

División de ciencias biológicas y de la salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

**Actividad antimicrobiana del quitosano sobre bacterias
probióticas**

Departamento de sistemas biológicos (DBS) Edificio N-104

Con fecha de inicio 17/03/2025 y fecha de termino 17/09/2025.

Presenta: De Jesús De Luis Diego (2203 0200 64)



Dra. Martha Adriana LeyteLugo
No. Eco. 41570



QFB Noemi Jimena Cruz Flores
No. Cedula 14517139

17/09/2025

Índice de contenido:

1. Resumen.....	2
2. Abstract	2
3. Introducción	3
4. Planteamiento del problema	4
5. Justificación	4
6. Objetivos generales y específicos	5
7. Marco teórico	5
8. Materiales y métodos	9
9. Resultados y discusión.....	10
10. Conclusión	19
11. Recomendaciones	19
12. Bibliografía	20

Actividad antimicrobiana del quitosano sobre bacterias probióticas

1. Resumen

El quitosano es un polisacárido natural derivado de la desacetilación de la quitina, caracterizado por su biocompatibilidad y propiedades antimicrobianas, por lo que es ampliamente utilizado en biotecnología y microencapsulación, mientras que el oligoquitosano es una derivatización del mismo identificado por su naturaleza química, que es aprovechado por bacterias ácido-lácticas como prebiótico. Las bacterias evaluadas son de especial interés debido a sus beneficios probióticos: *L. acidophilus* participa en la modulación de la microbiota intestinal y mejora la salud digestiva; *L. reuteri* produce compuestos antimicrobianos y contribuye al equilibrio intestinal; *L. delbrueckii* es relevante en procesos fermentativos y en la regulación inmunológica; mientras que *Heyndrickxia coagulans* destaca por su elevada capacidad de generar endosporas y por lo tanto su supervivencia en el tracto gastrointestinal, también por su capacidad para sobrevivir en condiciones adversas como el bajo pH presente en el estómago, lo que lo hace particularmente eficaz para controlar los malestares estomacales. El presente estudio se centra en evaluar el efecto del quitosano para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) que permitieran aprovechar sus propiedades protectoras sin comprometer la funcionalidad de cepas probióticas específicas: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Heyndrickxia coagulans*, mediante la exposición de dichas cepas a diferentes concentraciones de quitosano y oligoquitosano. Los resultados de esta investigación buscan contribuir al diseño de sistemas de microencapsulación más eficaces y estables, con liberación controlada de microorganismos beneficiosos, promoviendo así la salud intestinal y el bienestar general.

Palabras clave: Quitosano, CMI, Oligoquitosano

2. Abstract

Chitosan is a natural polysaccharide derived from the deacetylation of chitin, characterized by its biocompatibility and antimicrobial properties, making it widely used in biotechnology and microencapsulation. Oligochitosan is a derivatization of chitosan, identified by its chemical nature, and is utilized by lactic acid bacteria as a prebiotic. The bacteria evaluated are of particular interest due to their probiotic benefits: *L. acidophilus* participates in the modulation of the gut microbiota and improves digestive health; *L. reuteri* produces antimicrobial compounds and contributes to intestinal balance; *L. delbrueckii* is relevant in fermentation processes and immune regulation; while *Heyndrickxia coagulans* stands out for its high capacity to generate endospores and therefore its survival in the gastrointestinal tract, as well as its ability to survive in adverse conditions such as the low pH present in the stomach, making it particularly effective in controlling stomach discomfort. This study focuses on evaluating the effect of chitosan and determining its minimum inhibitory concentration (MIC) that allows the use of its protective properties without compromising the functionality of the probiotic strains: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*,

Lactobacillus delbrueckii, and *Heyndrickxia coagulans*. The strains were exposed to different concentrations of chitosan and oligochitosan. The results of this research aim to contribute to the design of more effective and stable microencapsulation systems that control the release of beneficial microorganisms, thereby promoting intestinal health and overall well-being.

3. Introducción

En los últimos años, ha habido una creciente demanda de alimentos funcionales y suplementos alimenticios que surgen como la base para la prevención de enfermedades y la promoción de la salud a través de la modulación de la microbiota intestinal. Las bacterias probióticas han desarrollado así un papel fundamental a través de efectos beneficiosos en la salud humana, es decir, que mejoran la digestión, reforzando la función inmunológica y suprimiendo microorganismos patógenos. Varias especies del género *Lactobacillus* y otras bacterias que exhiben propiedades probióticas únicas que son efectivas en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y la prevención de enfermedades gastrointestinales (NIH, 2022). A pesar del impacto positivo de los probióticos, el principal problema con el uso de probióticos es la capacidad de mantenerlos viables en el momento del procesamiento, almacenamiento y tránsito en el tracto gastrointestinal. El pH adverso, las sales biliares, la temperatura y la exposición al oxígeno pueden comprometer la vida microbiana y limitar la eficacia terapéutica (Montfort, 2020). Este desafío dio lugar a enfoques tecnológicos para defender la microbiota y mantener su aptitud para su uso en productos finales. Entre estas estrategias, se ha propuesto la microencapsulación como una alternativa efectiva de las estrategias mencionadas, ya que se basa en recubrir los microorganismos con matrices poliméricas que les proporcionan un efecto protector y facilitan su liberación controlada en el intestino (Velez, 2024). El quitosano es uno de los biopolímeros que se adoptaron para esta tarea debido a su biocompatibilidad y sus propiedades de desacetilación. Estos rasgos han establecido un perfil favorable para su aplicación en áreas biotecnológicas y farmacéuticas, por ejemplo, en sistemas de microencapsulación probiótica (Saucedo-Plascencia, 2024). El quitosano se ha desarrollado para proteger organismos probióticos, sin embargo, su potencial terapéutico es inherentemente problemático. El impacto de esto se debe principalmente a la interacción electrostática del quitosano con la membrana de las células bacterianas, lo que puede cambiar su permeabilidad y provocar actividad bacteriostática o bactericida cuando se usa en grandes dosis (Díaz et al., 2020). Por lo tanto, deben definirse concentraciones de quitosano que permitan la utilización de los efectos protectores sin pérdida de viabilidad e integridad de los microorganismos probióticos. Sin embargo, el oligoquitosano es una molécula derivada del quitosano y su naturaleza químicamente caracterizada por bajo peso molecular y su potencial como prebiótico han atraído mucho interés hacia su metabolismo cuando las bacterias del ácido láctico experimentan una reacción enzimática para mejorar su crecimiento y metabolismo. Esta dualidad funcional del quitosano y sus derivados tanto como agente antimicrobiano como sustrato prebiótico es una oportunidad importante para la optimización de la formulación probiótica y los sistemas de liberación (Saucedo-Plascencia, 2024). Dentro de este marco, en el presente estudio se dilucida el efecto del quitosano mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) y después, se estudia el efecto prebiótico del oligoquitosano sobre la supervivencia de diferentes cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus*,

Lactobacillus reuteri, *Lactobacillus delbrueckii* y *Heyndrickxia coagulans*. Para efectos de este estudio, las bacterias mencionadas anteriormente son de interés, ya que ofrecen ventajas fisiológicas, participan en la fermentación y toleran ciertas condiciones adversas del tracto gastrointestinal. Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden utilizarse para estimar niveles adecuados y factibles de quitosano y oligoquitosano para ayudar a desarrollar mejores y más robustos sistemas de microencapsulación. De este modo, se busca fomentar el desarrollo para una mayor viabilidad, liberación controlada de productos probióticos con mejor sostenibilidad, así como un potencial efecto terapéutico en la salud y el estado general de la población.

