

**Encapsulación de una bacteria ácido láctica para el futuro uso como probiótico en
alimentación animal**

Luz Stella Murillo Salazar

Oscar Eduardo Bermúdez

Directora

Dra. Andrea Vásquez García

Universidad Nacional Abierta y a Distancia- UNAD

Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería - ECBTI

Programa Tecnología en Calidad Alimentaria

2025

Resumen

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la encapsulación de la bacteria probiótica *Lacticaseibacillus rhamnosus* utilizando una matriz compuesta por alginato de sodio y almidón de maíz, con miras a su aplicación futura en la alimentación animal. El propósito principal fue mejorar la viabilidad de la bacteria durante su tránsito por el tracto gastrointestinal, ya que normalmente presenta una alta pérdida celular debido a condiciones adversas como la acidez gástrica. Para ello, se empleó la técnica de extrusión, mediante la cual se obtuvieron cápsulas con un diámetro de 1.5 a 2 mm. La bacteria fue cultivada, centrifugada y posteriormente encapsulada en una solución de alginato (0.4%) y almidón (1%), utilizando cloruro de calcio (CaCl_2) como agente reticulante. Las cápsulas obtenidas fueron caracterizadas en cuanto a su forma, tamaño, color y resistencia física. La viabilidad de las bacterias encapsuladas se evaluó mediante ensayos con jugos gástricos e intestinales simulados, realizándose mediciones de crecimiento bacteriano en los días 0 y 10. Si bien se logró una encapsulación efectiva, los resultados indicaron una pérdida significativa de viabilidad tras la exposición a los jugos gástricos simulados. Aunque la viabilidad inicial (día 0) fue adecuada, esta disminuyó de manera considerable al día 10, aunque se observó una leve recuperación, posiblemente atribuible al uso del almidón como fuente de energía por parte del microorganismo. Durante todo el periodo de evaluación, las cápsulas conservaron su morfología y estructura. Se concluye que la combinación de alginato de sodio y almidón de maíz ofrece una protección parcial a *L. rhamnosus* frente a las condiciones gastrointestinales. No obstante, se recomienda optimizar la formulación y explorar nuevos materiales o técnicas de encapsulación que mejoren la resistencia y eficacia del sistema de liberación. Se evidenció que el material y la técnica permiten cierto grado de protección, pero aún existen limitaciones frente al ambiente gastrointestinal.

Palabras clave: Alimento funcional, alginato de sodio, almidón de maíz, extrusión, *Lactobacillus Rhamnosus*, viabilidad.

Abstract

The objective of this research was to evaluate the encapsulation of the probiotic bacterium *Lactocaseibacillus rhamnosus* using a matrix composed of sodium alginate and corn starch, with a view to its future application in animal feed. The main objective was to improve the viability of the bacteria during their transit through the gastrointestinal tract, as they normally experience high cell loss due to adverse conditions such as gastric acidity. To achieve this, an extrusion technique was used, producing capsules with a diameter of 1.5 to 2 mm. The bacteria were cultured, centrifuged, and subsequently encapsulated in a solution of alginate (0.4%) and starch (1%), using calcium chloride (CaCl₂) as a cross-linking agent. The resulting capsules were characterized for their shape, size, color, and physical strength. The viability of the encapsulated bacteria was evaluated using simulated gastric and intestinal juices, with bacterial growth measurements performed on days 0 and 10. Although effective encapsulation was achieved, the results indicated a significant loss of viability after exposure to simulated gastric juices. Although initial viability (day 0) was adequate, it decreased considerably by day 10, although a slight recovery was observed, possibly attributable to the microorganism's use of starch as an energy source. Throughout the evaluation period, the capsules retained their morphology and structure. It is concluded that the combination of sodium alginate and corn starch offers partial protection to *L. rhamnosus* against gastrointestinal conditions. However, it is recommended to optimize the formulation and explore new materials or encapsulation techniques that improve the resistance and efficacy of the delivery system.

Keyword: Functional food, sodium alginate, corn starch, extrusión, *Lactobacillus Rhamnosus*, viability

Tabla de Contenido

Introducción.....	9
Objetivos	11
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
Marco Teórico	12
Bacterias Ácido Lácticas	12
Probióticos en la Alimentación Avícola.....	13
Microorganismos Utilizados Como Probiótico: Lacticaseibacillus rhamnosus	17
Factores que Influyen en la Viabilidad de los Probióticos	18
Encapsulación	19
Métodos de Encapsulación	20
Métodos Físicos.....	20
Métodos Físico-Químicos.....	20
Sistemas por Goteo o Extrusión	20
Tipos de Agentes Encapsulantes.....	21
Alginato de Sodio	22
Almidón de Maíz	23
Metodología.....	25
Metodología Experimental.....	25

Reactivación del Microorganismo	25
Preparación de la Bacteria BAL	27
Obtención de Cultivos	28
Encapsulación	30
Preparación de la Capsulas Almidón de Maíz – Alginato de Sodio	31
Nota. Figura 9 Mezcla polimérica alginato de sodio y almidón de maíz en agitación	32
Caracterización de las Cápsulas.....	33
Cuantificación de Microorganismos en las Cápsulas	35
Resistencia a los Jugos Gástricos.....	37
Resultados	40
Obtención de la Biomasa de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	40
Encapsulación de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en Alginato de Sodio y Almidón de Maíz.....	40
Caracterización de las Cápsulas	40
Viabilidad de la Encapsulación	42
Evaluación de las Cápsulas Sometidas a los Jugos Gástricos Simulados (JGS).....	46
Viabilidad de la BAL Almacenada en JGS por 10 Días.....	48
Conclusiones.....	50
Recomendaciones	51
Referencias Bibliográficas	52

