

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



“EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE *Lactobacillus acidophilus* ENCAPSULADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALGINATO”

TRABAJO FIN DE GRADO

Julio/2019

Autor: Judit Sancho Mascarell

Tutor/es: Estefanía Valero Cases

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen beneficios en la salud del huésped. Su supervivencia se ve afectada frente a condiciones adversas por lo que mediante la microencapsulación se pretende protegerlos y aumentar su resistencia. El objetivo del trabajo fue encapsular el *Lactobacillus acidophilus* mediante la técnica de extrusión e investigar el efecto protector del alginato modificando su concentración (2, 4 y 6 %). Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de las cápsulas obtenidas y el efecto protector de las cápsulas en la digestión *in vitro*. El microorganismo encapsulado con un 6% de alginato mostró la mayor supervivencia después de ser encapsulado y bajo las condiciones gastrointestinales simuladas ($\geq 10^6$ UFC g⁻¹).

Palabras clave: microencapsulación, extrusión, probiótico, digestión *in vitro*, protección

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that administered in the right amounts they can exert benefits on human's health. Their survival can be affected adverse conditions and through microencapsulation they can protect and increase their resistance. The main objective of this work was to encapsulate the *Lactobacillus acidophilus* by extrusion technique with different concentrations (2, 4 y 6%) to investigate the alginate's protective effect. The physicochemical properties of the capsules obtained and the protective effect of them on the *in vitro* digestion were evaluated. The microorganism encapsulated with 6% of alginate showed the highest survival effect after being encapsulated and under simulated gastrointestinal conditions ($\geq 10^6$ CFU g⁻¹).

Keywords: microencapsulation, extrusion, probiotic, *in vitro* digestion, protection

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. PROBIÓTICO. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	9
1.2. IMPORTANCIA DE LA MICROENCAPSULACIÓN EN PROBIÓTICOS .	10
1.3. EFECTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN EN EL SISTEMA GASTROINTESTINAL	11
1.4. TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS.....	12
1.4.1. Secado por aspersión	12
1.4.2. Emulsificación	13
1.4.3. Liofilización.....	13
1.4.4. Extrusión.....	13
1.5. AGENTES ENCAPSULANTES.....	14
1.5.1. Alginato.	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. ACTIVACIÓN DE <i>Lactobacillus acidophilus</i>	18
3.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ENCAPSULACIÓN.	18
3.4. SUPERVIVENCIA DEL <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> ENCAPSULADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALGINATO EN CONDICIONES GASTROINTESTINALES <i>IN VITRO</i>	19
3.5. VIABILIDAD DE <i>L. acidophilus</i>	20

3.6. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS CÁPSULAS OBTENIDAS POR EL MÉTODO DE EXTRUSIÓN.....	20
3.6.1 Actividad del agua (a_w)	20
3.6.2 Fuerza de rotura.....	20
3.6.3 Humedad	21
3.6.5 Capacidad de retención de agua (CRA)	21
3.6.6 Eficiencia de la encapsulación	22
3.6.7 Análisis estadístico.....	22
4. RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	22
4.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS DIFERENTES CÁPSULAS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ALGINATO OBTENIDOS POR EL MÉTODO DE EXTRUSIÓN.....	22
4.1.1. Actividad de agua y humedad	22
4.1.2. Fuerza de rotura	23
4.1.3. Humedad.....	24
4.1.4. Tamaño de partícula	24
4.1.5. Capacidad de retención de agua (CRA)	25
4.2. NÚMERO DE CÉLULAS ENCAPSULADAS EN EL PROCESO DE EXTRUSIÓN.....	25
4.3. SUPERVIVENCIA DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS.....	26
5. CONCLUSIÓN.....	30
6. BIBLIOGRAFÍA.....	31

Figura 1. Estructura del alginato de sodio	14
Figura 2. Equipo de extrusión.....	19
Figura 3. Tensión nominal de rotura en función de la concentración de alginato.....	24
Figura 4. Imágenes de los distintos tipos de cápsulas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato, después de la digestión gástrica <i>in vitro</i>	27
Figura 5. Imágenes de los distintos tipos de cápsulas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato, después de la digestión intestinal <i>in vitro</i>	28

Tabla 1. Agentes encapsulantes.	15
Tabla 2. Determinaciones fisicoquímicas de las cápsulas con diferentes concentraciones de alginato obtenidas mediante la técnica de extrusión.....	25
Tabla 3. Eficiencia del proceso de encapsulación por extrusión.	26
Tabla 4. Supervivencia a la digestión in vitro del <i>L. Acidophilus</i> encapsulado con diferentes concentraciones de alginato.	29



1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, se busca que los alimentos no solo desempeñen el papel de nutrirnos, sino que, también, mejoren el estado de salud y nos aseguren en cierta medida una protección contra enfermedades como el cáncer de colon, síndrome del colon irritable o la diarrea. Muchos son los estudios científicos que avalan la relación existente entre el consumo de probióticos y el resultado positivo que producen sobre nuestra salud (Markowiak & Ślizewska, 2017; Reid, Jass, Sebulsky, & McCormick, 2014).

Los probióticos son aquellos microorganismos vivos que consumidos en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso en la salud del huésped (FAO & WHO, 2006). Los principales probióticos corresponden a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces* (Teresa, Adolfin Ruiz, & Encarnación Morales, 2015).

Entre las propiedades beneficiosas proporcionadas por los microorganismos probióticos, se incluyen la mejora del sistema inmune, el control de enfermedades inflamatorias intestinales (EII), la reducción de los agentes que contribuyen a la aparición del cáncer de colon, así como también, son usados en la prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales, diarrea y enfermedades alérgicas (Fritzen-Freire, Prudêncio, Pinto, Muñoz, & Amboni, 2013; Vondel Reyes, Arranee Chotiko, Alexander Chouljenko, 2018). Estos beneficios sobre la salud se obtienen si el alimento probiótico contiene entre 10^6 - 10^7 UFC/g o mL en el momento de su consumo (Sultan Arslan, Mustafa Erbas, Ismail Tontul, 2015) y también deben de sobrevivir al tracto gastrointestinal y alcanzar el colon para poder ejercer los efectos beneficiosos, es decir, deben de ser resistentes a las condiciones extremas propiciadas por el sistema digestivo; acidez estomacal, enzimas gástricos y pancreáticos, sales biliares, pH, el potencial redox y la actividad antimicrobiana, en general (Nagpal et al., 2012). Además, una vez que alcanzan el colon, han de ser capaces de adherirse al epitelio intestinal. Por ello, el sustrato o matriz con la que las bacterias se vehiculizan, se considera un factor importante para asegurar la supervivencia del microorganismo (Teresa et al., 2015). Por lo tanto, se han desarrollado diversas técnicas para aumentar la viabilidad de los microorganismos probióticos durante el proceso de producción de los alimentos y a lo largo del sistema digestivo.

La microencapsulación es una de las tecnologías más prometedoras para ofrecer la protección de estos microorganismos frente a las condiciones desfavorables, anteriormente mencionadas (Sneyder, Giraldo, & Montes, 2016).

Las técnicas de microencapsulación se han usado en la industria alimentaria con el fin de atrapar una sustancia sólida, líquida o gaseosa, en un material protector que las proteja del ambiente circundante (Ahmed, Akter, Lee, & Eun, 2010). Las razones más importantes por las que se encapsulan probióticos son: mejorar su manejo durante el procesamiento de alimentos, asegurar su protección, garantizar su supervivencia durante el almacenamiento de estos, y controlar el momento y el lugar de su liberación después de su consumo (Ara et al., 2015).

1.1. PROBIÓTICO. *Lactobacillus acidophilus*.

El *Lactobacillus acidophilus* pertenece al grupo de las bacterias ácido-lácticas (BAL), comúnmente conocidas por su uso en la industria alimentaria.

Las BAL son bacterias que se caracterizan por tener forma de cocos o bastones, pertenecientes al grupo de las bacterias gram-positivas y que no forman esporas, además de ser anaerobias. Su principal característica radica en que producen únicamente o mayoritariamente ácido láctico como producto final de la fermentación de los azúcares (vía homofermentativa), cabe destacar, que también pueden producir acetato, etanol y CO₂ a través de la ruta heterofermentativa.