4. Planteamiento del problema

La aplicación de bacterias probióticas en alimentos y suplementos es de gran importancia para la salud humana debido a la evidencia de los beneficios de estos microorganismos para la salud intestinal y el bienestar general. Uno de los principales problemas que enfrentan es cómo preservar la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos cuando son manipulados o conservados durante el procesamiento, almacenamiento y tránsito a través del sistema digestivo. Ciertas variables ambientales como el pH ácido, la temperatura, el oxígeno y las sales biliares podrían ser los factores clave que pueden influir en la supervivencia de las bacterias probióticas y su rendimiento. Para ello, la microencapsulación ha sido considerada como un método prometedor para la protección tecnológica de los probióticos frente a estas condiciones adversas. Entre los polímeros más utilizados para la protección de bacterias se encuentra el quitosano, un biopolímero biodegradable y biocompatible. Sin embargo, el quitosano en sí mismo posee una actividad antimicrobiana inherente que (en un grado variable dependiendo de la concentración y del tipo de microorganismo en el que se esté utilizando) puede tener efectos bacteriostáticos o bactericidas, ocasionando que las bacterias probióticas que protege sean menos viables. Aunque se aplica extensamente para la protección de cepas probióticas, se sabe poco sobre la susceptibilidad específica de estas al quitosano, y los rangos de concentración que contribuyen al mantenimiento del equilibrio entre su efecto protector y sus posibles propiedades antimicrobianas. Derivados del quitosano como el oligoquitosano también han sido desarrollados como compuestos candidatos con potenciales propiedades prebióticas y se ha demostrado que mejoran el crecimiento y la viabilidad de las bacterias del ácido láctico. Sin embargo, actualmente hay información limitada sobre su efecto en cepas probióticas de interés tecnológico. Por lo tanto, es imperativo evaluar sistemáticamente la contribución del quitosano y el oligoquitosano a la viabilidad de cepas probióticas seleccionadas para sistemas de microencapsulación efectivos, donde se deben identificar concentraciones para asegurar resultados seguros y funcionales que puedan aplicarse.

5. Justificación

A pesar de la conocida potencia del quitosano para crear matrices protectoras y facilitar la liberación controlada de microorganismos beneficiosos, la actividad antimicrobiana juega un papel importante en los posibles factores de riesgo para los efectos adversos sobre la viabilidad de un producto probiótico potencialmente valioso. Es posible lograr límites aceptables para su utilización cuando

se establece una concentración mínima inhibitoria de quitosano contra cepas probióticas particulares para asegurar que el material encapsulante y los microorganismos estén en contacto compatible entre sí. Por lo tanto, el desarrollo de este trabajo proporcionará información sobre el crecimiento relativo y la viabilidad de cepas probióticas frente a dos tipos de quitosano y dos del oligoquitosano. Desde la perspectiva de la ciencia y la tecnología, la información que se obtenga a partir de este trabajo permitirá determinar la compatibilidad entre los biopolímeros y las cepas probióticas para la construcción de sistemas de microencapsulación eficientes, estables en los campos alimentario, nutracéutico y farmacéutico. Además, este trabajo tiene el potencial de proporcionar un estándar a seguir para futuros estudios sobre alimentos seguros y funcionales diseñados para la población humana, así como para una salud intestinal saludable.

6. Objetivos

General:

- Evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas probióticas seleccionadas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Heyndrickxia coagulans*) frente al quitosano, con el fin de determinar su compatibilidad para la formulación de micropartículas probióticas.

Específicos:

- Reactivar y caracterizar morfológicamente las cepas probióticas seleccionadas.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del quitosano frente a cada una de las cepas probióticas estudiadas.
- Analizar la viabilidad de las bacterias probióticas tras la exposición a diferentes concentraciones de quitosano durante distintos tiempos de contacto.

7. Marco teórico

Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas, proporcionan beneficios para la salud del huésped, especialmente en lo que respecta a la salud intestinal. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) los probióticos ejercen efectos positivos en la salud digestiva y en la modulación del sistema inmunológico (Maftei et al., 2024). Estos microorganismos, incluyen algunas levaduras y principalmente bacterias como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*, las cuales son bien conocidas por sus efectos beneficiosos sobre la microbiota intestinal y la digestión (Latif et al., 2023). Estos microorganismos se encuentran en alimentos fermentados como el yogur, kéfir y suplementos dietéticos, entre otros. Los probióticos ejercen sus efectos beneficiosos mediante diversos mecanismos que afectan principalmente a la microbiota intestinal: en primer lugar, contribuyen al equilibrio microbiano del intestino, al competir con los patógenos por nutrientes y sitios de adhesión en las mucosas intestinales, lo que ayuda a prevenir infecciones intestinales. Otro mecanismo importante es la

producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el butirato, el cual es generado por la fermentación de fibra no digerible en el colon. Estos AGCC desempeñan un papel crucial en la protección de la barrera intestinal, promoviendo la salud del colon y actuando como fuente de energía para las células intestinales (Latif et al., 2023). Los probióticos también pueden mejorar la integridad de la mucosa intestinal, lo que ayuda a prevenir la permeabilidad intestinal excesiva, también conocida como el síndrome de "intestino permeable" (Maftei et al., 2024). Los beneficios de los probióticos para la salud han sido extensamente investigados en varias áreas, especialmente en salud digestiva y sistemas inmunológicos. En términos de salud digestiva, los probióticos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han demostrado ser efectivos en la prevención y tratamiento de diarreas, especialmente aquellas causadas por infecciones bacterianas o el uso de antibióticos (Maftei et al., 2024). Además, han mostrado efectos beneficiosos en el tratamiento del síndrome del intestino irritable (SII), una afección gastrointestinal que afecta a millones de personas en todo el mundo. La administración de *Lactobacillus reuteri* ha demostrado mejorar los síntomas del SII, incluidos los dolores abdominales y la hinchazón (Latif et al., 2023). En cuanto a la salud inmunológica, se ha documentado que los probióticos son capaces de modular la respuesta inmune mediante la activación de células inmunológicas como los linfocitos T y las células dendríticas; como por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii* demostró que puede promover la polarización de los macrófagos hacia la subpoblación M2, que se caracteriza por altos niveles de expresión de IL-10 y TGF- β y bajos niveles de expresión de CD14, CD80, HLA-DR, IL-1 β , IL-12 e IFN- γ (Ahmadi et al., 2025). Por lo cual uno de sus posibles usos podría ser con fines profilácticos o terapéuticos, como por ejemplo disminuyendo la endocitosis mediada por el receptor CD14, reduciendo la presentación efectiva de autoantígenos a las células T al regular negativamente CD80 y HLA-DR, y disminuyendo la producción de citocinas inflamatorias, previniendo o aliviando así enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Ahmadi et al., 2025).

Microencapsulación de probióticos

A pesar de sus beneficios, uno de los principales desafíos en el desarrollo de productos probióticos es garantizar su estabilidad y viabilidad durante el almacenamiento, transporte y tránsito por el tracto digestivo. Factores como el pH ácido del estómago, la temperatura y la humedad pueden afectar significativamente su supervivencia. Para abordar esta problemática, se han desarrollado estrategias como la microencapsulación, que permite mejorar la estabilidad y eficacia de los probióticos en productos comerciales. La microencapsulación es una técnica que implica proteger a los probióticos al envolverlos en una cápsula o matriz protectora permitiendo su liberación controlada en un entorno específico, como el tracto gastrointestinal. Este proceso resguarda a los microorganismos de factores ambientales adversos garantizando su estabilidad durante el almacenamiento y transporte, así como su efectividad al llegar al lugar deseado (Kambhampati et al., 2023). Las técnicas más comunes de microencapsulación incluyen spray drying, coacervación, y extrusión, cada una con sus características y ventajas específicas dependiendo del tipo de probiótico y la formulación del producto. Una determinante importante en el proceso de la microencapsulación es la formulación, es decir, la elección del material de encapsulación (recubrimiento), el cual es crucial para garantizar la viabilidad de los probióticos durante el proceso de microencapsulación y su supervivencia en el tracto gastrointestinal. El material de recubrimiento adecuado debe ser capaz de formar una biopelícula

que sea cohesiva y no reactiva con el material del núcleo, permitiendo la liberación controlada. Además, es importante que el recubrimiento brinde una adecuada resistencia, flexibilidad, impermeabilidad y estabilidad a las micropartículas (Brignone et al., 2020; Cuie and Sang-Ryoung, 2024). Entre los materiales que se pueden utilizar para la microencapsulación se encuentran los polímeros, como el alginato, dextrano y goma arábica y quitosano, entre otros (Brignone et al., 2020).

