tamaño de las micropartículas fue evaluado usando un analizador de distribución del tamaño de partícula (Horiba LA-950V2, Japón) utilizando agua destilada como medio de dispersión y siguiendo las instrucciones del fabricante.

La morfología de las micropartículas fue observada usando un microscopio (Olimpus BH2-UMA, Japón) a 10x y por microscopía electrónica de barrido (MEB) (JEOL6010-LV, USA). Antes de analizar, la muestra de las micropartículas fue secada a 70 °C durante 1 min y colocada en cinta adhesiva en el porta muestra.

### **7.2.7 Efecto de FSS, FGS y FIS sobre células de *L. acidophilus* LA-5 encapsuladas y libres**

La capacidad de *L. acidophilus* LA-5 para sobrevivir a las condiciones de FSS, FGS y FIS fue determinada por el método de cuenta en placa de las células de *L. acidophilus* LA-5 libres y las células inmovilizadas antes de ser expuestas a cada medio.

Para probar la capacidad de las células libres de *L. acidophilus* LA-5 para sobrevivir a los fluidos gastrointestinales simulados,  $3 \times 10^3$  UFC fueron suspendidos en 1 mL de FSS e incubados a 37 °C, la temperatura de incubación fue mantenida usando un baño recirculante termostático (LAUDA Alpha RA, USA) durante 5 min con una velocidad de agitación alrededor de 400 rpm usando un agitador magnético (IKA RO 5, Alemania). La dispersión obtenida fue centrifugada a  $9000 \times g$  durante 5 min a temperatura ambiente usando el equipo mini spin plus (Eppendorf, USA) y luego el paquete celular fue suspendido en 1 mL de FGS e incubado a 37 °C durante 90 min con agitación utilizando los mismos equipos como en la prueba de FSS. Después, la dispersión fue centrifugada bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente para separar el paquete celular, que fue luego suspendido en 1 mL de FIS e incubada a 37 °C durante 150 min utilizando los mismos equipos como en la prueba de FSS. Todos los experimentos fueron conducidos por triplicado (González-Vázquez *et al.*, 2015; Reyes-Nava *et al.*, 2016).

Para probar la capacidad de sobrevivir de *L. acidophilus* LA-5 inmovilizado en fluidos gastrointestinales simulados, fueron colocados 1 mL de agua estéril y 9 mL de SSM en un tubo Falcón y la mezcla centrifugada a  $44.7 \times g$  durante 5 min a temperatura ambiente usando una centrifuga Sol-Bat (modelo 5094, México) para separar las micropartículas. El paquete de micropartículas fue lavado dos veces con 4 mL de agua estéril cada vez. Luego las micropartículas ( $1 \times 10^3$  UFC/mL de *L. acidophilus* LA-5) fueron suspendidas en 1 mL de FSS e incubadas a 37 °C. La temperatura fue mantenida con ayuda de un baño recirculante termostático (LAUDA Alpha RA 12, USA) durante 5 min con una velocidad de agitación alrededor de 400 rpm usando un agitador magnético (IKA RO 5, Germany). La

dispersión resultante fue centrifugada a  $44.7 \times g$  durante 5 min a temperatura ambiente usando una centrifuga Sol-Bat (modelo 5094, México) las micropartículas luego fueron suspendidas en 1 mL de FGS e incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 90 min con agitación usando los mismos equipos utilizados en la prueba del FSS. Después, para separar las micropartículas de la dispersión, ésta fue centrifugada bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente, y luego fueron suspendidas en 1 mL de FIS e incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 150 min utilizando los mismos equipos como en la prueba del FSS. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado (González-Vázquez *et al.*, 2015; Reyes-Nava *et al.*, 2016).

### 7.2.8 Análisis estadístico

El diseño de experimentos y datos fueron analizados usando el software Statgraphics Centurion XV (Virginia, USA). El análisis estadístico de los resultados fue realizado usando un análisis de varianza (ANOVA) con una  $P \leq 0.05$ . La respuesta fue ajustada a una función lineal de las variables como la ecuación siguiente:

#### Ecuación 2.

$$Y = \mu_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Donde Y es la respuesta predicha;  $\mu_0$  es el intercepto;  $\beta_1 - \beta_3$  son los coeficientes lineales;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{23}$  son las interacciones o coeficientes de los productos cruzados y  $X_i$  es el código de la variable independiente. Los datos obtenidos utilizando esta ecuación, fueron usados para construir la gráfica de superficie de respuesta y la gráfica de contornos.

## 8.0 Resultados y discusión

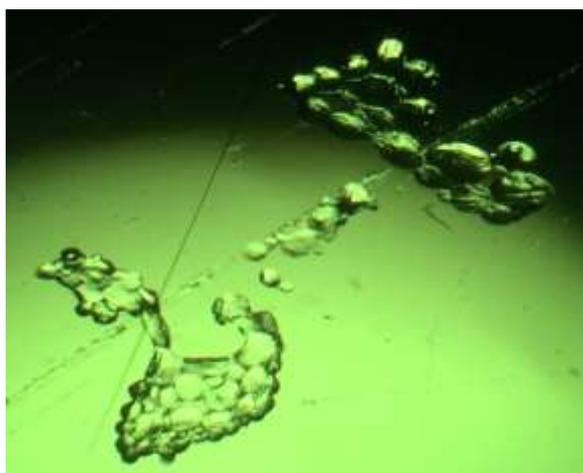
### 8.2.2 Generación de biomasa de *L. acidophilus* LA-5

La biomasa generada de *L. acidophilus* LA-5 fue de  $3 \times 10^6$  UFC/mL la cual fue almacenada a  $-20$  °C hasta su uso en caldo MRS que contenía glicerol al 20%.