Por lo general, son bacterias que requieren de medios ricos en nutrientes, razón por la cual, es fácil encontrarlas en alimentos como la leche. En el laboratorio, se deben de utilizar medios de cultivo específicos (MRS agar, agar Rogosa, etc.) que propicien su crecimiento para conseguir el aislamiento de estos microorganismos (Cabeza, 2006).

El *lactobacillus acidophilus* es un microorganismo que es reconocido por los efectos probióticos que aporta a la salud humana y por ser agregado frecuentemente a productos alimentarios, como en el yogurt, kéfir o en el suero láctico. Es un tipo de bacteria que la podemos encontrar dentro del cuerpo humano, suele habitar en la cavidad oral, en el aparato digestivo y en la vagina (Bull, Plummer, Marchesi, & Mahenthiralingam, 2013).

Por otra parte, esta bacteria puede definirse morfológicamente como un bacillo corto grampositivo, ya que suelen medir entre 2 y 10 µm. Tiene un crecimiento óptimo cuando

las temperaturas se encuentran entre 37- 42 °C, siendo capaz de desarrollarse incluso a una temperatura de 45 °C. De igual manera, destacan por crecer en medios con un pH ligeramente ácido, desde 5,5 a 6,5, cesando su crecimiento cuando el pH se encuentra por debajo de 4. Es una de las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* menos tolerantes al oxígeno y producen ácido láctico a través de la vía homofermentativa.

En cuanto a sus propiedades probióticas, el *Lactobacillus acidophilus* presenta fisiológicamente diversas características, tales como, estabilidad en los productos donde ha sido incorporado, resistencia a las sales biliares, soporta pH bajos, unión con las células que recubren el epitelio intestinal grueso, producción antimicrobiana y la actividad de la lactasa, todo ello ha sido demostrado en diversos estudios que se han llevado a cabo. Las características probióticas observables en el contexto de las investigaciones del campo de la alimentación son entre otras, las siguientes: inmunomodulación, disminución del colesterol sérico en sangre, mejora de la actividad de la lactosa del huésped, prevención y tratamiento de enfermedades intestinales inflamatorias (Bull et al., 2013).

1.2. IMPORTANCIA DE LA MICROENCAPSULACIÓN EN PROBIÓTICOS

En la industria alimentaria la microencapsulación es de suma importancia no solo por qué protege a los compuestos bioactivos y en específico a los probióticos cuando son introducidos dentro de un alimento, sino por qué también aumenta la vida útil del producto, permite el control de la liberación del nutriente en el sitio de acción, reduce la higroscopicidad, un material líquido puede ser convertido a polvo, ofrece estabilidad al producto durante el procesamiento, almacenamiento y transporte de este y pretende mejorar el sabor, el aroma, el valor nutritivo, las propiedades funcionales y organolépticas del producto, pero estas ventajas a su vez están relacionadas tanto con la técnica de encapsulación usada como con el agente encapsulante utilizado para la encapsulación del microorganismo (Pérez, Bueno, Brizuela, Tortoló, & Gastón, 2013).

Asimismo, en el campo de la alimentación se está buscando cada vez más el desarrollo de alimentos funcionales ya que los consumidores demandan alimentos con características nutricionales y componentes específicos que mejoren la esperanza de vida y prevengan enfermedades, es por ello por lo que existe un creciente interés en la elaboración de alimentos funcionales incorporando probióticos. Cuando los probióticos son administrados en ciertas matrices alimentarias, estos pueden verse expuestos a los efectos adversos que provocan el calor, el pH, la humedad o la temperatura, disminuyendo

su eficiencia y supervivencia y, por lo tanto, no pueden desarrollar efectivamente sus propiedades funcionales sobre nuestro organismo (Ara et al., 2015).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, los microorganismos probióticos tienen que ser capaces de atravesar el tracto gastrointestinal y llegar a implantarse en el estómago, necesitan para ello una protección que es la que le ofrece la microencapsulación (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003). Son varias las investigaciones que se han realizado y han demostrado que al incorporar probióticos encapsulados en productos alimenticios, estos han resultado ser resistentes a los bacteriófagos y al entorno estomacal. Además, de presentar una mayor estabilidad frente a las condiciones de almacenamiento y una mayor viabilidad, que los probióticos no-encapsulados (Ara et al., 2015; Krasaekoopt et al., 2003; Markowiak & Ślizewska, 2017; Pasin, González Azón, & Garriga, 2012; Rodríguez & Guerrero, 2010).

1.3. EFECTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN EN EL SISTEMA GASTROINTESTINAL

La supervivencia y la viabilidad del probiótico depende tanto de la cepa probiótica empleada, como del material encapsulante (Rodríguez & Guerrero, 2010). Las cápsulas que contienen las bacterias probióticas deben de ser de naturaleza semipermeable, finas, pero a su vez han de ser capaces de mantener vivos a los microorganismos, es decir, han de ser resistentes a las condiciones adversas del medio en el que se encuentran. Estas pueden ser diseñadas para que sean liberadas en el órgano al cual van destinadas. Las referencias científicas sustentan que estas bacterias sufren una gran degradación en el tracto gastrointestinal, es por ello por lo que hay que elegir aquellas técnicas de microencapsulación que aseguran una mayor integridad biológica de las bacterias, alcanzado una alta concentración de células vivas en el yeyuno y el íleon (Chavarri, Maranon, & Carmen, 2012).

El material utilizado para formar la microcápsula es crucial en la viabilidad del microorganismo durante su paso por el tracto digestivo, este ha de ser capaz de soportar bajos pH y efectos adversos, garantizando la supervivencia del microorganismo. Se ha comprobado que las células encapsuladas son mucho más resistentes a los jugos biliares que cuando se encuentran bajo ninguna protección, libres (Rodríguez R., Rojas G., & Rodríguez B., 2016).

1.4. TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS

Existen diversas técnicas para la microencapsulación de probióticos, para seleccionar cuál de ellas nos brindará los beneficios deseados, hay que tener en cuenta diversos criterios, como son (Martín Villena, 2013):

- i. ¿Cuáles son los parámetros fisicoquímicos que afectan al probiótico?
- ii. ¿Cuáles son las condiciones que se aplicaran durante el procesamiento del alimento?
- iii. ¿Cómo se almacenarán los alimentos que contienen el probiótico encapsulado antes de ser consumidos?
- iv. ¿Qué tamaño de partícula y densidad son las adecuadas para incorporar las cápsulas en el producto?
- v. ¿Cuáles son los mecanismos de liberación?
- vi. ¿Cuáles son las limitaciones que se tienen en cuanto al costo?

Las técnicas más empleadas para la microencapsulación de probióticos son las siguientes: extrusión, secado por aspersión (spray drying), emulsificación y liofilización (freeze drying) (Ara et al., 2015).

1.4.1. Secado por aspersión

Se trata de una técnica muy utilizada en la industria alimentaria, suele emplearse para proteger los pigmentos que se encuentran de forma natural en los alimentos (Ahmed, 2010). Consiste en atomizar una emulsión o suspensión que contiene la sustancia a encapsular mediante la aplicación de altas temperaturas dentro de una cámara con aire caliente, así se elimina el solvente y el material activo queda atrapado dentro de una micropartícula seca y estable, dicha micropartícula tiene un tamaño comprendido entre 10-50 μm (Ara et al., 2015; de la Rosa & Angulo, 2011). En esta técnica se suelen emplear carbohidratos como agentes encapsulantes como, por ejemplo, maltodextrinas o la inulina (Adolfo & Huertas, 2010; Ahmed et al., 2010).

El principal inconveniente que presenta el secado por aspersión son las temperaturas con la que se llevan a cabo el proceso, ya que pueden afectar a la supervivencia del microorganismo probiótico (Ara et al., 2015).