Quitosano

El quitosano, es un biopolímero derivado de la quitina, compuesto por unidades de glucosa que poseen grupos amino, lo que le otorga propiedades únicas. Su estructura química le permite ser soluble en ambientes ácidos, facilitando su uso en la encapsulación de probióticos (Călinoiu et al., 2019). Además, ha demostrado ser adecuado para esta función debido a sus propiedades biocompatibles, biodegradables y mucoadhesivas. El quitosano forma una matriz protectora que resguarda las bacterias probióticas de factores ambientales y facilita su liberación controlada (Vivek et al., 2023). También, su capacidad para interactuar con las mucosas intestinales permite una liberación dirigida de los probióticos en el intestino grueso, lo que mejora su eficacia (Kambhampati et al., 2023). A pesar de sus beneficios, el uso de quitosano en la microencapsulación de probióticos presenta desafíos importantes, ya que algunos trabajos reportan su actividad antimicrobiana; si bien es eficaz contra bacterias patógenas, también puede afectar negativamente la viabilidad de los probióticos en concentraciones altas, lo que requiere un control preciso de las condiciones de uso (Vivek et al., 2023). Su propiedad antimicrobiana se debe a su carga positiva, que interfiere con la membrana celular de las bacterias, alterando su permeabilidad y promoviendo la muerte celular (Călinoiu et al., 2019). Aunque esta propiedad es beneficiosa para combatir patógenos, puede afectar la viabilidad de las bacterias probióticas, lo que requiere una optimización en su concentración. Cabe destacar que la compatibilidad entre el quitosano y las bacterias probióticas ha sido ampliamente investigada, especialmente en relación con las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB). Algunos estudios han demostrado que *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, y *Bifidobacterium* muestran diferentes grados de resistencia al quitosano, dependiendo de su concentración y las condiciones experimentales (Călinoiu et al., 2019). Sin embargo, la interacción puede ser beneficiosa cuando se usan concentraciones bajas, ya que el quitosano protege los probióticos de condiciones adversas sin afectar su viabilidad. Para evitar los efectos negativos, es necesario optimizar las condiciones de encapsulación y ajustar las concentraciones para asegurar que se mantenga la viabilidad de las bacterias sin comprometer su efectividad (Latif et al., 2023). En los últimos años, la investigación sobre la microencapsulación de probióticos ha avanzado significativamente, especialmente en lo que respecta a la optimización de las concentraciones de quitosano y las estrategias de formulación. Investigaciones recientes han mostrado que la concentración del quitosano es un factor crucial en la protección de los probióticos.

Un estudio reciente demuestra que la microencapsulación de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* utilizando quitosano mejora significativamente su estabilidad en condiciones de pH ácido y temperaturas elevadas, mientras que altas concentraciones pueden tener efectos bactericidas sobre las cepas probióticas (Călinoiu et al., 2019). Para abordar este desafío, los investigadores han propuesto el uso de quitosano combinado con otros biopolímeros como alginato, lo que mejora la

viabilidad de los probióticos sin comprometer sus propiedades antimicrobianas (Latif et al., 2023). En cuanto a las tendencias actuales, la microencapsulación de probióticos es una estrategia emergente para mejorar la eficiencia de la liberación controlada en el intestino, asegurando una mejor absorción y funcionalidad (Vivek et al., 2023). Además, se está explorando la microencapsulación en combinación con tecnologías de liberación controlada, como el uso de polímeros que responden a factores ambientales específicos (Vivek et al., 2023). Estas estrategias buscan hacer los productos probióticos más estables, eficaces y resistentes a condiciones adversas, mejorando así su aplicabilidad tanto en la industria alimentaria como farmacéutica.

Oligoquitosano

El oligoquitosano (COS, por sus siglas en inglés) es un oligómero preparado a partir de la desacetilación e hidrólisis de la quitina, un polisacárido estructural abundante en los exoesqueletos de crustáceos, insectos y hongos, que se han consolidado como biopolímeros de origen no vegetal con un amplio potencial en el ámbito biomédico, farmacéutico y alimentario (Muanprasat y Chatsudthipong, 2017). A diferencia de la quitina, el quitosano y el COS presentan mayor solubilidad, biocompatibilidad y biodisponibilidad, cualidades que amplían significativamente sus aplicaciones como prebióticos.

El oligoquitosano se obtiene a partir de la hidrólisis controlada mediante métodos químicos o enzimáticos, dando lugar a oligómeros con un grado de desacetilación superior al 90%, un grado de polimerización menor a 20 kDa y un peso molecular promedio inferior a 3.9 kDa. Estas características confieren al COS una solubilidad óptima a pH neutro y baja viscosidad, lo que facilita su absorción a nivel intestinal y su interacción con las membranas celulares (Guan G. 2022).

A diferencia del quitosano de alto peso molecular, el COS puede atravesar la barrera epitelial intestinal y alcanzar una distribución sistémica más eficiente. Su metabolismo se lleva a cabo principalmente en hígado y riñones, donde es degradado por lisozimas y enzimas hepáticas, y sus productos finales se excretan por vía renal, lo que evidencia su baja toxicidad y alta biocompatibilidad.

Diversos estudios han demostrado que el oligoquitosano no sólo presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas, sino que además actúa como un compuesto prebiótico no derivado de plantas. Su estructura rica en enlaces β -1,4-glicosídicos lo cuales son resistentes a la digestión en el intestino humano, le permite llegar intacto al colon, donde puede ser fermentado selectivamente por bacterias benéficas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Guan G. 2022).

Estudios *in vitro*, mostraron que mezclas de COS con grados de polimerización entre 2 y 8 promovían significativamente el crecimiento de bacterias ácido-lácticas de forma dosis-dependiente. Investigaciones posteriores confirmaron que el COS incrementa la abundancia de géneros beneficiosos como: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* y *Akkermansia* al mismo tiempo que reduce bacterias patógenas intestinales como *Escherichia*, *Shigella*, *Clostridium cocleatum* y *Enterococcus* (Guan G. 2022).

A nivel fisiológico, la fermentación del COS genera ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente butirato, propionato y acetato, los cuales modulan la homeostasis intestinal,

fortalecen la integridad de la barrera epitelial y ejercen un efecto antiinflamatorio local. Asimismo, se ha reportado que la administración oral de COS en modelos animales de obesidad o colitis reduce la inflamación intestinal, mejora el metabolismo glucolipídico y restaura la composición del microbioma.