### 8.2.3 Análisis exploratorio para la producción de micropartículas

#### 8.2.3.1 Producción de micropartículas por gelación interna

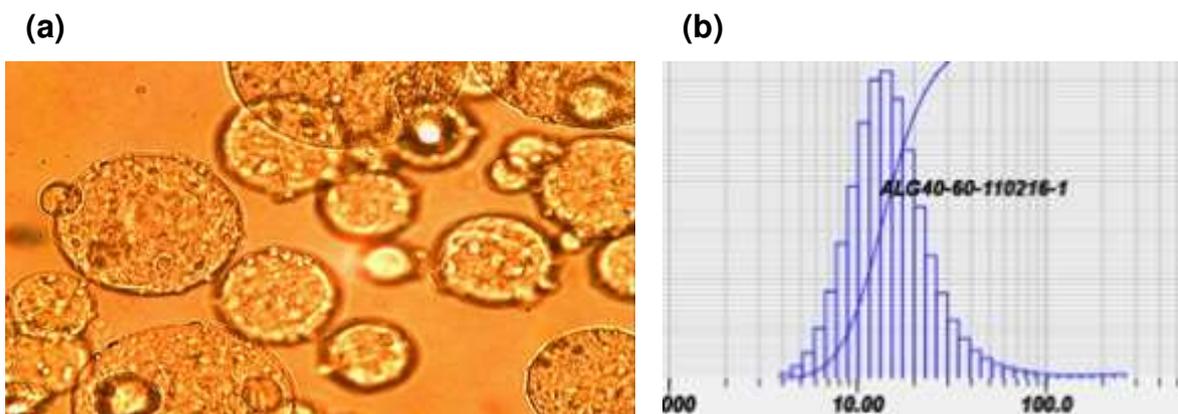
Los resultados obtenidos por microscopia indicaron que las micropartículas fueron formadas, sin embargo presentaron el fenómeno de aglomeración (Figura 4), lo cual interfirió en la determinación del tamaño de partícula por lo que se decidió utilizar el método de gelación externa para la formación de las micropartículas



**Figura 4.** Microscopia óptica. Micropartículas aglomeradas x10.

#### 8.2.3.2 Producción de micropartículas por gelación externa

El fenómeno de aglomeración fue eliminado al fabricar las micropartículas por el método de gelación externa (Figura 5a) sin embargo el tamaño de partícula promedio observado, fue alrededor de  $10 \mu\text{m}$  (figura 5b) por tal razón se buscaron las condiciones para incrementar el tamaño de partícula.



**Figura 5. (a)** Microscopía óptica. Micropartículas sin aglomerar x10. **(b)** Distribución del tamaño de partícula.

#### 8.2.3.2.2 Incremento del tamaño de partícula

Para incrementar el tamaño de partícula se realizaron diversos experimentos (Tabla 1) inicialmente se aumentó la concentración de  $\text{CaCl}_2$  a 170 mM para incrementar la interacción de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  pero el tamaño de partícula no se incrementó. Se probó disminuir el tiempo de mezclado (Tabla 1 y 3 experimento 1 al 4) observando un incremento en el tamaño de partícula pero con un incremento en la dispersión del mismo. Posteriormente se disminuyó la velocidad de agitación (Tabla 1 y 3 experimento 5) como lo menciona Silva *et al.* (2006) y el tamaño de partícula se incrementa pero también se incrementa la dispersión de la población y para disminuir la dispersión se incrementa el tiempo de mezclado (Tabla 1 y 3 experimento 6), la dispersión disminuyó pero no lo suficiente, por lo que fue necesario incrementar la concentración de alginato al 4% (Tabla 1 y 3 experimento 7), con esto se logró disminuir la dispersión y el tamaño de partícula se incrementó hasta 67  $\mu\text{m}$ , por lo que se decidió utilizar la concentración de alginato de sodio al 4% y  $\text{CaCl}_2$  170 mM como condiciones fijas y las condiciones de velocidad de mezclado de 300 rpm y tiempo de mezclado de 30 min como condiciones de mezclado base para la optimización del proceso, utilizando un diseño de experimentos.

**Tabla 3.** Experimentos realizados para incrementar el tamaño de partícula.

<b>Experimento</b>	<b>Media (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Mediana (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Moda (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Observación</b>	<b>Anexo</b>
1	9.4	9.8	9.9	Partículas sin aglomerar	1 a
2	21.1	14.2	14.1	Aumenta tamaño de partícula	1 b
3	176.6	43.5	55.4	Aumenta el tamaño de partícula y la dispersión	1 c
4	300.5	140.3	185.9	Aumenta el tamaño de partícula y la dispersión	1 d
5	447.1	246.9	246.0	Incremento del tamaño de partícula y dispersión	1 e
6	123.9	69.5	9.46	Incremento del tamaño de partícula y dispersión alta	1 f
7	67.1	60.7	63.3	Incremento del tamaño de partícula y disminución de la dispersión de las partículas	1 g

#### 8.2.4 Optimización de las condiciones de mezclado para la formación de micropartículas

En un análisis exploratorio previo se seleccionaron y estudiaron las variables independientes mostradas en la Tabla 1. Cuando se fijó la concentración de alginato de calcio al 4% se observó un incremento en el tamaño de partícula y una disminución de la dispersión del tamaño (Tabla 3); debido a la concentración utilizada de alginato. La concentración empleada de  $\text{CaCl}_2$  fue de 170 mM.

Respecto a la temperatura de mezclado se seleccionaron dos temperaturas para ser evaluadas en el diseño experimental, estas fueron seleccionadas para asegurar que se mantengan las células probióticas viables y asegurar su fácil manejo. Los valores de velocidad de mezclado y el tiempo de mezclado

seleccionados también fueron seleccionados con el objetivo de beneficiar el fácil manejo durante la elaboración de las micropartículas.