1.4.2. Emulsificación

Es un método de encapsulación químico consistente en encapsular un elemento mediante la formación de una emulsión entre una fase discontinua (es la matriz que contiene el componente a encapsular) y una fase continua. Los agentes encapsulantes que se suelen emplear son materiales hidrocoloides. Las cápsulas obtenidas tienen un tamaño comprendido entre 25 μm y 2 mm.

Es un proceso de fácil manejo a nivel industrial y permite controlar el tamaño de las partículas formadas a través de parámetros como la velocidad. En contraposición, las cápsulas obtenidas mediante esta técnica pueden tener restos de aceites residuales en la superficie afectando a las propiedades organolépticas del producto en el que se apliquen (Ara et al., 2015; Pasin et al., 2012).

1.4.3. Liofilización

En la industria alimentaria este método de encapsulación se suele emplear para formar cápsulas que protejan a las bacterias probióticas. Se trata de una técnica en la que se congela el microorganismo a bajas temperaturas, y posteriormente mediante sublimación se elimina el agua, para conseguir la encapsulación del probiótico. Los agentes protectores empleados en esta técnica son entre otros, la glucosa, la lactosa y la maltodextrina. El tamaño de partícula obtenido con dicho método oscila entre 1 μm y 50 μm .

El proceso de encapsulación mediante liofilización supone una gran inversión en cuanto a equipamiento y requiere de un gran consumo de energía, además de ser un proceso lento y largo, en comparación con las otras técnicas (Ara et al., 2015).

1.4.4. Extrusión

La técnica de extrusión es un método ampliamente utilizado en la encapsulación de probióticos (Calero, Sánchez, Torrez, Hernann, & López., 2008). Para formar las perlas en las que dentro se incorpora el compuesto a encapsular, se combina una solución que contiene cationes divalentes, normalmente se trata de cationes de calcio (Ca^{+2}) en forma de cloruro de calcio (CaCl_2), con una solución de alginato de sodio. Cuando ambas soluciones entran en contacto, inmediatamente, se forma la estructura tridimensional en la que queda retenido el compuesto bioactivo. Esto es debido al intercambio que se

produce entre los iones de sodio procedentes del ácido gúlico con los cationes divalentes de la solución de endurecimiento (Ca^{+2} , Ba^{+2} , Sr^{+2}), obteniéndose de esta manera una estructura denominada ‘‘caja de huevos’’ (Martín Villena, 2013).

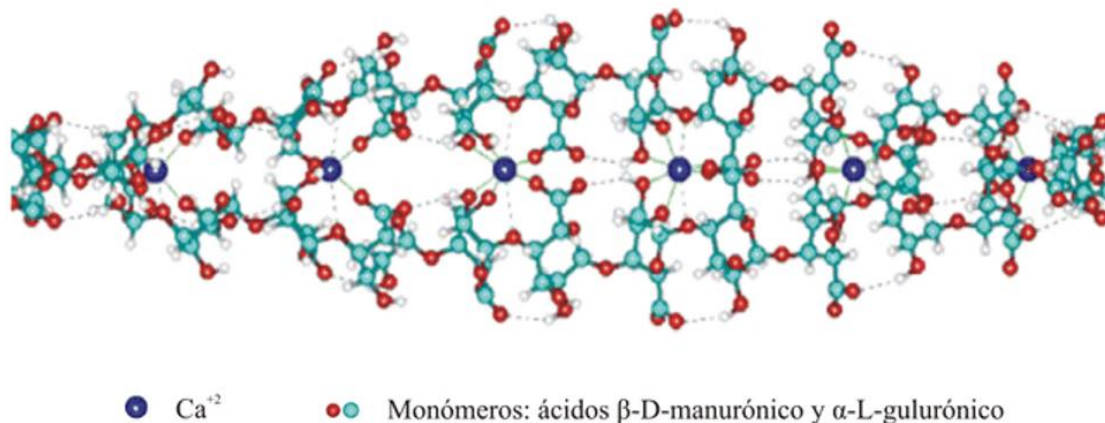


Figura 1. Estructura del alginato de sodio (Avenidaño-Romero, López-Malo, & Palou, 2013)

El tamaño y la forma de las microcápsulas están relacionados con la distancia entre la boquilla del dispositivo extrusor y el baño en el que se encuentra la solución de iones divalentes, el diámetro de la boquilla, la tensión superficial de la solución que provoca la gelificación y el efecto de la gravedad (Pasin et al., 2012).

Esta técnica ha sido ampliamente empleada ya que se trata de un proceso de bajo costo y simple, consigue que el componente encapsulado quede totalmente recubierto y protegido, sin provocar daños celulares en el tejido de este, de esta manera, el microorganismo tiene entre 80-95 % de posibilidades de sobrevivir, también cabe destacar, que en esta técnica no se utilizan disolventes que puedan perjudicar a las bacterias. Sin embargo, existen algunas limitaciones cómo baja capacidad de producción y el tipo de material que se vaya a usar como material de soporte (Pérez et al., 2013).

1.5. AGENTES ENCAPSULANTES

El material pared es uno de los factores más importantes a tener en cuenta cuando se encapsula, ya que la protección del compuesto a encapsular depende principalmente de este. Los materiales que se emplean en las diferentes técnicas de encapsulación son proteínas, glúcidos y lípidos, y tienen que ser reconocidos como GRAS (generally regarded as safe) para poder hacerse uso de ellos en alimentación.

En la **Tabla 1**, se muestran diferentes materiales empleados en las técnicas de encapsulación.

Tabla 1. *Agentes encapsulantes.*

MATERIAL	VENTAJAS	INCONVENIENTES	Referencia
Alginato	Fácil manejo, biocompatible, seguro, económico	Porosidad, susceptibles a la acidez, cadena polimérica	(Pérez et al., 2013)
Almidón	Resistente a las enzimas pancreáticas	Altas viscosidades	(Rodríguez R. et al., 2016)
Gelatina	Combinación estable con la goma gellan, propiedades de emulsificación	Termorreversible	(Pasin et al., 2012)
K-carragenina	Viabilidad celular	Formación de geles quebradizos No toleran las tensiones	(Patil & Speaker, 1998)
Goma gellan/goma xantana	Toleran los ambientes ácidos	Espesantes Temperatura	(Adolfo & Huertas, 2010)
Quitosano	Viabilidad celular, soporta pH ácidos, degradable	Inestabilidad en medios ácidos	(Navarro et al., 2010)
Proteínas lácteas	Características fisicoquímicas y estructurales	No resisten tensiones	(Heidebach, Först, & Kulozik, 2009)

1.5.1. Alginato.

El alginato es de los agentes de revestimiento más citados en la literatura científica, pues es compatible con la mayoría de los métodos de encapsulación, empleándose junto con otros materiales (Ara et al., 2015). Se trata de un polisacárido natural, capaz de formar hidrogeles con cationes divalentes de calcio o bario. Además, se caracteriza por ser biocompatible con las células bacterianas puesto que no es tóxico y por su gran habilidad para formar geles (Ariful, Yun, Choi, & Cho, 2010).

Se encuentra en las paredes de diferentes algas marrones y se incluye dentro de los polisacáridos aniónicos, formado por la alternancia de los residuos de los ácidos α -L gulurónico (G) y β -D manurónico (M), unidos por un enlace covalente formando

secuencias diferentes compuestas por la misma unidad estructural (MMMMM o GGGGGG). Del mismo modo, las propiedades otorgadas al alginato como material de soporte están relacionadas con la composición y secuencia de las unidades de M y G. Entre las sales de alginato más utilizadas, se encuentra el alginato de sodio ya que es muy soluble en agua fría y permite una transición sol-gel inminente e irreversible frente al ion de calcio, ampliamente usado en la industria alimentaria (Pasin et al., 2012).