La actividad prebiótica selectiva del oligoquitosano se debe a su capacidad para ser metabolizado exclusivamente por microorganismos con enzimas quitosanasas o quitinasas específicas. Las bacterias probióticas utilizan el COS como fuente de carbono y nitrógeno, lo que favorece su proliferación y la producción de metabolitos benéficos. Por el contrario, la mayoría de bacterias patógenas intestinales carecen de estas enzimas, lo que las coloca en desventaja competitiva. De este modo, el COS contribuye a modular el ecosistema intestinal, promoviendo una microbiota más diversa y funcional, capaz de generar metabolitos con efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y protectores frente a enfermedades metabólicas y gastrointestinales.

8. Materiales y métodos

Este proyecto es un estudio experimental que permitió determinar el efecto del quitosano y oligoquitosano a diferentes concentraciones sobre bacterias probióticas como lo son *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Heyndrickxia coagulans*. La metodología experimental se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología de la UAM Xochimilco y se ejecutó de la siguiente forma:

8.1 Reactivación y caracterización morfológica de cepas probióticas.

Para la reactivación de las cepas probióticas seleccionadas, se utilizó un cultivo bacteriano conservado a -20 °C con glicerol al 15 % (Gonzales P., 2023). Se tomó una alícuota de 3 µL y se sembró por el método de estría cruzada en placas de agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe), medio específico para el cultivo de bacterias ácido-lácticas. Las placas sembradas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se seleccionó una colonia aislada para proceder a la caracterización morfológica mediante tinción de Gram.

8.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Se preparó una solución stock de dos diferentes oligoquitosanos (Q1 y Q2) y dos quitosanos (Q3 y Q4) (Tabla 1) al 0.5 % (p/v), disolviendo el biopolímero en agua destilada acidificada con ácido acético glacial al 1 % (v/v) (Ordóñez-Díaz, et.al. 2020).

Tabla 1. Características de los diferentes quitosanos utilizados en el proyecto.

Quitosano	Características
Q1	SPNOL® 99% polvo de oligosacárido de quitosano
Q2	Sweeti Polvo de oligosacárido de quitosano
Q3	Sigma Aldrich 419419 / CAS 9012-76-4 C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ Poli(D-glucosamina), quitina desacetilada (>75%)

Q4	Peso molecular alto
	Viscosidad 800-2000 cP, 1 wt. % in 1% acetic acid (25 °C)
	Sigma Aldrich 448877 / CAS 9012-76-4 C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₉
	Poli(D-glucosamina), quitina desacetilada (75 – 85 %)
	Peso molecular medio
	Viscosidad 200-800 cP, 1 wt. % in 1% acetic acid (25 °C)

Se prepararon suspensiones de cada una de las cuatro cepas probióticas (20 µl) a una densidad óptica a 600 nm de 0.2 (D.O₆₀₀ 0.2), se inocularon en placas con agar MRS mediante el método de vaciado, utilizando medio de cultivo a una temperatura de 45 °C previamente fundido. Una vez solidificado el agar, se realizaron cuatro perforaciones equidistantes por placa, generando pozos de aproximadamente 6 mm de diámetro.

En cada pozo se depositaron 50 µL de diferentes concentraciones de la solución de quitosano: 0.015 %, 0.05 %, 0.1 % y 0.5 % (p/v). Como control negativo se utilizó ácido acético al 1 % (v/v) sin quitosano, aplicado en pozos independientes bajo las mismas condiciones. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, y una vez transcurrido el tiempo se evaluó la presencia de halos de inhibición formados alrededor de cada pozo. El ensayo se realizó por triplicado.

8.3 Analizar la viabilidad de las bacterias probióticas tras la exposición a diferentes concentraciones de quitosano y oligoquitosanos durante distintos tiempos de contacto.

Con el fin de analizar el efecto del quitosano sobre la viabilidad de las cepas probióticas a lo largo del tiempo, se empleó la técnica de difusión en agar. Las cepas bacterianas fueron previamente inoculadas en medio MRS mediante el método de vaciado en placa, y una vez solidificado el medio, se realizaron perforaciones para formar pozos en los que se depositaron distintas concentraciones de quitosano (0.015 %, 0.05 %, 0.1 % y 0.5 % p/v).

Las placas se incubaron a 37 °C durante 7 días en estufa, con el propósito de favorecer el crecimiento lento pero sostenido de las bacterias y permitir el análisis del efecto inhibitorio del quitosano durante un periodo prolongado de exposición. Este diseño permitió observar tanto el desarrollo de las colonias bacterianas como la estabilidad y persistencia de los halos de inhibición generados en cada concentración, sirviendo como una medida indirecta de viabilidad y resistencia bacteriana al biopolímero en función del tiempo.

8.4 Evaluación de los oligoquitosanos frente a las bacterias seleccionadas.

Para evaluar el efecto del oligoquitosano sobre el crecimiento de las cepas probióticas seleccionadas, se prepararon soluciones de los dos tipos de oligoquitosano (Q1 y Q2). Las soluciones se prepararon en medio MRS estéril a las siguientes concentraciones: 0.015 %, 0.05 %, 0.1 % y 0.5 % (p/v). Como control negativo se utilizó medio MRS sin adición de oligoquitosano. Cada concentración fue evaluada por triplicado en una placa estéril de 96 pozos. Las suspensiones bacterianas utilizadas para la inoculación fueron previamente ajustadas a una D.O₆₀₀ de 0.2, y a cada pozo se le adicionó 20 µl de la suspensión bacteriana.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Finalizado el periodo de incubación, se evaluó el crecimiento bacteriano mediante la lectura espectrofotométrica a 600 nm.

9. Resultados y discusión.

9.1 Reactivar y caracterizar morfológicamente las cepas probióticas seleccionadas.

Las cuatro cepas probióticas reactivadas a partir de cultivo en crioconservación (medio con glicerol al 15 % y -20 °C) mostraron crecimiento exitoso en agar MRS tras 24 horas de incubación a 37 °C. Al realizar la tinción de Gram, todas presentaron estructuras morfológicas uniformes y características distintivas entre cada cepa, sin indicios de contaminación cruzada (Tabla 2 y Figura 1).

Tabla 2. Descripción microscópica y Gram de las diferentes cepas probióticas.

Cepa probiótica	Gram	Descripción
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+	Bacilo largo en forma de bastón
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	Bacilo corto con extremos redondeados
<i>Lactobacillus reuteri</i>	+	Bacilo en forma de bastón corto curviforme
<i>Heyndrickxia coagulans</i>	+	Bacilo en forma de bastón alargado

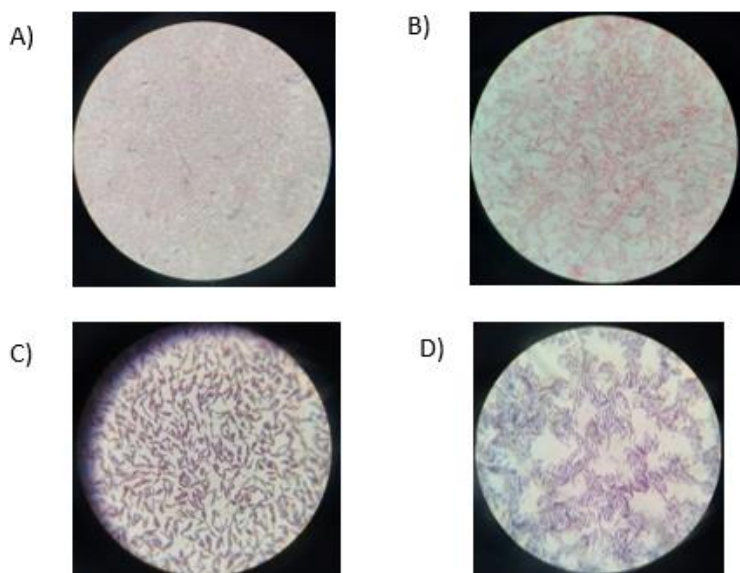


Figura 1. Tinción de Gram: A) *Lactobacillus delbrueckii*, B) *Lactobacillus acidophilus*, C) *Lactobacillus reuteri*, D) *Heyndrickxia coagulans*. Microscopio óptico con objetivo 100x aplicando aceite de inmersión.