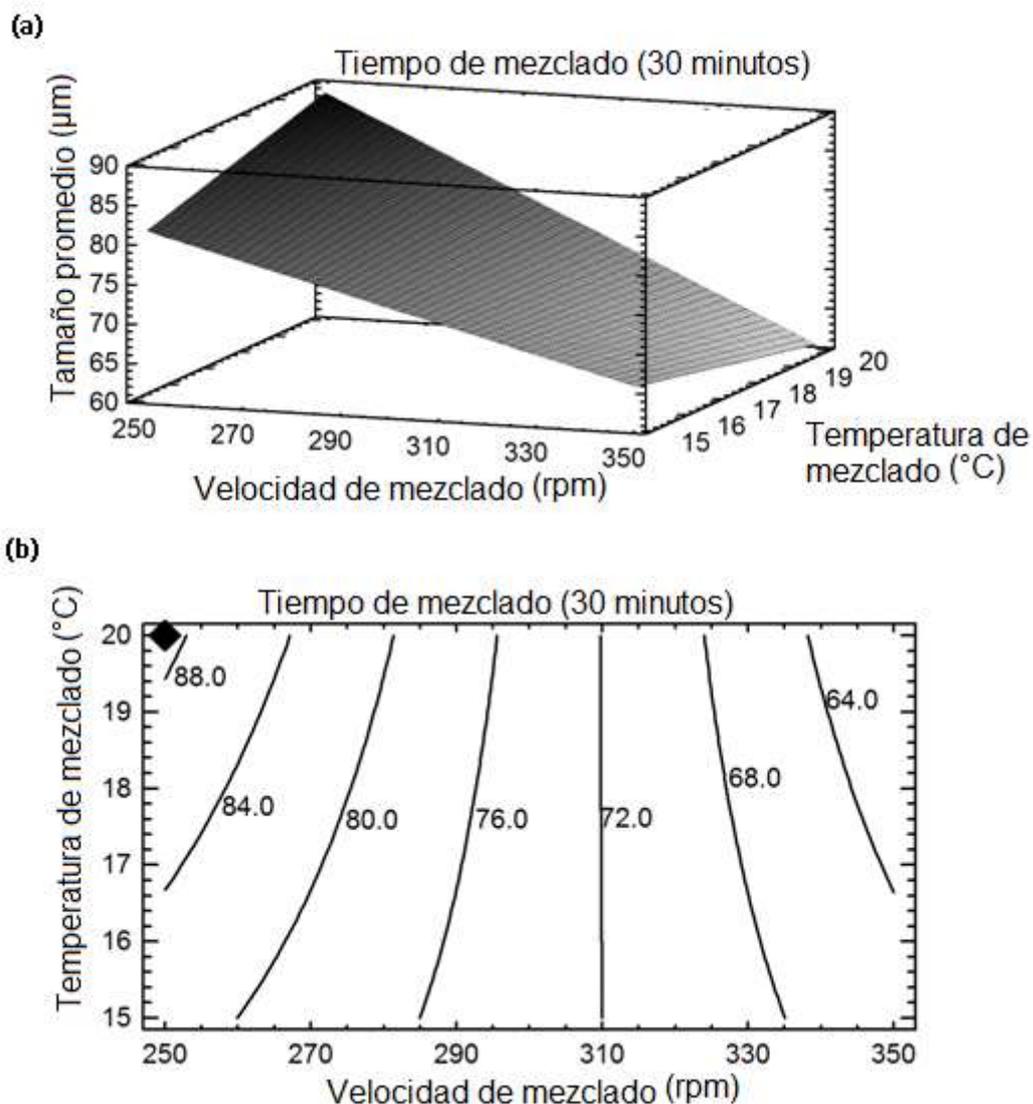
Los datos obtenidos del análisis estadístico a partir del diseño experimental, mostraron que la única variable que tiene un impacto significativo en el tamaño de partícula fue la velocidad de mezclado ( $P = 0.0001$ ). Cuando la velocidad de mezclado incrementa el tamaño de partícula disminuye. La respuesta fue ajustada a una función lineal de las variables independientes. La función aproximada del modelo de primer orden esta expresada en la ecuación 3.

### **Ecuación 3.**

$$\begin{aligned} \text{promedio} = & 39.5 + 0.26 * M_v - 1.04 * M_t + 4.83 * M_T - 0.002 * M_v * M_t - 0.024 \\ & * M_v * M_T + 0.09 * M_t * M_T \end{aligned}$$

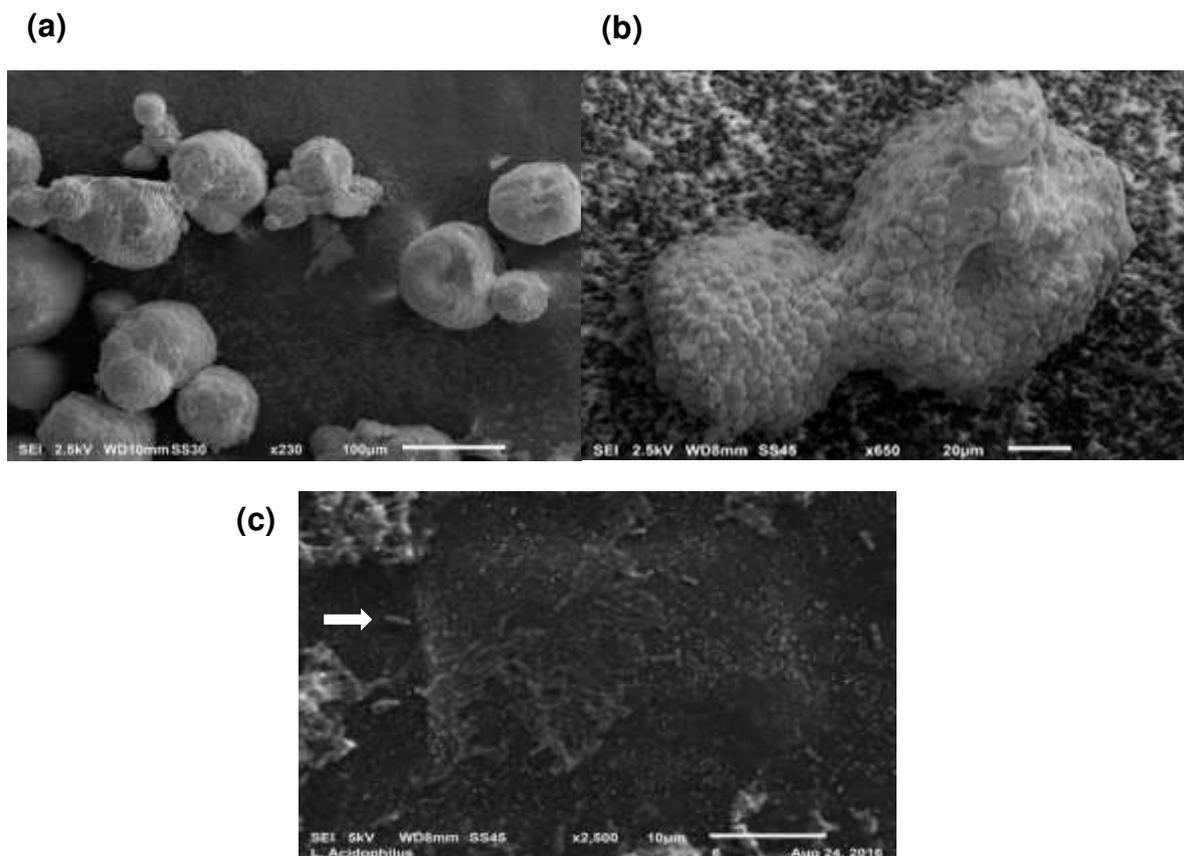
Donde  $M_v$  = velocidad de mezclado  $M_t$  = tiempo de mezclado y  $M_T$  = temperatura de mezclado

Las gráficas de superficie de respuesta y de contornos usan este modelo lineal para generar las gráficas mostradas en la figura 4, en éstas se observa que un tamaño de partícula de 89  $\mu\text{m}$  es conseguido cuando las condiciones de fabricación son velocidad de mezclado 250 rpm, tiempo de mezclado 30 min y temperatura de mezclado 20 °C. El modelo estadístico fue usado para estimar el tamaño de las micropartículas bajo esas condiciones fijadas. El promedio de los resultados por triplicado bajo esas condiciones fue de 75  $\mu\text{m}$ . Así, se decidió utilizar 250 rpm, 20 °C y 30 min para la inmovilización del probiótico.