La formación de cápsulas con alginato tiene las ventajas de formar sin dificultad matrices de gel en torno a las células probióticas, se consideran seguras, son biocompatibles, baratas y a la hora de trabajar con ellas no presentan dificultades para ser manipuladas. Por otro lado, presentan algunos inconvenientes, como, por ejemplo, la dificultad que presentan cuando son aplicadas a nivel industrial, son susceptibles en condiciones ácidas, induciendo a la pérdida de su integridad y estabilidad mecánica, asimismo, al ser un material muy poroso aparecen poros en la superficie de la cápsula y tienen una rápida difusión de la humedad. Por lo tanto, estos inconvenientes podrían ser mejorados aumentando la concentración de alginato y combinándolo con compuestos poliméricos (goma xantana), recubriendo las cápsulas con otros materiales como el bicarbonato de sodio o utilizando aditivos que modifiquen su estructura, tales como, el glicerol (Pérez et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar la influencia de la concentración de alginato de sodio en la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* encapsulado mediante la técnica de extrusión.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar el método de encapsulación por extrusión con diferentes concentraciones de alginato.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas de las microcápsulas.
- Determinar la viabilidad de *L. acidophilus* en las microcápsulas con diferentes concentraciones de alginato después de la encapsulación y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ACTIVACIÓN DE *Lactobacillus acidophilus*

El *Lactobacillus acidophilus* CECT 903 fue suministrado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). El cultivo probiótico liofilizado se activó en un caldo de Man Rogosa Sharpe (Oxoid, Madrid, España), se incubó a una temperatura de 37 °C durante 24 horas, bajo condiciones de anaerobiosis para obtener una concentración inicial de 10^8 UCF mL⁻¹. Las células bacterianas, se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, el pellet se lavó con tampón fosfato salino (PBS) (Oxoid, Madrid, España), estéril, y se resuspendió en el volumen correspondiente de PBS para obtener alrededor de 9.5 Log UCF mL⁻¹. A continuación, el microorganismo se congeló con glicerol como crioprotector a -80 °C hasta su uso.

3.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ENCAPSULACIÓN.

Se prepararon tres soluciones hidrocoloides siguiendo el método de Valero-Cases & Frutos, 2015 para la formación de las cápsulas utilizando diferentes concentraciones 2%, 4% y 6% de alginato de sodio (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Inicialmente, se disolvió la cantidad adecuada de alginato de sodio en agua destilada con ayuda de un homogeneizador (T18 digital ULTRA-TURRAX®, España). Posteriormente se añadieron 0,15% de goma xantana (Guinama, Valencia, España), 5% de glicerol (Guinama, Valencia, España) y 2% de bicarbonato de sodio (PanReac AppliChem, Barcelona, España) bajo constante agitación. Cada solución se mezcló y homogeneizó durante 15 minutos en un homogeneizador. A cada mezcla obtenida se le añadió el cultivo bacteriano, previamente activado en una concentración de 9.5 Log unidades formadoras de colonias por mL (UFC mL⁻¹).

3.3. ENCAPSULACIÓN DE *Lactobacillus acidophilus* POR EXTRUSIÓN

El proceso de encapsulación por extrusión se llevó a cabo según el método descrito por Lee, Ji, Lee, Choi, & Cho, 2019 con algunas modificaciones. Para la encapsulación se usó una bomba de perfusión (mod. KDS 200 / 200P LEGACY SYRINGE PUMP, Holliston, USA), donde se controla la velocidad de goteo, presión y distancia. Las diferentes soluciones de alginato de sodio (2%, 4%, 6%,) previamente preparadas, se introdujeron en jeringas de 60 mL ajustadas al equipo de perfusión. Las jeringas tenían una goma por la que pasaba la solución hasta llegar a la aguja de 21G. Las diferentes

soluciones, se dejaron caer a una velocidad de goteo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, en una solución de cloruro de calcio 0,1 M (CaCl_2) (Baker, J.T. Madrid, España), manteniendo una distancia de 5 cm entre las agujas y el CaCl_2 . Las cápsulas se dejaron en la solución de CaCl_2 durante 30 min y posteriormente se lavaron con agua ultrapura y almacenadas a una temperatura de 4 $^\circ\text{C}$.



Figura 2. Equipo de extrusión.

3.4. SUPERVIVENCIA DEL *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* ENCAPSULADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALGINATO EN CONDICIONES GASTROINTESTINALES *IN VITRO*

La simulación de la digestión gastrointestinal humana se llevó a cabo según el método de Valero-Cases & Frutos, 2015. Brevemente, la simulación gástrica se llevó a cabo en PBS estéril una temperatura de 37 $^\circ\text{C}$ bajo agitación constante a 100 rpm. La solución se ajustó hasta alcanzar un pH 2 con la adición de HCl 0,1 M. Una vez acidificado el medio, se adicionó 3 g/L de pepsina (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Una vez simulado el fluido gástrico por triplicado, simultáneamente, se adicionó 2 gramos de las diferentes cápsulas, y se mantuvieron durante 120 minutos a 37 $^\circ\text{C}$ bajo agitación constante a 100 rpm. Una vez pasadas las 2 horas de simulación de la digestión gástrica, se extrajo un gramo de cada tipo de cápsulas para realizar las diferentes diluciones seriadas y comprobar el efecto de la concentración de alginato sobre la viabilidad de LA.

La digestión gástrica se paró neutralizando las diferentes soluciones con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0,1 M hasta alcanzar un pH de 7. Una vez neutralizadas, se agregaron 1

g/L de pancreatina (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 4,5 g/L de sales biliares (Sigma-Aldrich, Madrid, España). La digestión intestinal se simuló durante 60 minutos. Pasado el tiempo de exposición de *Lactobacillus acidophilus* encapsulado con diferentes concentraciones de alginato, se realizaron diluciones seriadas en MRS agar para comprobar su viabilidad.

3.5. VIABILIDAD DE *L. acidophilus*

La viabilidad de *L. acidophilus* microencapsulado con diferentes concentraciones de alginato se determinó después de la elaboración de las diferentes microcápsulas y a lo largo del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Para ello, un gramo de las diferentes cápsulas (2, 4 y 6%), se resuspendieron en 9 mL de agua de peptona (dilución 10^{-1}), se trituraron en un homogeneizador de palas (Bag Mixer®, Interscience, Francia) aproximadamente durante 2 minutos. A continuación, se siguió el método de las diluciones decimales seriadas, con 0,9 ml de agua de peptona 100 μ l de cada una de las diluciones, se sembraron por triplicado en placas de MRS agar (Oxoid, Madrid, España). Seguidamente, las placas sembradas, se incubaron (Cámara climática de laboratorio, Climas®, España) durante 72 h a 37 °C. Una vez pasadas las 72 h, se realizó el recuento para obtener el número de unidades formadoras de colonias por gramo de cápsulas según la siguiente fórmula:

UFC/g de muestra = (Número de colonias x factor de dilución) / mL sembrados en la placa

Ecuación 1

3.6. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS CÁPSULAS OBTENIDAS POR EL MÉTODO DE EXTRUSIÓN

3.6.1 Actividad del agua (a_w)

Se determinó usando un equipo especializado en la a_w (Novasina A_w Sprint TH 500, Lachen, Suiza), cada tipo de cápsula fue añadida a una capsula para realizar la medición de la a_w a 23°C. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

3.6.2 Fuerza de rotura

Se determinó la fuerza de rotura a partir de diez muestras de los diferentes tipos de cápsulas utilizando un penetrómetro (Bertuzzi, Busto Arsizio, Italia), esta

fuerza de rotura se expresa en función del diámetro de la partícula medida “ Tensión de rotura nominal (T_R)”, calculada a partir de la siguiente ecuación (Wang, Wang, & Thomas, 2004):

$$T_R = \frac{F_R}{\pi D_m} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde F_R es la fuerza de rotura de una cápsula, D_m es el diámetro de una cápsula antes de aplicarse la fuerza de compresión y T_R es la tensión nominal de la pared.

3.6.3 Humedad

Se determinó siguiendo el método de Mujić et al., 2014 con algunas modificaciones, se pesaron 6 gramos de los tres tipos de cápsulas y se introdujeron en una estufa (Cámara climática de laboratorio, Climas®, España), 37 °C hasta alcanzar peso constante.

$$\text{Contenido de humedad} = \frac{(\text{Peso de muestra inicial (g)} - \text{Peso de muestra seca (g)})}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100$$

Ecuación 3

3.6.4 Tamaño y forma

El tamaño y la forma se midieron para 30 cápsulas con las diferentes concentraciones de alginato de sodio (2%, 4% y 6%), respectivamente. Se utilizó un micrómetro digital electrónico (Mitutoyo JP67, Vitoria-Gasteiz, España) y los resultados se expresaron en mm.