9.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

El ensayo de difusión en agar reveló que solo a la concentración de 0.5 % de quitosano se observó inhibición del crecimiento bacteriano, con un halo promedio de 1 mm. Este halo permaneció estable incluso después de una semana de incubación, lo que sugiere un efecto sostenido. Las concentraciones de 0.015 %, 0.05 % y 0.1 % no generaron halos visibles de inhibición. El control del experimento, ácido acético al 1 %, no mostró efectos inhibitorios, lo que indica que la actividad antimicrobiana fue atribuible exclusivamente al quitosano (Figura 2).

Debido a la alta viscosidad que presenta el quitosano a concentraciones superiores al 0.5 %, la preparación de soluciones y la ejecución del ensayo resultaron complicadas, ya que afectó la solubilidad y manejo de las muestras. Lo anterior no permitió determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

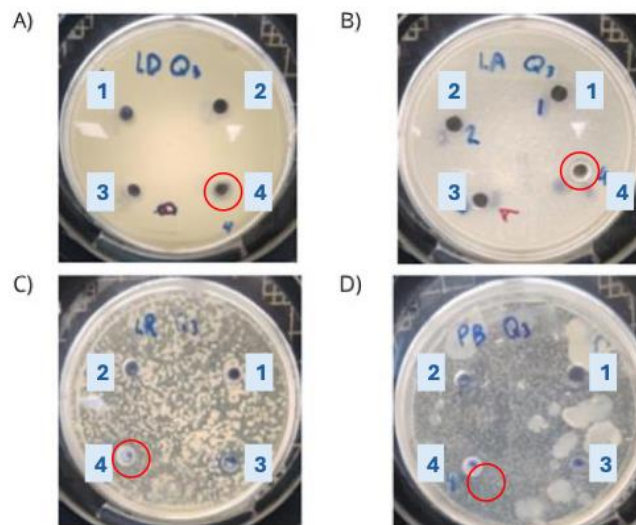


Figura 2. Efecto de las cuatro diferentes concentraciones de quitosano en: A) *Lactobacillus delbrueckii*, B) *Lactobacillus acidophilus*, C) *Lactobacillus reuteri*, D) *Heyndrickxia coagulans*. Resultados después de 1 semana en incubación a 37°C. 1: 0.015 %, 2: 0.05 %, 3: 0.1 % y 4: 0.5%.

En el análisis de la viabilidad de las bacterias probióticas después de la exposición a las diferentes concentraciones de quitosano, los resultados obtenidos en los ensayos de difusión sugieren que el efecto del quitosano sobre las cepas probióticas es altamente dependiente de la concentración. A la concentración más alta evaluada (0.5 %) se observó un halo de inhibición de aproximadamente 1 mm que permaneció visible tras una semana de incubación, indicando un efecto sostenido sobre la viabilidad bacteriana. Por el contrario, a concentraciones menores (0.015–0.1 %), no se registró inhibición visible, lo que sugiere que las bacterias son capaces de mantener su viabilidad durante periodos prolongados en presencia de quitosano a dichas concentraciones.

9.3 Evaluación de los oligoquitosanos frente a las bacterias seleccionadas.

Dentro de los reactivos que se tienen en el laboratorio de biotecnología, se encuentran dos oligoquitosanos, los cuales se incluyeron en el análisis para determinar su efecto sobre las cepas probióticas. Lo anterior con el objetivo de contribuir a una mejor comprensión de la influencia que las diferencias estructurales y fisicoquímicas de los biopolímeros ejercen sobre la viabilidad y el crecimiento bacteriano. Esta comparación permitió ampliar el alcance del proyecto y realizar un análisis entre ambos biopolímeros (quitosano y oligoquitosano) en cuanto a su efecto sobre el crecimiento de cepas probióticas.

Debido a las diferencias fisicoquímicas entre el quitosano y el oligoquitosano, particularmente en cuanto a solubilidad y viscosidad, la evaluación de su efecto sobre las cepas probióticas se realizó mediante metodologías distintas. El quitosano de mayor peso molecular fue evaluado mediante ensayos de difusión en agar, técnica adecuada para compuestos con limitada difusión en medios líquidos, mientras que el oligoquitosano, caracterizado por su alta solubilidad y baja viscosidad, fue evaluado mediante ensayos en microplaca con medición de densidad óptica (D_{600}).

Los resultados permitieron observar que, a diferencia del quitosano, el oligoquitosano no inhibió el crecimiento bacteriano. Al contrario, las curvas de crecimiento obtenidas indicaron que a mayores concentraciones, especialmente 0.5 %, las cepas mostraron un crecimiento incluso superior al del control sin oligoquitosano. Esto sugiere un posible efecto prebiótico, donde el oligoquitosano pudo haber sido metabolizado por las bacterias como fuente de carbono y estimulador del crecimiento (Guan G. 2022). Este hallazgo sugiere que el oligoquitosano puede actuar como fuente alternativa de carbono y nitrógeno, o bien, como un compuesto de efecto prebiótico, capaz de favorecer el desarrollo y la viabilidad de microorganismos benéficos.

A continuación se describen algunas observaciones de cada una de las cepas probióticas al ser expuestas al oligoquitosano:

Lactobacillus delbrueckii

La fase lag (fase de latencia: periodo inicial en el crecimiento microbiano) muestra ser breve (< 2 h), indicando que *L. delbrueckii* (L.d) se adapta rápidamente a las condiciones del medio, incluso en presencia de oligoquitosano (Figura 3). A partir de que termina la fase lag y hasta las 10 h se observa la fase exponencial donde todas las curvas muestran una pendiente positiva, indicativa de crecimiento activo. Sin embargo, se observan diferencias en la velocidad de crecimiento entre el control y los cultivos con oligoquitosano: el control (L.d C) presenta un crecimiento sostenido, alcanzando una $D.O \sim 1.3$. Los resultados muestran que el oligoquitosano Q1, a concentraciones de 0.05% y 0.1%, tiene un ligero efecto sobre el crecimiento de *L. delbrueckii* entre las 6 y 12 h. Sin embargo, el oligoquitosano Q2, a concentraciones de 0.05% y 0.1%, presentan un crecimiento más pronunciado, manteniéndolo hasta las 17 h ($D.O \sim 1.6$), que fue el tiempo de monitoreo.