**Figura 4.** a) Gráfica de superficie de respuesta para el tamaño de micropartículas; b) gráfica de contornos para el tamaño de las micropartículas.

La microscopía óptica y la MEB revelan que las partículas cargadas con *L. acidophilus* LA-5 fueron esféricas (Figura 5a) con un tamaño promedio de 80  $\mu\text{m}$ . Las superficies de las micropartículas con probiótico muestran protuberancias (Figura 5b), donde sus dimensiones fueron entre 1 y 4  $\mu\text{m}$ . El tamaño promedio de *L. acidophilus* LA-5 determinado por SEM fue  $2 \times 0.5 \mu\text{m}$  (Figura 5c). Por lo tanto, las protuberancias podrían ser debidas a la presencia de *L. acidophilus* LA-5.



**Figura 5.** Microscopía electrónica de barrido: (a) micropartículas con *L. acidophilus* LA-5, x230; (b) micropartículas con *L. acidophilus* LA-5, x650; (c) *L. acidophilus* LA-5, x2500.

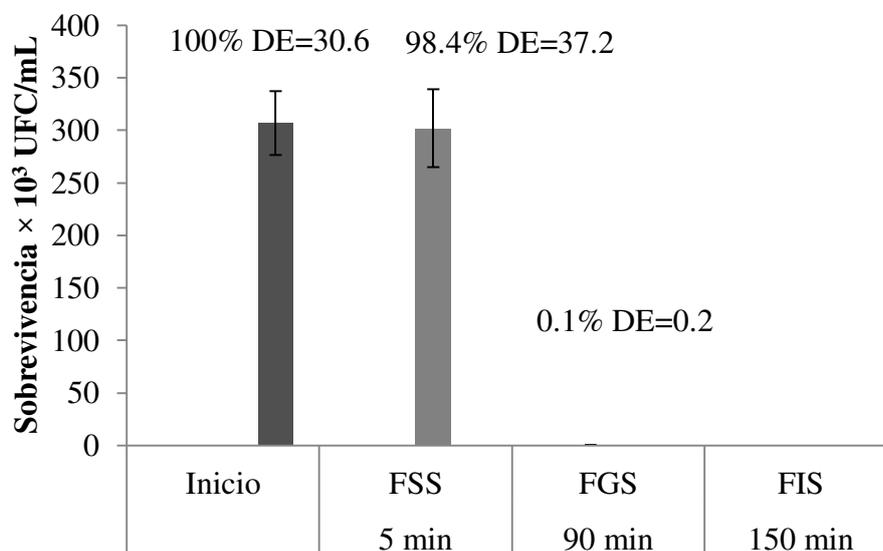
### 8.2.5 Formación de las micropartículas por emulsificación

La concentración final en la SSM fue de  $1.01 \times 10^4$  UFC/mL, debido a las diluciones realizadas durante la fabricación de las micropartículas con y sin células probióticas. En contraste, la cuenta de células viable en la SSM fue de  $1.93 \times 10^3$  UFC/mL (19.1%). Por lo tanto, las micropartículas contenían aproximadamente  $8.17 \times 10^3$  UFC/mL, correspondiente al 80.9%. En comparación, Gebara *et al.* (2013) que usaron pectina como material polimérico y proteína de suero de leche como recubrimiento encapsulante y *L. acidophilus* LA-5, al emplear el método de gelación ionotrópica obtuvieron un rendimiento de encapsulación del 84.35%. En el presente trabajo se observó que a pesar de ser diferentes los métodos, los rendimientos obtenidos fueron similares y esto puede ser porque el probiótico es

tolerante a las condiciones de trabajo o que las condiciones del proceso no son drásticas para el manejo del microorganismo.

### 8.2.6 Efecto de FSS, FGS y FIS sobre células de *L. acidophilus* LA-5 libres

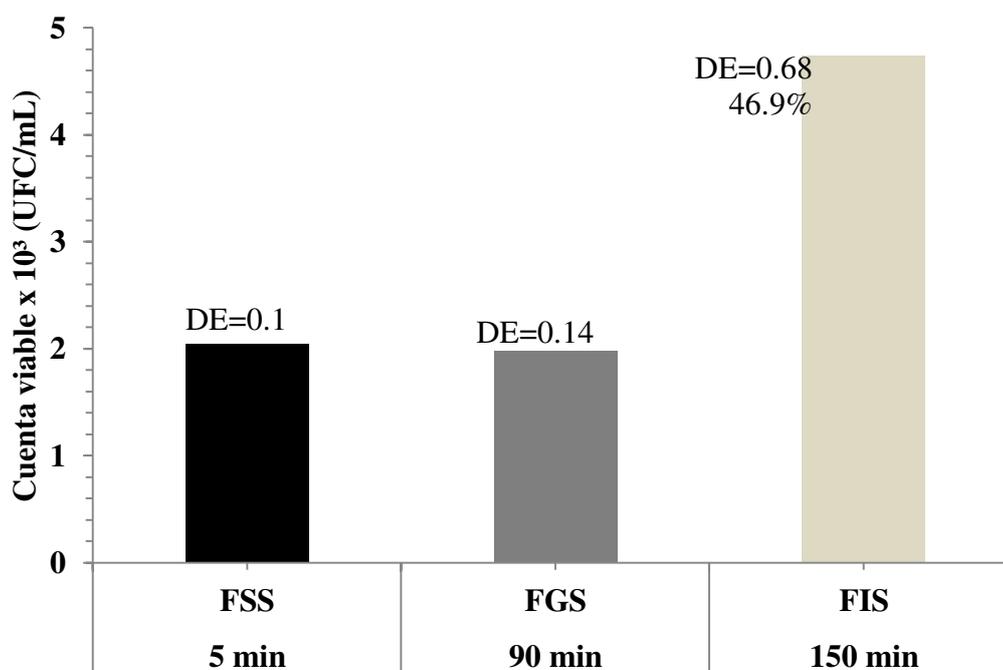
Durante el paso secuencial de las células libres de *L. acidophilus* LA-5 a través de las etapas de las condiciones del tracto gastrointestinal simulado, la sobrevivencia relativa de *L. acidophilus* LA-5 después de pasar por FSS fue cercano a 100% (Figura 6). Después de pasar por FGS la mortalidad fue del 99.9%. Bajo el contexto de la definición de un probiótico, la células deben ser capaces de resistir el estrés gastrointestinal, arribar en concentraciones adecuadas al sitio de acción y ejercer su efecto benéfico, que para el caso de *Lactobacilli* es el intestino delgado (Fooks & Gibson., 2002). En el presente trabajo, *L. acidophilus* LA-5 no mostró resistencia al estrés gastrointestinal simulado. Por lo tanto se podría beneficiar de la protección de la inmovilización en las micropartículas. Similarmente, Gebara *et al.* (2013) reportaron en sus resultados una tendencia comparable.