Para observar la forma y la superficie de las cápsulas antes y después de la digestión *in vitro* se realizaron fotografías (Huawei, P20 pro).

3.6.5 Capacidad de retención de agua (CRA)

Se determinó siguiendo el método de la prueba de absorción descrito por Kim, Kauffman, Norman, & Joo, 1995. Se suspendieron los tres tipos de cápsulas en agua destilada, en una relación 1:10, dentro de botes de duquesa (Deltalab, Barcelona, España) de 100 mL estériles, se cerraron y se colocaron dentro de un deshumificador durante 24 horas. Al cabo de 24 h se pesaron las diferentes cápsulas.

3.6.6 Eficiencia de la encapsulación

Se siguió el método propuesto por Verruck et al., 2017, definiéndose dicha determinación como una medición de la eficiencia de la retención y la supervivencia de las células. Para obtener esta medida, se empleó la ecuación siguiente:

$$EY (\%) = (N/N_0) \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

donde N es el número de células que han sido liberadas de las cápsulas (\log CFU g^{-1}) y N_0 es el número de células libres adicionadas a la solución con la que se encapsuló el probiótico durante el proceso de extrusión.

3.6.7 Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados utilizando el software SPSS v21.0 (SPSS Inc., Chicago-Illinois, USA) y se expresaron en términos de desviación estándar. El análisis de la varianza seguido por el test Turkey ($p < 0,05$) fue usado para la principal comparación y evolución.

4. RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS DIFERENTES CÁPSULAS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ALGINATO OBTENIDOS POR EL MÉTODO DE EXTRUSIÓN.

4.1.1. Actividad de agua y humedad

En lo relativo a la A_w y la humedad de las diferentes cápsulas (**Tabla 2**), la variación en la concentración de alginato no impacta en el valor de esta (0,966). Sin embargo, si se pueden ver diferencias significativas entre las concentraciones de alginato (2%, 4% y 6%) y la humedad de las cápsulas (94,92%, 92,92%, 91,42%, respectivamente). Coincidiendo con el presente estudio, Yonekura, Sun, Soukoulis, & Fisk, (2014) donde se llevan a cabo diferentes microencapsulaciones del *L. acidophilus* con diferentes materiales pared (quitosano, alginato de sodio y hidroxipropilmetilcelulosa) se determina también la humedad y la actividad de agua, mostraron que mientras que la actividad de agua no sufre oscilaciones significativas (0,25 a 0,29) para los diferentes tipos de capsulas, la humedad lo hace desde 1,86 hasta 3,96.

4.1.2. Fuerza de rotura

La **Figura 3** representa la tensión nominal de rotura de la pared de las distintas cápsulas obtenidas variando la concentración de alginato. En este gráfico se puede observar como a medida que aumenta la cantidad de alginato lo hace la fuerza necesaria para romper la pared de las cápsulas. En la preparación de todas las cápsulas se mantuvo constante el tiempo de contacto de estas con el agente reticulante (CaCl_2) para evitar que este factor sea una variable del proceso. La fuerza de rotura indicada en la **Tabla 2**, no muestra diferencias significativas para concentraciones de alginato de 2% (2,1 lb) y 4% (2,28 lb), mientras que los valores para la concentración de 6% (2,68 lb) sí se pueden observar diferencias significativas respecto a las otras dos concentraciones (2% y 4%). De acuerdo con la ecuación 2, a pesar de que el diámetro de las cápsulas se incrementa con la concentración de alginato, este incremento (2% y 4%) no es lo suficientemente significativo como para contrarrestar el aumento de la fuerza de rotura. En estudios previos con mayores concentración de alginato, se observó relación directa entre la tensión nominal de rotura y la concentración de alginato usada en la elaboración de las cápsulas (Liu, 2010). Al mismo tiempo, una concentración mayor de alginato derivaría en la obtención de una pared de menor porosidad como ocurre en el estudio de Bartkowiak & Hunkeler, 1999, en el cual se produjeron microcápsulas de alginato de sodio y quitosano, demostrando que a mayor concentración de alginato el espesor de la pared se reduce (también respaldado por Blandino, Macias, & Cantero, 1999) mientras que la fuerza de rotura se incrementa. Este incremento en la fuerza de rotura demostraría un grado de porosidad inferior y, por lo tanto, la protección del microorganismo sería mayor.

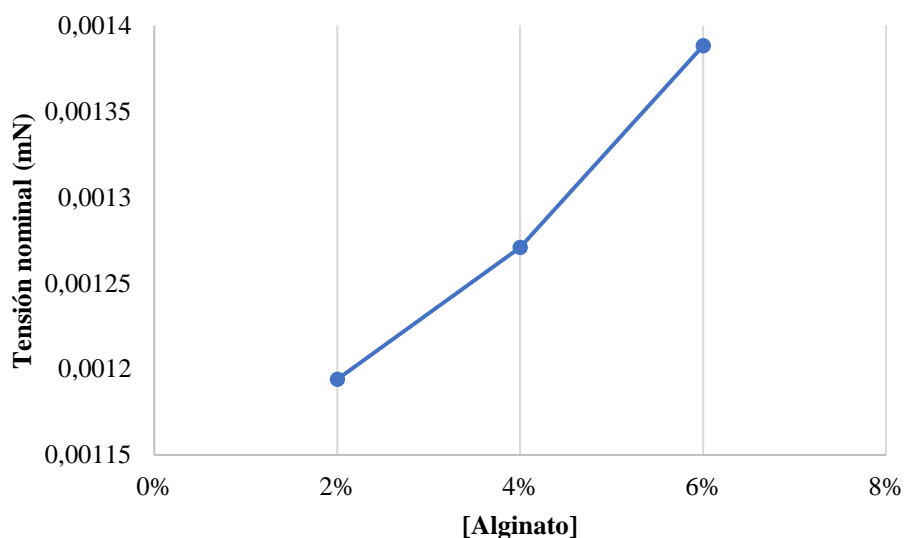


Figura 3. Tensión nominal de rotura en función de la concentración de alginato

4.1.3. Humedad

Teniendo en cuenta los datos de humedad obtenidos (**Tabla 2**), se puede determinar que un aumento en la concentración de alginato reduce el tanto por ciento de humedad. El peso disponible para ser ocupado por agua es menor a medida que el porcentaje de alginato incrementa en las cápsulas, teniendo para una concentración del 2%, 4% y 6% de alginato una humedad del 94,92%, 92,92%, 91,42%, respectivamente. En estudios previos, se observó que un mayor porcentaje de humedad reduce la estabilidad del material encapsulado (Tonon, Brabet, Pallet, Brat, & Hubinger, 2009). Por lo tanto, la viabilidad de LA encapsulado podría verse afectada cuando se encapsula con concentraciones al 2% de alginato. De modo que las cápsulas producidas con un 6% de alginato deberían proteger al microorganismo de forma más eficaz al contener menor porcentaje de humedad (91,42%).

4.1.4. Tamaño de partícula

La **Tabla 2** hace referencia al tamaño de partícula, de las diferentes cápsulas. Se puede observar que este parámetro guarda una relación directa con la concentración de alginato empleado en la encapsulación de LA. A medida que la concentración se incrementa el tamaño de partícula también lo hace, en función de la concentración de alginato usado, existiendo una diferencia significativa entre el tamaño de las cápsulas del 2% y del 6% de alginato (2,49 mm y 2,66 mm, respectivamente). En el estudio de Valero-Cases & Frutos, 2015 en el que se encapsula *L. plantarum* mediante el proceso de extrusión, utilizando una aguja similar a la del presente estudio (21G) y empleando la misma concentración de CaCl_2 , se determina que el tamaño de las cápsulas podría verse afectado por la concentración de alginato, el diámetro de la aguja, la concentración de CaCl_2 , la presión que ejerce la jeringa que contiene la solución que forma las cápsulas, así como, por la velocidad de goteo. Así mismo, en el estudio realizado por Muthukumarasamy & Holley, 2006 se usó la técnica de extrusión para obtener microcápsulas formadas con alginato de sodio de 2,37 mm, un tamaño similar al de las cápsulas obtenidas en este estudio, para ser incorporadas en salchichas. Las cápsulas se podían ver, pero no fueron detectadas en boca por los catadores.