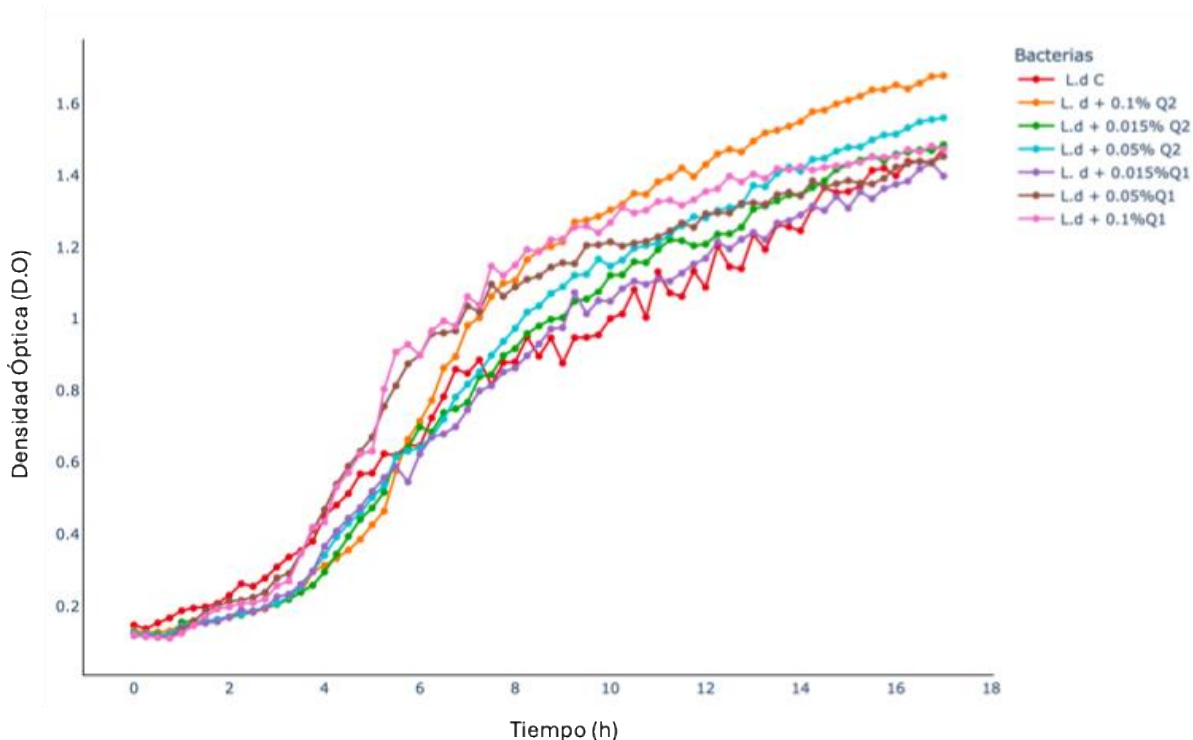


Figura 3. Cinética de crecimiento para *L. delbrueckii* (L.d) usando 3 diferentes concentraciones (0.015, 0.05 y 0.1 %) y 2 reactivos comerciales de ologokitosano (Q1 y Q2).

El crecimiento observado indica que *L. delbrueckii* no solo tolera la presencia de oligokitosano, sino que puede beneficiarse de él, especialmente del Q2 al concentraciones de 0.05% y 0.1%. El oligokitosano Q2 muestra un efecto estimulante sobre la cinética de crecimiento, probablemente actuando como fuente de carbono accesible o como estimulador metabólico (efecto prebiótico). La diferencia entre Q1 y Q2 podría deberse a variaciones en el peso molecular, grado de desacetilación o solubilidad, que influyen en la forma en que las bacterias interactúan con el compuesto como lo describe Yudati y colaboradores (2021), quienes reportan estudios que indican que las características estructurales del oligokitosano, como su grado de polimerización (DP) y su grado de acetilación (DA), son cruciales para su actividad prebiótica.

L. delbrueckii mostró una buena tolerancia a ambos oligokitosano, sin evidencia de inhibición del crecimiento. En particular, el tratamiento con oligokitosano Q2 al 0.1% favoreció significativamente la densidad óptica alcanzada en fase estacionaria, lo que sugiere un efecto positivo sobre su viabilidad y actividad metabólica. Estos resultados respaldan el potencial uso de este compuesto como suplemento prebiótico.

Lactobacillus acidophilus

De acuerdo a lo observado en la fase lag, en todas las condiciones, la curva permanece estable durante las primeras 5 horas (Figura 4). Esto indica una fase lag prolongada, común en *L. acidophilus* (L.a), que puede deberse a su necesidad de adaptarse al medio o a la presencia del oligokitosano. A partir de la hora 6, se inicia un crecimiento exponencial en todas las condiciones. La cepa en presencia del oligokitosano Q2, en sus diferentes concentraciones, muestran el mayor

incremento. Cabe destacar que el oligoquitosano Q1 también muestra un crecimiento superior al control, especialmente a una concentración de 0.1 %.

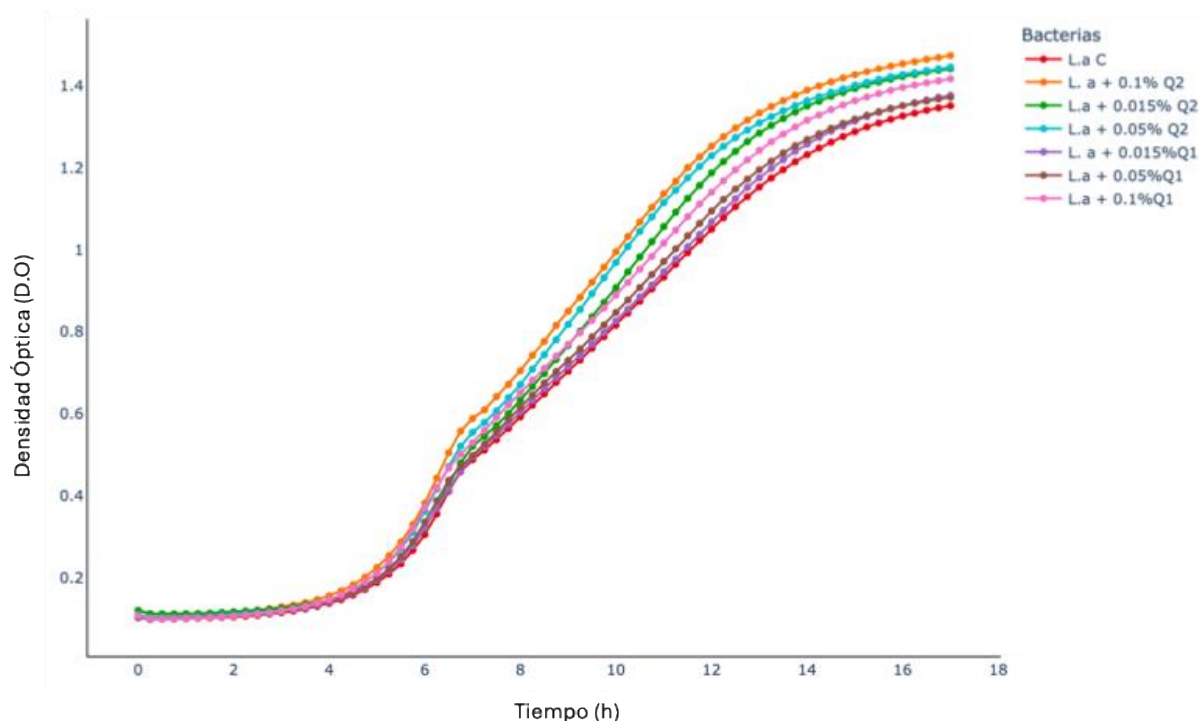


Figura 4. Cinética de crecimiento correspondiente a *L. acidophilus* usando 3 diferentes concentraciones (0.015, 0.05 y 0.1 %) y 2 reactivos comerciales de oligoquitosano (Q1 y Q2).

Estos hallazgos son consistentes con lo reportado por Lee y colaboradores (2002), quienes demostraron que los oligoquitosanos en concentraciones de 0.1 % a 0.5 % promovieron significativamente el crecimiento de *Lactobacillus sp.* y *Bifidobacterium bifidum*, incrementando tanto la tasa específica de crecimiento como la densidad celular máxima. En su estudio, la suplementación con 0.1 % de oligoquitosano aumentó el crecimiento de *Lactobacillus brevis* en un 25 % respecto al control, además de reducir el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria. Este comportamiento coincide con los resultados observados en *L. acidophilus*, donde el incremento y la aceleración del crecimiento confirman el efecto prebiótico de los oligoquitosanos.