**Figura 6.** Viabilidad de células de *L. acidophilus* LA-5 libres, expuestas a las condiciones del estrés del fluido gastrointestinal simulado. **FSS** fluido de saliva simulada; **FGS** fluido gástrico simulado; **FIS** fluido intestinal simulado.

### 8.2.7 Efecto del FSS, FGS y FIS en *L. acidophilus* LA-5 microencapsulado

Las micropartículas contenían aproximadamente  $1.01 \times 10^4$  UFC/mL de células de *L. acidophilus* LA-5 que fueron colocadas en las condiciones de estrés del FSS. Después de incubar en el FSS la cuenta viable fue de  $2.04 \times 10^3$  UFC/mL (Figura 7), que representa el 20.2%; por lo tanto, el 79.8% fue considerado como inmobilizado. Como se observa en las células libres de *L. acidophilus* LA-5 no fue afectada por el FSS (Figura 6). Sin embargo, debido a que la SSM contenía tanto probióticos inmobilizados como no inmobilizados (las células inmobilizadas y no inmobilizadas no fueron separadas de la SSM), se puede suponer que la cuenta de células viables determinada después de pasar por el estrés del FSS usando las micropartículas cargadas, representa el probiótico que no fue inmobilizado pero que estaba en la SSM.



**Figure 7.** Cuenta viable de *L. acidophilus* LA-5 en el FSS considerando como probiótico no inmobilizado y en FGS y FIS considerando como probiótico liberado de las micropartículas.

El progreso de las micropartículas cargadas a través de las condiciones del estrés gástrico simulado fue determinado por la centrifugación de las

micropartículas tratadas con FSS y luego expuestas al FGS. Después de la incubación en medio de FGS se determinó  $1.99 \times 10^3$  UFC/mL (19.6%), que representa los probióticos que fueron liberados de las micropartículas y que resistieron el FGS. En contraste, ninguna célula libre de *L. acidophilus* LA-5 sobrevivió bajo estas condiciones de estrés. En la presencia de ácido, el complejo alginato- $\text{Ca}^{2+}$  es escindido para formar ácido algínico, que es insoluble en medio acuoso. Además, las micropartículas tienden a mantener su estructura y su naturaleza hidrofóbica que reduce la difusión de agua dentro de la partícula (Rafi & Mahkam., 2015). Por lo tanto, se supone que la liberación podría ser debida a la agitación aplicada durante la incubación, además, la liberación debió haber ocurrido cerca del final del tiempo de incubación, que podría ser la razón de la liberación y de la sobrevivencia del probiótico. Sin embargo, esto requiere una confirmación futura.

Las micropartículas obtenidas al final del estrés del FGS fueron separadas y luego colocadas en FIS. Después de 2.5 h bajo estas condiciones se determinaron  $4.74 \times 10^3$  UFC/mL como cuenta final, que representa el 46.9% de los microorganismos contenidos en la SSM (Figura 7). Por lo tanto, un porcentaje relativamente alto en la liberación ocurre en condiciones que representan el intestino delgado, comparado con las condiciones orales y gástricas. Además, estos resultados muestran que las células fueron inmovilizadas y colocadas en el medio que representa las condiciones del intestino delgado, donde el género *Lactobacilli* ejerce su efecto benéfico. Por lo tanto, el intestino delgado es el sitio blanco para los probióticos vivos y en ese espacio éstos deber ser liberados de la matriz acarreadora (micropartículas) para ejercer su función. Además, la liberación de los microorganismos en el FIS podría ser considerado como una ventaja, porque si las micropartículas no liberan los microorganismos bajo las condiciones fisiológicas del intestino, los probióticos podrían no ejercer su efecto benéfico. Además, a pesar de la desintegración de las micropartículas expuestas de manera secuencial al FSS, FGS y FIS, la presencia del alginato en el medio podría proteger los microorganismos de la presencia de las sales biliares, que podrían por otro lado, destruir las células. Chandramouli *et al.* (2004) reportaron que la

viabilidad de las bacterias inmovilizadas en condiciones gástricas simuladas incrementa con el incremento del tamaño de partícula (200  $\mu\text{m}$ ) y menciona que las micropartículas menores a 100  $\mu\text{m}$  no protegen significativamente; sin embargo, en este trabajo con micropartículas de 80  $\mu\text{m}$  fue posible inmovilizar, proteger y liberar las células de *L. acidophilus* LA-5 en un ambiente que simula las condiciones del intestino delgado, donde este género ejerce su efecto benéfico.

Este resultado concuerda con lo reportado por Mandal *et al.* (2006), los cuales encontraron que la protección de los probióticos en FGS fue más alta cuando utilizaron alginato de sodio al 4% en comparación con concentraciones más bajas. Los autores también muestran que utilizando el método de emulsificación y una concentración de alginato al 4% para encapsular *Lactobacillus casei* NCDC-298, la viabilidad obtenida fue del 4.57% después de ser expuesta a un medio con pH 1.5 durante 1 h. Sin embargo, no reportan el tamaño de partícula generado.

Más tarde, Smilkov *et al.* (2014) reportan una protección del 22.4% en uno de sus ensayos, incluido en el diseño de experimentos con el objetivo de obtener micropartículas que confirieran mejor protección a *L. casei* 01 cuando es expuesto a pH 1.5 durante 3 h. Utilizando el método de Mandal *et al.* (2006), Smilkov *et al.* (2014) formaron micropartículas con tamaños de 8.84  $\mu\text{m}$ , empleando alginato de sodio al 4% y recubiertas con proteína de suero de leche al 3%.

La diferencia en el efecto de la protección entre las micropartículas obtenidas en el presente trabajo (46.9 %), Mandal *et al.* (2006) (4.57%) y Smilkov *et al.* (2014) (22.4%), puede ser atribuido a diferentes factores, tales como el pH del FGS utilizado en el presente trabajo que fue de 2.0, mientras que Mandal *et al.* (2006) y Smilkov *et al.* (2014) utilizaron pH 1.5. Sustancias bioactivas como la penicilina G o bacterias probióticas que son sensibles al medio ácido necesitan ser protegidas, mientras que por otro lado el pH del estómago es altamente variado, durante el ayuno este puede descender hasta pH de 1 y después de los alimentos puede incrementar hasta pH 5 (Cook *et al.*, 2013). Chandramouli *et al.* (2004)

sugieren que el tamaño de las micropartículas podría también afectar la viabilidad de los microorganismos encapsulados. A pesar de que Mandal *et al.* (2006) no publican el tamaño de las partículas generadas, mencionan que cuando el tamaño de partícula se incrementa, la protección también lo hace. Por otro lado, Smilkov *et al.* (2014) obtuvieron tamaños de partículas en un intervalo de 6.99 - 9.88  $\mu\text{m}$ , siendo considerablemente más pequeñas a las obtenidas en este trabajo (80  $\mu\text{m}$ ). Otro factor que puede influenciar la sobrevivencia celular es la sensibilidad del probiótico. Por lo que futuras investigaciones son requeridas para verificar que el tamaño de partícula es la razón de que se incremente la sobrevivencia de *L. acidophilus* LA-5 inmovilizado cuando éstas se exponen al estrés del fluido gastrointestinal simulado.