4.1.5. Capacidad de retención de agua (CRA)

Los resultados presentados en la **Tabla 2** muestran que al aumentar la concentración de alginato del 2% al 6% aumenta la CRA desde 81,52 hasta 97,55 %. Esto podría deberse a la existencia de una mayor cantidad de alginato en las muestras con mayor concentración de este. El efecto del alginato en la capacidad de retención de agua se corresponde con los resultados procedentes de otros estudios, donde Heidebach et al. (2009), estudia la encapsulación del *Lactobacillus paracasei*, usando como material pared una proteína de la leche, en esta investigación se determina que la CRA aumenta cuando se aumenta la concentración de la proteína. Se conoce que la CRA está afectada por las interacciones debidas a las fuerzas electrostáticas, las fuerzas hidrófobas, los puentes de hidrógeno entre los diferentes polisacáridos (alginato y goma xantana) que forman la pared (Yao et al., 2018).

Tabla 2. Determinaciones fisicoquímicas de las cápsulas con diferentes concentraciones de alginato obtenidas mediante la técnica de extrusión

Concentración de alginato (%)	Parámetros				
	Tamaño (mm)	Humedad (%)	Aw	CRA (%)	Fuerza de rotura (lb)
2%	2,49 ± 0,21 ^A	94,92 ± 0,004 ^C	0,966 ± 0,48 ^A	81,52 ± 0,010 ^A	2,1 ± 0,27 ^A
4%	2,54 ± 0,26 ^{AB}	92,92 ± 0,004 ^B	0,966 ± 0,48 ^A	84,11 ± 0,000 ^B	2,28 ± 0,38 ^{AB}
6%	2,66 ± 0,26 ^B	91,42 ± 0,004 ^A	0,966 ± 0,48 ^A	97,55 ± 0,015 ^C	2,68 ± 0,43 ^C

Los valores situados a la derecha de ± son la desviación estándar. Los valores con diferentes letras en la misma columna simbolizan diferencias significativas de acuerdo con el Turkey test ($p < 0,005$).

4.2. NÚMERO DE CÉLULAS ENCAPSULADAS EN EL PROCESO DE EXTRUSIÓN

Según los resultados mostrados en la **Tabla 3** el proceso de encapsulación por extrusión del *Lactobacillus acidophilus* utilizando como material de pared alginato de sodio se ve afectado por la concentración de este. Los resultados indican que hay una pérdida significativa de la viabilidad del microorganismo entre las cápsulas formadas con un 2%, 4% y 6% de alginato de sodio siendo el número de células encapsuladas 8,09, 8,78, y 9 UFC/ g⁻¹, respectivamente. La mayor eficiencia de encapsulación (100%) se obtiene en la fabricación llevada a cabo con la mayor concentración de alginato (6%) siendo el sistema menos eficiente cuando se usó un 2% de alginato (89,8%). Esto podría deberse a la menor porosidad de las cápsulas obtenidas con mayor concentración de agente

encapsulante, la cual evitaría de forma más eficaz la difusión del probiótico durante el proceso de reticulación, manteniendo, por lo tanto, valores más altos del microorganismo probiótico en su interior, es decir, una mayor porosidad de pared conlleva a una mayor difusividad del probiótico desde el interior de la cápsula al medio que la envuelve. Esta transferencia de masa podría darse durante el proceso de endurecimiento de la cápsula, ya que el agente reticulante está disuelto en un medio acuoso, medio en el cual el probiótico es también soluble. Es por ello por lo que este fenómeno de difusión se ve reducido al aumentar la cantidad de alginato en el sistema, manteniendo así más cantidad de probiótico en el interior de la cápsula. De acuerdo con Blandino et al. (1999), cuanto mayor concentración de alginato hay en el sistema menor difusión se produce entre el interior de la cápsula y el exterior. Por otro lado, son varios los autores Muthukumarasamy & Holley, (2006); Sandoval-Castilla, Lobato-Calleros, García-Galindo, Alvarez-Ramírez, & Vernon-Carter, (2010); Valero-Cases & Frutos, (2015) que relacionan el diámetro de partícula con la capacidad de una cápsula para proteger el probiótico. Las diferencias en la porosidad de la pared de estas cápsulas provocadas por la diferente concentración de alginato presente durante el proceso de formación, podrían ser un factor con un impacto relativo en la supervivencia del microorganismo de estudio.

Tabla 3. Eficiencia del proceso de encapsulación por extrusión.

Concentración de alginato (%)	<i>L. acidophilus</i> (log ₁₀ UFC/G)		
	Células viables antes de la encapsulación	Células viables después de la encapsulación	Eficiencia del proceso de encapsulación
2%	9	8,09 ± 0,23 ^A	89,8%
4%	9	8,78 ± 0,16 ^B	97,5%
6%	9	9,00 ± 0,05 ^C	100%

Los valores ^{A-C} que se encuentran en la misma **columna** indican la existencia de diferencias significativas (p < 0,05) entre las diferentes concentraciones de alginato que encapsulan el probiótico

4.3. SUPERVIVENCIA DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS.

La **Tabla 4** muestra los resultados obtenidos para la supervivencia del probiótico en la digestión *in vitro*. En todas las cápsulas realizadas, después de la fase gástrica la

concentración de microorganismos disminuye, siendo el sistema con una concentración de alginato del 6% el que mantiene una supervivencia mayor $7,24 \log \text{ UFC g}^{-1}$ y el del 2% el que muestra una supervivencia menor $4,45 \log \text{ UFC g}^{-1}$. La influencia de la concentración de alginato en la porosidad estudiada previamente por Bartkowiak & Hunkeler (1999); Blandino et al. (1999), indica que las cápsulas producidas con un 6% de alginato son las que deberían tener una porosidad menor, conclusión que permite explicar porque las cápsulas que consiguen mantener en su interior una mayor cantidad de probiótico protegido después de la simulación de la fase gástrica son las fabricadas con una mayor cantidad de alginato. En la , se observa el aspecto que presentan los distintos tipos de cápsulas después de haber estado sometidas a un pH de 2,5 y a la actividad de la pepsina durante dos horas, condiciones que simulan la fase gástrica. Según estas imágenes la única cápsula que presenta fisuras después de este tratamiento es la formada con un 2% de alginato. Esta debilidad latente de la pared muestra el impacto de la concentración de alginato en la resistencia de la pared conduciendo a la desintegración de la cápsula y con ello a la liberación del probiótico. Siguiendo los resultados obtenidos, se podría determinar que las cápsulas producidas con un 2% de alginato no resisten de forma suficiente las condiciones estomacales para mantener concentraciones de probiótico superiores al 10^6 , mientras que las cápsulas compuesta por un 4% ($6,31 \text{ UFC g}^{-1}$) y 6% ($7,24 \text{ UFC g}^{-1}$) de alginato sí.