El comportamiento similar observado entre los oligoquitosanos Q1 y Q2 sugiere que *L. acidophilus* utiliza ambos oligoquitosanos independientemente de sus características estructurales, posiblemente porque ambos presentan un grado de polimerización bajo (dp 2–8) y un nivel de desacetilación elevado, características que favorecen su solubilidad y disponibilidad metabólica. Sin embargo, el ligero aumento de crecimiento con Q2 al 0.1 % podría atribuirse a variaciones en el patrón de oligomerización o peso molecular, factores que influyen en la interacción entre el oligoquitosano y la superficie celular bacteriana, tal como también se menciona en el estudio de Lee y colaboradores (2000).

Lactobacillus reuteri

La fase lag fue muy corta para este microorganismo, lo cual sugiere que *L. reuteri* (L.r) se adapta rápidamente al medio, incluso en presencia de oligoquitosano (Figura 5).

Con relación a la fase de exponencial, todas las condiciones, incluyendo el control muestran una pendiente de crecimiento positiva y similar, alcanzando un máximo crecimiento a las 6–7 horas. Es muy importante destacar que ambos oligoquitosanos no muestran efecto marcado entre las distintas concentraciones en esta fase, lo cual indica que no interfiere con el crecimiento inicial de la cepa. Esto demuestra que *L. reuteri* mantiene una cinética de crecimiento uniforme y no se ve afectada por la adición de oligoquitosano, lo cual coincide con los hallazgos de Yudiati y colaboradores (2021), quienes reportaron que el crecimiento de *Lactobacillus spp* no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) entre los tratamientos con diferentes tipos y concentraciones de quitosano y oligoquitosano, a diferencia de *Streptococcus thermophilus*, que sí mostró una respuesta estimulada. Los autores atribuyeron este comportamiento a la selectividad metabólica de cada cepa frente al uso de oligosacáridos como fuente de carbono, un rasgo común entre los lactobacilos.

L. reuteri mostró una cinética de crecimiento altamente uniforme frente a todos los tratamientos evaluados. Las diferencias entre el control y los tratamientos con oligoquitosano son mínimas, lo cual indica que esta cepa tiene una alta tolerancia a ambos tipos de oligoquitosano, sin presentar inhibición significativa. Estos resultados sugieren que *L. reuteri* es una cepa resistente al oligoquitosano y podría incorporarse sin riesgo en productos que contengan este tipo de biopolímeros.

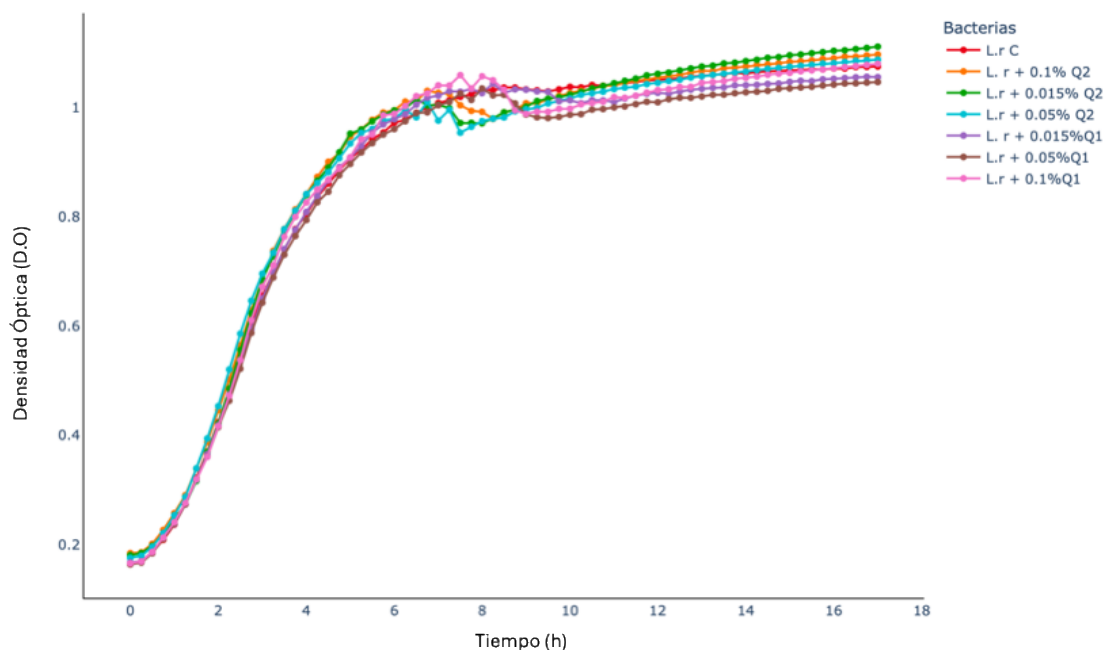


Figura 5. Cinética de crecimiento para *Lactobacillus reuteri* (L.r) usando 3 diferentes concentraciones (0.015, 0.05 y 0.1 %) y 2 reactivos comerciales de oligoquitosano (Q1 y Q2).

Heyndrickxia coagulans

Para esta cepa, la fase lag muestra una fase de adaptación prolongada, entre 7–8 horas; lo que sugiere que esta especie requiere más tiempo para adaptarse al medio MRS y/o a la presencia del oligoquitosano (Figura 6).

A partir de la hora 8, comienza la fase de crecimiento exponencial, hasta las 14 horas que se alcanza a observar que inicia la fase estacionaria. En el caso de el oligoquitosano Q2 a una concentración de 0.05% se observa un crecimiento significativamente menor.

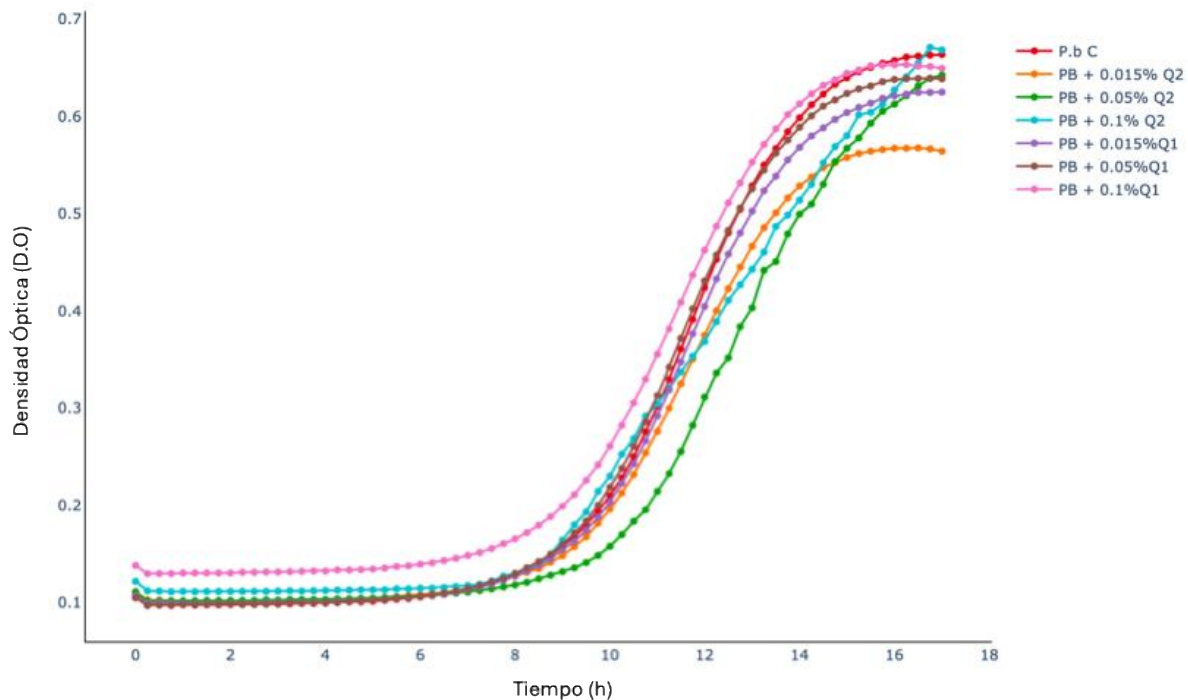


Figura 6. Cinética de crecimiento para *Heyndrickxia coagulans* usando 3 diferentes concentraciones (0.015, 0.05 y 0.1 %) y 2 reactivos comerciales de oligoquitosano (Q1 y Q2).