Existen algunos trabajos donde el método de gelación es usado. Por ejemplo, Chandramouli *et al.* (2004) probaron la sobrevivencia de *L. acidophilus* CSCC 2400 usando alginato al 1.8% (m/v), obteniendo una viabilidad del 0.1% después de ser incubado en FGS a pH 2 durante 3 h. Lee *et al.* (2004) investigaron el efecto de las micropartículas de alginato recubiertas con quitosan de varios pesos moleculares sobre la sobrevivencia de *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 en FGS (pH 2, 60 min); encontraron que la cubierta de quitosan en las micropartículas de alginato mejoró la sobrevivencia *L. bulgaricus* KFRI 673 en FGS. Usando el método de extrusión con una mezcla de alginato de sodio al 2.0% goma xantana al 0.15 %, maltosa al 3.0%, agar MRS al 0.11% y glicerol al 5.5%, Trabelsi *et al.* (2013) observaron un 28.8% de sobrevivencia de *L. plantarum* TN8 después de ser expuestos en FGS (10 mL de pancreatina a pH 2) durante 4 h. En otro estudio, Zhao *et al.* (2012) prepararon micropartículas por el método de extrusión usando alginato de sodio al 3%, leche descremada al 8% y el probiótico *Lactobacillus reuteri* DPC16. El intervalo del tamaño de partícula fue de 3 a 4 mm y la viabilidad celular disminuyó en menos de un ciclo logarítmico después de ser incubado en FGS (pH 1.2, pepsina 3.2 g/L) durante 2 h. Además, hubo solo un ligero decremento en la cuenta viable en FIS (Glucosa 10 g/L, extracto de levaduras 5 g/L, pancreatina 10 g/L y sales biliares a 8 g/L en disolución amortiguadora 0.1 M, pH 7.4, a pesar de la fragmentación de las micropartículas.

Además, Rodklongtan *et al.* (2014) usaron una mezcla de alginato- quitosan para formar una red no covalente reforzada con una segunda red formada por la interacción de alginato con  $\text{Ca}^{2+}$ , donde la viabilidad de *L. reuteri* KUB-AC5 microencapsulado disminuyó en un ciclo logarítmico después de ser incubado en FGS (pH 1.8) durante 180 min.

En este trabajo, observamos que el alginato sólo da protección a las células probióticas, lo cual podría ser explicado por la concentración utilizada como se ha reportado en estudios previos (Mandal *et al.*, 2006). Chandramouli *et al.* (2004) sugieren que cuando se incrementa la concentración del biopolímero (alginato de sodio), el número de sitios de unión para el ion  $\text{Ca}^{2+}$  se incrementa y consecuentemente, se formará una mayor densidad de entrecruzamiento de la estructura del gel, lo que podría incrementar la protección considerablemente.

## 9.0 Conclusión

Se obtuvo la inmovilización de *L. acidophilus* LA-5 por emulsificación y gelación externa usando alginato al 4% y una emulsión W/O (32:68) como una opción sustentable para la protección de probióticos que presentan sobrevivencia limitada bajo las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de manera secuencial, que reflejan las condiciones de estrés dentro del sistema digestivo humano.

Adicionalmente, las micropartículas generadas son una alternativa para la sobrevivencia de los probióticos por su paso a través del tracto gastrointestinal desde la formación de las micropartículas, liberación del probiótico vivo en un ambiente que simula las condiciones del intestino delgado, donde el género *Lactobacilli* ejerce su efecto benéfico. Vale la pena reiterar que las células fueron exitosamente inmovilizadas, protegidas y liberadas en un ambiente que simula las condiciones del intestino delgado. Además, las micropartículas fueron fácilmente preparadas y adecuadas para la producción en escala industrial, porque el material fue económico y fácil de obtener sin requerir recubrimiento adicional, evitando de esta manera tiempos prolongados del proceso.

## 10.0 Referencias

- Barba-Ostria, C. A. (2014). Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **17**, 62-76.
- Bhadoria, P.B.S. & Mahapatra, S.C. (2011). Prospects, technological aspects and limitations of probiotics a worldwide review. *European Journal Food Research and Review*, **1**, 23-42.
- 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.
- Chopde, S., Pawar, N., Kele, V. & Changade, S. (2014). Microencapsulation of probiotic bacteria of available techniques, focusing on biomaterials-a review. *Agricultural Review*, **35**, 287-294.
- Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D. & Khutoryanskiy W. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, **162**, 56-67.
- Cook, M. T., Saratoon, T., Tzortzis, G., Edwards, A., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2013). CLSM method for the dynamic observation of pH change within polymer matrices for oral delivery. *Biomacromolecules*, **14**, 387-393.
- Consulta de Expertos, F.A.O. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.
- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, **88**, s39-s49.
- Gbassi, G.K. & Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, **4**, 149-163.
- Gebara, C., Chaves, K.S., Ribeiro, M.C.E., Souza, F.N., Grosso, C.R.F. & Gigante M.L. (2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, **51**, 872-878.

- Gerez, C.L., Font de Valdez, G., Gigante, M.L. & Grosso C.R. (2012). Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Letters in Applied Microbiology*, **54**, 552-556.
- Goldin, B. R., & Gorbach, S. L. (2008). Clinical indications for probiotics: an overview. *Clinical Infectious Diseases*, **46**, S96-S100.
- González Vázquez, (2014). Estudio de la actividad sal biliar hidrolasa presente en bacterias ácido lácticas. Tesis de Doctorado de la ENCB-IPN.
- González-Vázquez, R., Azaola-Espinosa, A., Mayorga-Reyes, L., Reyes-Nava, L.A., Shah, N.P. & Rivera-Espinoza, Y. (2015). Isolation, identification and partial characterization of a *Lactobacillus casei* strain with bile salt hydrolase activity from pulque. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **7**, 242-248.
- Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., & Thomson, A. (2011). Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. World Gastroenterology Organization, Milwaukee.
- Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, **361**, 512-519.
- Gupta, R. C. (Ed.). (2016). Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity. *Academic Press*. Chapter January
- Hansen, L.T., Allan-Wojtas, P.M., Jin, Y.L. & Paulson, A.T. (2002). Survival of Calcium alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, **19**, 35-45.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Haghshenas, M., Barzegari, A., Sharifi, S., Radiah, D., Rosli, R. & N. Abdullah. (2015). Effect of addition of inulin and fenugreek on the survival of microencapsulated *Enterococcus durans* 39C in alginate-psyllium polymeric blends in simulated digestive system and yogurt. *Asian Journal of pharmaceutical sciences*, **10**, 350-361.
- Hollebeeck, S., Borlon, F., Schneider, Y. J., Larondelle, Y., & Rogez, H. (2013). Development of a standardised human in vitro digestion protocol based on macronutrient digestion using response surface methodology. *Food chemistry*, **138**, 1936-1944.