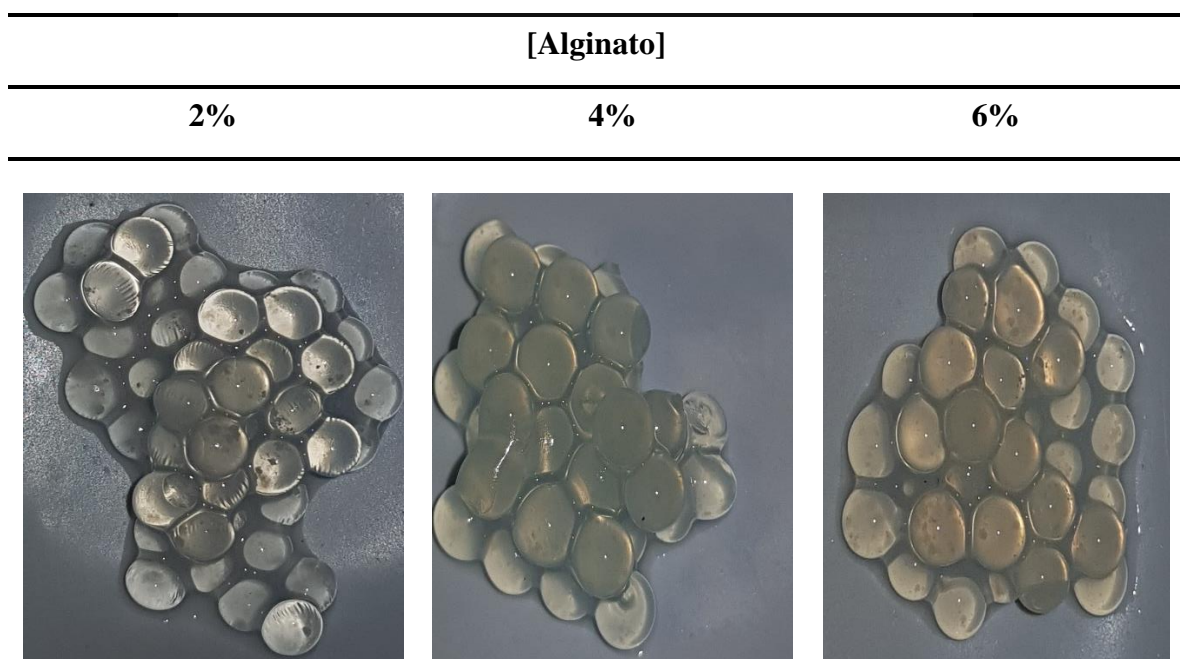


Figura 4. *Imágenes de los distintos tipos de cápsulas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato, después de la digestión gástrica in vitro.*

En lo referente a la simulación de los jugos intestinales, claramente se puede afirmar que los microorganismos encapsulados con un 2% de alginato no consiguen ser protegidos del medio que los envuelve, no obteniendo supervivencia del microorganismo encapsulado, al finalizar el periodo de digestión. Por otro lado, las cápsulas compuestas con un 4 y 6 % de alginato, permiten ver una correlación entre la cantidad de alginato y la viabilidad del probiótico (4,62 UFC g⁻¹ y 6,30 UFC g⁻¹, respectivamente), consiguiendo que LA se libere de forma más lenta cuanto mayor en la concentración de alginato, menor es la porosidad y menor es el grado de degradación de la pared de la cápsula, por tanto, mediante la concentración de alginato se puede controlar la cinética de liberación del probiótico. Las imágenes de la , muestran el efecto del jugo intestinal sobre la superficie de las cápsulas producidas con diferentes concentraciones de alginato. La imagen que representa a las cápsulas producidas con el 2% de alginato presenta restos de pared demostrando la rotura de las cápsulas debido a la acción de las sales biliares y la pancreatina. En cuanto a las cápsulas que contienen un 4% de alginato, se pueden apreciar una serie de fisuras en la superficie indicando que la pared ha iniciado el proceso de degradación. Por último, las cápsulas con mayor concentración de alginato son las que muestran una mayor resistencia a la actividad enzimática y a la acidez biliar. El estado de las capsulas obtenidas a diferentes concentraciones de alginato se correlacionan con los valores de la reducción celular mostrados en las **Tabla 4**, siendo para un 2% (cápsulas que presentan una degradación mayor) del 100%, para un 4% (cápsulas que muestran una degradación intermedia) del 52,62% y para el 6% (cápsulas con menor modificación de la integridad) del 30% únicamente.

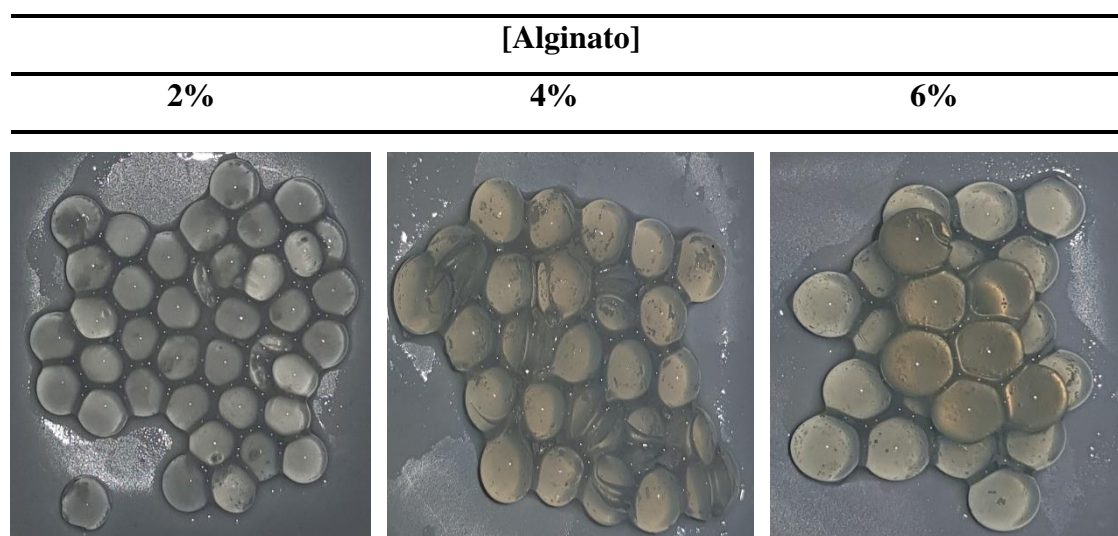


Figura 5. *Imágenes de los distintos tipos de cápsulas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato, después de la digestión intestinal in vitro*

En referencia a la digestión *in vitro* si se comparan los resultados obtenidos para las distintas concentraciones de alginato se puede ver que, para todos los casos, las dos fases (gástrica e intestinal) impactan en la viabilidad del probiótico, aunque este impacto es de magnitudes diferentes en función de la concentración del material encapsulante utilizado. Concretamente, la reducción de la bacteria láctica aumenta a medida que la concentración de alginato es menor, es por ello, que las cápsulas cuya concentración es de un 6% en alginato, protegen al probiótico en todas y cada una de las fases estudiadas.

Tabla 4. Supervivencia a la digestión *in vitro* del *L. acidophilus* encapsulado con diferentes concentraciones de alginato.

Concentración de alginato (%)	<i>L. acidophilus</i> (log ₁₀ UFC/G)			
	Antes de la digestión	Después de la fase gástrica	Después de la fase intestinal	Reducción celular (%)
2%	8,09 ± 0,23 ^{Aa}	4,45 ± 0,03 ^{Ab}	NP	100,00
4%	8,78 ± 0,16 ^{Ba}	6,31 ± 0,05 ^{Bb}	4,62 ± 0,09 ^{Bc}	52,62
6%	9,00 ± 0,05 ^{Ca}	7,24 ± 0,17 ^{Bb}	6,30 ± 0,17 ^{Cc}	30,00

Los valores ^{A-C} que se encuentran en **la misma columna** indican la existencia de diferencias significativas (p < 0,05) entre las diferentes concentraciones de alginato que encapsulan el probiótico.

Los valores ^{a-c} que se encuentran en **la misma fila** indican diferencias significativas (p < 0,05) para la misma concentración de alginato que encapsula el probiótico.

5. CONCLUSIÓN

La tecnología de microencapsulación mediante extrusión mostró ser un método óptimo para la encapsulación del *Lactobacillus acidophilus*. Sin embargo, la concentración de alginato usada mostró: diferencias significativas en la eficiencia de la encapsulación; permitiendo alcanzar valores de eficiencia muy elevados, 100% con un 6% frente un 89,8% y 97,5%, para un 4 y 2 %, respectivamente. En la tensión nominal de rotura también se observó un aumento con la concentración de alginato (2, 4 y 6%), adquiriendo valores con 0,0014 mN se usó el 6%. Así como la supervivencia del *Lactobacillus acidophilus* en la digestión *in vitro*, ya que las cápsulas con un contenido del 6% en alginato presentaron menor pérdida de viabilidad (6,30 UFC g⁻¹). Así mismo, se detectó una relación entre la concentración de alginato y la liberación del microorganismo en el tracto gastrointestinal pudiendo llegar a controlar la difusión del microorganismo desde el interior de la matriz dependiendo de la concentración de alginato de sodio utilizada.