Heyndrickxia coagulans mostró un crecimiento positivo y sostenido en presencia de oligoquitosano, con diferencias no significativas entre concentraciones. Lo que se observa en los resultados obtenidos es que la presencia del oligoquitosano disminuye ligeramente el crecimiento de microorganismo.

10. Conclusión

El efecto del quitosano y el oligoquitosano sobre la viabilidad de cepas probióticas de interés tecnológico, especialmente de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Heyndrickxia coagulans*, fue evaluado sistemáticamente en este estudio. Los resultados demostraron que el quitosano tiene actividad antimicrobiana que depende de la concentración y el tiempo de contacto, con respuestas variables entre las diferentes cepas evaluadas,

validando la necesidad de encontrar concentraciones seguras para ser utilizadas en sistemas de microencapsulación. La identificación de la concentración mínima inhibitoria de quitosano permitió establecer que este compuesto no afectan a los microorganismos probióticos, es decir, que podría ser utilizado en la formulación para el desarrollo de producto farmacéuticos.

11. Recomendaciones

Se sugiere que los métodos diseñados o ajustados a las características físicas y químicas del quitosano, como su alta viscosidad y solubilidad limitada a altas concentraciones, sean formulados o modificados. Esto mejorará el tratamiento con el biopolímero, apoyará la reproducibilidad de las pruebas y ayudará en la evaluación de su acción antimicrobiana en cepas probióticas.

Dado que el potencial efecto prebiótico del oligoquitosano es considerable, se aconseja una comparación sistemática de quitosano y oligoquitosanos de diferentes pesos moleculares y grados de desacetilación para ayudar a seleccionar la estrategia óptima de moduladores microbianos.

12. Referencias

1. Ahmadi, P., Mahmoudi, M., Rafatpanah, H., Rezaieyazdi, Z., Ahmadi-Khorram, M., Javanmardi, Z., Tabasi, N. S., & Esmaeili, S. (2025). The Impacts of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus rhamnosus* to Promote In Vitro Anti-Inflammatory Profile of RA-Macrophages. *Food Science & Nutrition*, 13(3). <https://doi.org/10.1002/fsn3.70068>
2. Brignone, S.G., Ravetii, S., Palma, S.D. (2020). Microencapsulación/recubrimiento de sistemas particulados de uso farmacéutico. *Pharmaceutical Technology*, 165. 34-43.
3. Călinoiu, L.-F., Ștefănescu, B. E., Pop, I. D., Muntean, L., & Vodnar, D. C. (2020). Chitosan coating applications in probiotic microencapsulation. *Coatings*, 9(3), 194.
4. Castillo-Escandón, V., Fernández-Michel, S. G., Cueto-Wong, M. C., & Ramos-Clamont Montfort, G. (2020). Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22, 1-17. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.173>
5. Cuie, Y. and Sang-Ryoung, K. (2024). Microencapsulation for Pharmaceutical Applications: A Review. *ACS Applied Bio Materials*, 7, 692–710. <https://doi.org/10.1021/acsabm.3c00776>
6. González Pérez, C. (2023). Panorama actual de los métodos de conservación de bacterias ácido-lácticas y de las colecciones de microorganismos.
7. Guan, G., & Feng, S. (2022). Chitosan and chitoooligosaccharide: The promising non-plant-derived prebiotics with multiple biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 6761. <https://doi.org/10.3390/ijms23136761>
8. Kambhampati, V., Mishra, S., Pradhan, R. C., Nagarajan, M., Kumar, P. K., Singh, S. S., Manvi, D., & Gowda, N. A. (2023). A comprehensive review on microencapsulation of

- probiotics: technology, carriers and current trends. *Applied Food Research*, 3, 100248. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100248>
9. Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman, A., Riaz, T., Aadil, R. M., Khan, I. M., Özogul, F., Rocha, J. M., Esatbeyoglu, T., & Korma, S. A. (2023). Probiotics: Mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1216674. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216674>
 10. Lee, H.-W., Park, Y.-S., Jung, J.-S., & Shin, W.-S. (2002). Chitosan oligosaccharides (dp 2–8) have a prebiotic effect on *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. *Anaerobe*, 8(5), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S1075-9964\(03\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S1075-9964(03)00030-1)
 11. Maftai, N.-M., Raileanu, C. R., Balta, A. A., Ambrose, L., Boev, M., Marin, D. B., & Lisa, E. L. (2024). The potential impact of probiotics on human health: An update on their health-promoting properties. *Microorganisms*, 12(2), 234. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020234>
 12. Malavé Castellano, I. G., Colina Rincón, M. N., Zerpa Caldera, Y. F., & Lobo de Márquez, R. A. (2021). Estudio sobre la aplicación de quitosano para la cura de lesiones y heridas de la piel. *Revista Bases de la Ciencia*, 6(2), 95-112. https://doi.org/10.33936/rev_bas_de_la_ciencia.v6i2.3120
 13. Muanprasat, C. y Chatsudhipong, V. (2017). Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications. *Pharmacology & Therapeutics*, 170, 80-97. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.013>
 14. National Institutes of Health. (2022). Probióticos: Datos en español. Oficina de Suplementos Dietéticos. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Probiotics-DatosEnEspanol/>
 15. Ordóñez-Díaz, J. L., Fernández-Díaz, C., Zuasti-Sánchez, E., Landi, M. M., Moreno-Rojas, J. M., & Pereira-Caro, G. (2020). Elaboración de microencapsulados de bacterias probióticas para mejorar los efectos saludables de los alimentos. Junta de Andalucía, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA).
 16. Paredes-Aguilar, M. de la C., Argüelles-Monal, W. M., Gastélum-Franco, M. G., Silva-Vázquez, R., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2024). Efecto antimicrobiano de quitosano en base a las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas (CMI, CMB) en 5 especies de *Vibrio*. *XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Recuperado de <https://www.uach.mx>
 17. Saucedo-Plascencia, M. D., Guevara Martínez, S. J., Zamudio-Ojeda, A., & Castillo-Romero, A. (2023). Nanopartículas de quitosano: una prometedora estrategia para combatir la resistencia a antimicrobianos. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(1), 9562-9575.
 18. Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R. C., & Nanje Gowda, N. A. (2022). Materials used for the microencapsulation of probiotic bacteria in the food industry. *Molecules*, 27(10), 3321. <https://doi.org/10.3390/molecules27103321>
 19. Yudiati, E., Sedjati, S., Susanto, A., Azhar, N., & Alghazeer, R. (2021). Potency of Chitosan and Chito oligochitosan (COS) from Marine Shrimp Shells as Prebiotics for *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* Probiotics. *Jurnal Kelautan Tropis*, 24(1), 25–33.
 20. Zambrano Vélez, M. I., Vera Zambrano, A. M., & Vera Arteaga, T. A. (2024). Microencapsulación en la industria alimentaria: avances y tendencias actuales. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 9(2), 51-60. <https://doi.org/10.24054/limentech.v9i2.9717411>