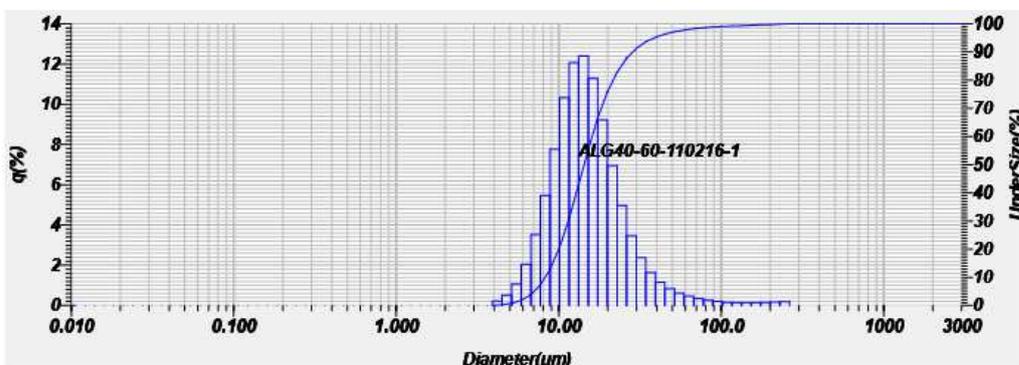
- Icaza-Chavez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, **78**, 240-248.
- Jia, X., Wang, W., Song, Y., & Li, N. (2011). A 90-day oral toxicity study on a new strain of *Lactobacillus paracasei* in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 1148-1151.
- Johnson, B. R., & Klaenhammer, T. R. (2014). Impact of genomics on the field of probiotic research: historical perspectives to modern paradigms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **106**, 141-156.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, **14**, 737-743.
- Lee, J.S., Cha, D.S. & Park, H.J. (2004). Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7300-7305.
- Li, X.Y., Chen, X.G., Cha, D.S., Park, H.J. & Liu, C.S. (2009). Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties. *Journal of Microencapsulation*, **26**, 315-324.
- Mandal, S., Puniya, A.K. & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, **16**, 1190-1195.
- Matias, N.S., Padilha, M., Bedani, R. & Saad, S.M.I. (2016). *In vitro* gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. *International Journal of Food Microbiology*, **234**, 83-93.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, **12**, 173-182.
- Medellin-Peña, M. J. & Griffiths, M. W. (2009). Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157: H7 colonization. *Applied and environmental microbiology*, **75**(4), 1165-1172.

- Montgomery, D. C. (2010). Diseño y análisis de experimentos. Editorial Limusa Wiley, Segunda edición.
- Nord, C. E., Lidbeck, A., Orrhage, K., & Sjöstedt, S. (1997). Oral supplementation with lactic acid-producing bacteria during intake of clindamycin. *Clinical Microbiology and Infection*, **3**, 124-132.
- Rafi, A. A. & Mahkam, M. (2015). Preparation of magnetic pH-sensitive microcapsules with an alginate base as colon specific drug delivery systems through an entirely green route. *RSC Advances*, **5**, 4628-4638.
- Reyes-Nava, L.A., Garduño-Siciliano, L., Santos, E.L.P. & Hernández-Sánchez, H. (2016). Use of bile acids as a selection strategy for lactobacillus strains with probiotic potential. *Journal of Food and Nutritional Disorders*, **5**, 1-2.
- Rodklongtan, A., La-ongkham, O., Nitisinprasert, S. & Chitprasert, P. (2014). Enhancement of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 survival in broiler gastrointestinal tract by microencapsulation with alginate–chitosan semi-interpenetrating polymer networks. *Journal of Applied Microbiology*, **117**, 227-238.
- Rokka, S. & Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, **231**, 1-12.
- Pawar, S. N., & Edgar, K. J. (2012). Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, **33**(11), 3279-3305.
- Silva, C.M., Ribeiro, A.J., Figueiredo, I.V., Gonçalves, A.R. & Veiga, F. (2006) Alginate microspheres prepared by internal gelation: development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics*, **311**, 1-10.
- Smilkov, K., Petreska Ivanovska, T., Petrushevska Tozi, L., Petkovska, R., Hadjieva, J., Popovski, E., & Mladenovska, K. (2014). Optimization of the formulation for preparing *Lactobacillus casei* loaded whey protein-Ca-alginate microparticles using full-factorial design. *Journal of Microencapsulation*, **31**, 166-175.

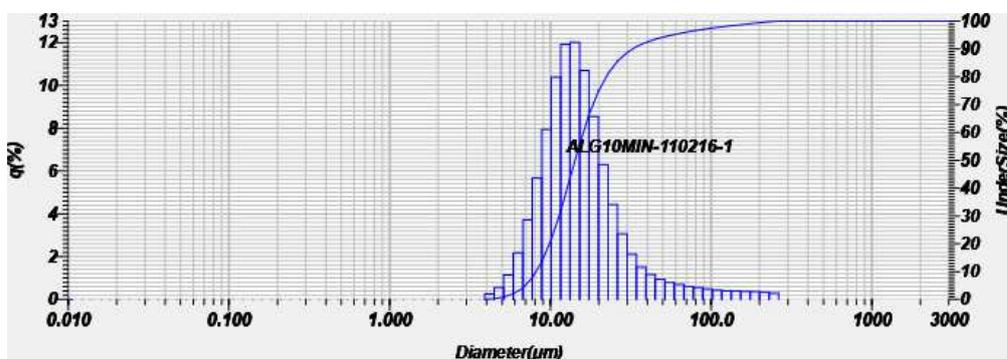
- Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X. & Ma, X. (2013). Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate polymers*, **96**, 181-189.
- Trabelsi, I., Bejar, W., Ayadi, D., Chouayekh, H., Kammoun, R., Bejar, S. & Ben Salah, R. (2013). Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *International Journal of Biological Macromolecules*, **61**, 36-42.
- Wang, L., Mutch, K.J., Eastoe, J., Heenan, R.K. & Dong, J. (2008) Nanoemulsions prepared by a two-step low-energy process. *Langmuir*, **24**, 6092-6099.
- Wang, J., Korber, D. R., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2014). Entrapment, survival and release of *Bifidobacterium adolescentis* within chickpea protein-based microcapsules. *Food Research International*, **55**, 20-27.
- Zhao, Q., Mutukumira, A., Lee, S.J., Maddox, I. & Shu, Q. (2012). Functional properties of free and encapsulated *Lactobacillus reuteri* DPC16 during and after passage through a simulated gastrointestinal tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**, 61-70.