Por lo tanto, sería interesante aplicar las cápsulas formuladas con un 6% de alginato en futuros estudios en las que se introduzcan dentro de un alimento, analizado su compatibilidad con el mismo, el grado de conservación dentro de este y asegurando su liberación en el momento adecuado para mejorar la funcionalidad de este alimento.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adolfo, R., & Huertas, P. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos Food Microencapsulation: A Review. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, 63(2), 5669–5684.
- Ahmed, M., Akter, M. S., Lee, J. C., & Eun, J. B. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1307–1312. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.014>
- Ara, N. De, Guti, L. A., Sim, O., Villadiego, R., Campuzano, M., Corporaci, A., ... Medell, S. (2015). Técnicas Para La Microencapsulación De Probióticos Y El Impacto En Su Funcionalidad: Una Revisión. *Alimentos Hoy*, 23(36), 112–126.
- Ariful, M. I., Yun, C. H., Choi, Y. J., & Cho, C. S. (2010). Microencapsulation of live probiotic bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(10), 1367–1377. <https://doi.org/10.4014/jmb.1003.03020>
- Avendaño-Romero, G. C., López-Malo, A., & Palou, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 87–96.
- Bartkowiak, A., & Hunkeler, D. (1999). Alginate-oligochitosan microcapsules: A mechanistic study relating membrane and capsule properties to reaction conditions. *Chemistry of Materials*, 11(9), 2486–2492. <https://doi.org/10.1021/cm9910456>
- Blandino, A., Macias, M., & Cantero, D. (1999). Formation of Calcium Alginate Gel Capsules Influence of Sodium - Blandino. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(6), 686–689.
- Bull, M., Plummer, S., Marchesi, J., & Mahenthiralingam, E. (2013). The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: A tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success. *FEMS Microbiology Letters*, 349(2), 77–87. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12293>
- Cabeza, E. A. (2006). *Bacterias ácido-lácticas (BAL): Aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica*. 14(4), 549–566.

<https://doi.org/10.13140/2.1.2241.2169>

- Calero, J., Sánchez, Y. F., Torrez, R., Hernann, E., & López., K. (2008). Elaboración y Caracterización de microcápsulas gastrorresistentes de Diclofenac obtenidas por Gelificación Iónica. *Universitas (León): Revista Científica de La UNAN León*, 2(1), 27–30. <https://doi.org/10.5377/universitas.v2i1.1640>
- Chavarri, M., Maranon, I., & Carmen, M. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. *Probiotics*, (June 2014). <https://doi.org/10.5772/50046>
- de la Rosa, O. M. A., & Angulo, L. M. V. (2011). Tres Tipos De Interacción (3TI) en el aprendizaje en línea de capacidades curriculares y didácticas (CCDS) del profesorado del sistema educativo de Islas Canarias. *Educacion XXI*, 14(2), 19–42.
- FAO, & WHO. (2006). *Probiotics in food health and nutritional propeties and guidelines for evaluation*. 85, 71.
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Pinto, S. S., Muñoz, I. B., & Amboni, R. D. M. C. (2013). Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.037>
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1670–1677. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.006>
- Kim, B. C., Kauffman, R. C., Norman, J. M., & Joo, S. T. (1995). *Eas E*. 39(94), 363–374.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
- Lee, Y., Ji, Y. R., Lee, S., Choi, M.-J., & Cho, Y. (2019). Microencapsulation of probiotic Lactobacillus acidophilus KBL409 by extrusion technology to enhance survival under simulated intestinal and freeze-drying conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 721–730. <https://doi.org/10.4014/jmb.1903.03018>

- Liu, M. (2010). *Understanding the Mechanical Strength of Microcapsules and Their Adhesion on Fabric Surfaces*. The University of Birmingham.
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Martín Villena, M. J. et al. (2013). *Formas Farmacéuticas y microencapsulación para la administración oral de probióticos Dosage forms and microencapsulation for the oral administration of probiotics*.
- Mujić, I., Bavcon Kralj, M., Jokić, S., Jug, T., Šubarić, D., Vidović, S., ... Jarni, K. (2014). Characterisation of volatiles in dried white varieties figs (*Ficus carica* L.). *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1837–1846. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0740-x>
- Muthukumarasamy, P., & Holley, R. A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.036>
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *FEMS Microbiology Letters*, 334(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02593.x>
- Navarro, A. E., Manrique, Á., Iparraguirre, E., Díaz, C., Jacinto, C., Cuizano, N., & Llanos, B. P. (2010). Síntesis y caracterización de quitosano cuaternario nativo y reticulado en polvo para su aplicación en la adsorción de aniones metálicos. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 76(4), 313–321. Retrieved from [scielo:S1810-634X2010000400002](http://scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=0034-9634X2010000400002)
- Pasin, B. L., González Azón, C., & Garriga, A. M. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130–151. Retrieved from <http://www.rvcta.org>
- Patil, R. T., & Speaker, T. J. (1998). Carrageenan as an anionic polymer for aqueous

microencapsulation. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 5(3), 179–182. <https://doi.org/10.3109/10717549809052033>

Pérez, H., Bueno, G., Brizuela, M., Tortoló, K., & Gastón, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar (ICIDCA)*, 47(1), 14–25. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223126409003>

Reid, G., Jass, J., Sebulsy, M. T., & McCormick, J. K. (2014). *Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice*. 16(May), 658–672. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.658>

Rodríguez R., Y. A., Rojas G., A. F., & Rodríguez B., S. (2016). Encapsulación De Probióticos Para Aplicaciones Alimenticias. *Biosalud*, 15(2), 106–115. <https://doi.org/10.17151/biosa.2016.15.2.10>

Rodríguez, V., & Guerrero, J. (2010). Probióticos: resistencia gastrointestinal y microencapsulación. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 48–57.

Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped Lb. casei in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.010>

Sneyder, R. B., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación De Alimentos Probióticos Mediante Liofilización En Presencia De Prebióticos. *Informacion Tecnologica*, 27(6), 135–144. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014>

Sultan Arslan, Mustafa Erbas, Ismail Tontul, A. T. (2015). Arslan (2015) Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying _ Elsevier Enhanced Reader.pdf. *Food Science and Technology*, 63, 685–690.

Teresa, S. M., Adolfin Ruiz, M., & Encarnación Morales, M. (2015). Microorganismos Probioticos Y Salud. *ArsPharm*, 56(1), 45–49.

- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., & Hubinger, M. D. (2009). Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science and Technology*, *44*(10), 1950–1958. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02012.x>
- Valero-Cases, E., & Frutos, M. J. (2015). Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*, *64*(2), 824–828. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.049>
- Verruck, S., de Carvalho, M. W., de Liz, G. R., Amante, E. R., Vieira, C. R. W., Amboni, R. D. de M. C., & Prudencio, E. S. (2017). Survival of *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated with full-fat goat's milk and prebiotics when exposed to simulated gastrointestinal conditions and thermal treatments. *Small Ruminant Research*, *153*(February), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.05.008>
- Vondel Reyes, Arranee Chotiko, Alexander Chouljenko, S. S. (2018). Viability of *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 encapsulated with high maize starch, maltodextrin, and gum arabic. *Food Science and Technology*, *96*, 642–647.
- Wang, C. X., Wang, L., & Thomas, C. R. (2004). Modelling the mechanical properties of single suspension-cultured tomato cells. *Annals of Botany*, *93*(4), 443–453. <https://doi.org/10.1093/aob/mch062>
- Yao, J., Zhou, Y., Chen, X., Ma, F., Li, P., & Chen, C. (2018). Effect of sodium alginate with three molecular weight forms on the water holding capacity of chicken breast myosin gel. *Food Chemistry*, *239*, 1134–1142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.027>
- Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, *6*(1), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.008>