## Anexo 1

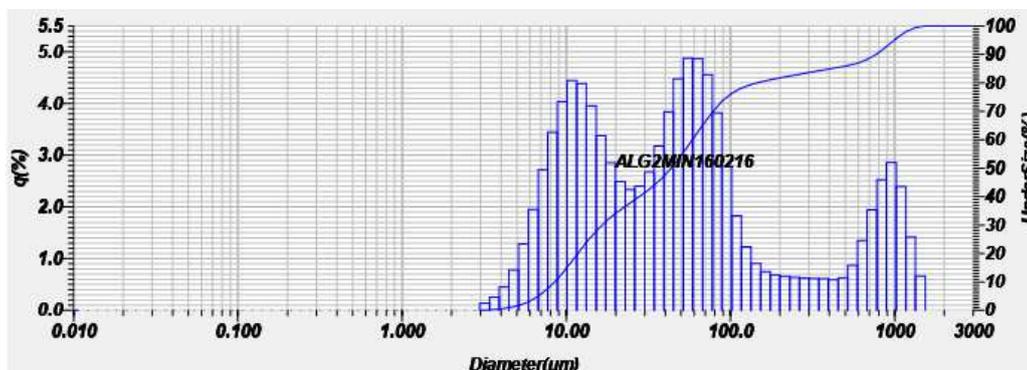
- a) Distribución del tamaño de partícula del Experimento 1. Condiciones: tiempo de mezclado 15 min; velocidad de mezclado 400 rpm; concentración de alginato 2%



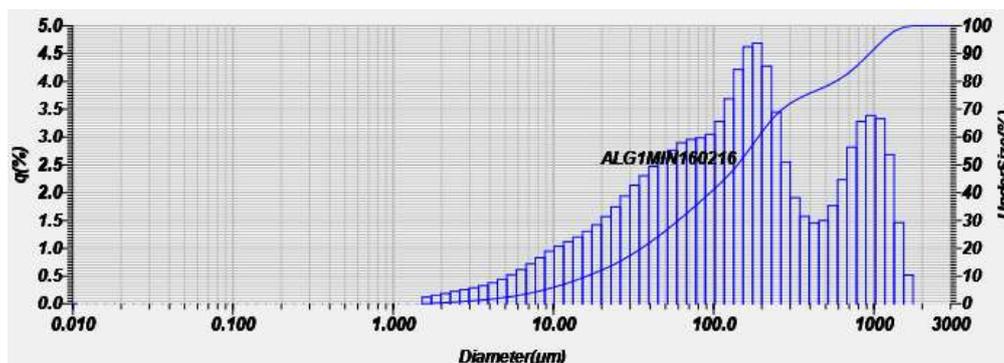
- b) Distribución del tamaño de partícula del Experimento 2. Condiciones: tiempo de mezclado 10 min; velocidad de mezclado 400 rpm; concentración de alginato 2%



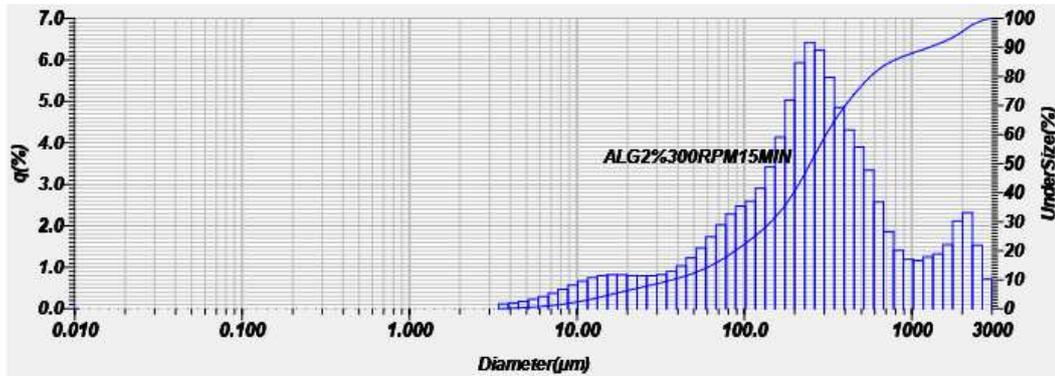
- c) Distribución del tamaño de partícula del Experimento 3. Condiciones: tiempo de mezclado 2 min; velocidad de mezclado 400 rpm; concentración de alginato 2%



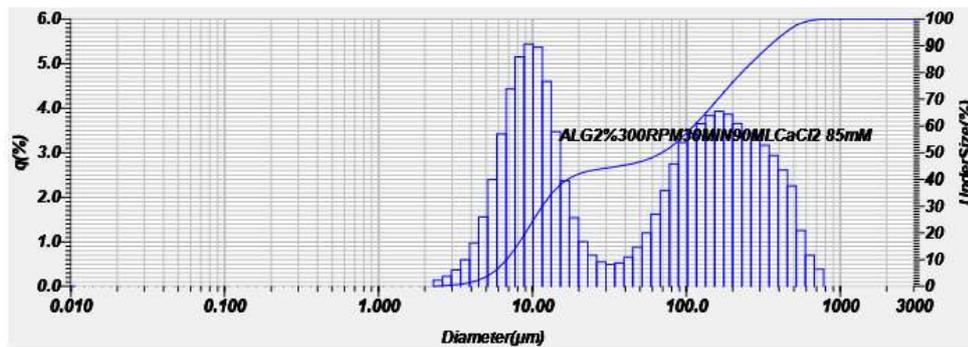
- d) Distribución del tamaño de partícula del Experimento 4. Condiciones: tiempo de mezclado 1 min; velocidad de mezclado 400 rpm; concentración de alginato 2%



- e) Distribución del tamaño de partícula del Experimento 5. Condiciones: tiempo de mezclado 15 min; velocidad de mezclado 300 rpm; concentración de alginato 2%



- f) Distribución del tamaño de partícula del Experimento 6. Condiciones: tiempo de mezclado 30 min; velocidad de mezclado 300 rpm; concentración de alginato 2%



- g) Distribución del tamaño de partícula del Experimento 6. Condiciones: tiempo de mezclado 30 min; velocidad de mezclado 300 rpm; concentración de alginato 4%