Listado de Tablas

Tabla 1 <i>Composicion de JGS</i>	37
Tabla 2 <i>Propiedades Morfológicas y Físicas de las Cápsulas</i>	41
Tabla 3 <i>Resultados Obtenidos Viabilidad día 0</i>	43
Tabla 4 <i>Resultados Obtenidos Viabilidad día 10</i>	45
Tabla 5 <i>Resultados Obtenidos JGS día 0</i>	47
Tabla 6 <i>Resultados Obtenidos JGS día 10</i>	47
Tabla 7 <i>Resultados Obtenidos BAL Almacenada en JGS por 10 días</i>	49

Listado de Figuras

Figura 1 <i>Probióticos Comerciales Utilizados en la Alimentación Animal.</i>	15
Figura 2 <i>Identificación de la BAL dentro del Congelador de la UNAD.</i>	25
Figura 3 <i>Preparación de los Microtubos</i>	26
Figura 4 <i>Crecimiento de la BAL - Tinción de Gram.</i>	27
Figura 5 <i>Preparación de la Bacteria</i>	28
Figura 6 <i>Centrifuga de Laboratorio</i>	29
Figura 7 <i>Obtención del Pellet</i>	29
Figura 8 <i>Material para Encapsular</i>	31
Figura 9 <i>Elaboración de Cápsulas</i>	32
Figura 10 <i>Solución de goteo</i>	32
Figura 11 <i>Capsulas en la Solución de Cloruro</i>	33
Figura 12 <i>Lavado de Cápsulas</i>	33
Figura 13 <i>Caracterización de las Cápsulas</i>	34
Figura 14 <i>Verificación del Microorganismos Viables</i>	36
Figura 15 <i>Preparación de JGS</i>	38
Figura 16 <i>Equipos Para Trabajo en Condiciones Estériles</i>	39
Figura 17 <i>Capsulas Vistas a Través del Microscopio.</i>	42
Figura 18 <i># UFC en las Capsulas Día 0 y Día 10.</i>	45
Figura 19 <i>Viabilidad de las Capsulas Durante el Paso por JGS</i>	48

Introducción

La mayoría de los microorganismos considerados probióticos pertenecen a las bacterias ácido-lácticas (BAL), las cuales juegan un papel crucial en la mejora de la función intestinal y la productividad animal. (Bajagai et al., 2016). Los probióticos tienen la capacidad de modular el sistema inmunológico del huésped, competir por la colonización con microorganismos patógenos y mejorar la digestión de los alimentos, entre otros beneficios, cuando se administran en cantidades adecuadas. Su uso en animales productivos ha demostrado ser efectivo para mejorar el rendimiento y la salud, siendo una alternativa prometedora a los antibióticos como promotores del crecimiento. (De Lourdes et al., 2020). Sin embargo, los efectos de los probióticos en los animales varían dependiendo de múltiples factores, tales como las especies microbianas empleadas, la especie animal en la que se busca mejorar la productividad, la edad de los animales y el estado de la flora intestinal previa a la administración de los probióticos. (De Araújo et al., 2015)

La encapsulación de microorganismos, como técnica de inmovilización celular, ofrece protección frente a condiciones ambientales adversas, permitiendo mantener una alta concentración celular y otorgando estabilidad a los microorganismos. Uno de los métodos más utilizados para encapsular células es el uso de matrices poliméricas, inorgánicas o la combinación de ambas, con el objetivo de lograr un sistema asequible, viable, estable y económico. (Amador, 2021)

Las industrias han mostrado un creciente interés en la aplicación de técnicas de encapsulación como una estrategia para proteger a los probióticos de factores que puedan comprometer su estabilidad y viabilidad, con la expectativa de que mantengan su capacidad para ejercer efectos beneficiosos. Actualmente, existen diversas técnicas y materiales para optimizar

la producción, buscando un equilibrio entre la efectividad de los probióticos y la supervivencia de las BAL.

Numerosas investigaciones afirman la pérdida de viabilidad microbiana en los productos que los contienen en las condiciones de procesado y almacenamiento. (Ranadheera et al., 2012). Sobre todo, una gran pérdida asociada con su paso por el estómago e intestino, lo cual se debe principalmente a la elevada acidez de los jugos gástricos y la presencia de sales biliares. (Begley et al., 2005)

La encapsulación, está siendo utilizada como una alternativa para proteger a los probióticos de aquellos factores que puedan afectar a su estabilidad y viabilidad de manera que permanezcan viables y con la capacidad de ejercer sus beneficios en la alimentación animal y permitir su liberación.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el comportamiento de la encapsulación de la bacteria ácido-láctica *Lacticaseibacillus rhamnosus* en una matriz de alginato de sodio y almidón de maíz, bajo diferentes volúmenes de la BAL, al ser expuesta a condiciones gástricas e intestinales.

Objetivos Específicos

Establecer una metodología eficiente para la encapsulación de *Lacticaseibacillus rhamnosus* utilizando alginato de sodio y almidón de maíz.

Evaluar el comportamiento de las cápsulas de *Lacticaseibacillus rhamnosus* bajo condiciones gástricas, analizando su integridad física, viabilidad celular en Jugos Gástricos Simulados.

Marco Teórico

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen los probióticos como organismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped. Cabe destacar que, según esta definición, el término probiótico no se limita a alimentos o a la administración oral; también puede aplicarse a productos de uso cutáneo, intravenoso, entre otros. Los probióticos incluyen diversos tipos de organismos vivos, como bacterias y hongos, entre otros. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2001)

Es importante aclarar, como lo especifican la FAO y la OMS, que los microorganismos deben estar vivos para ser clasificados como probióticos; no existe el concepto de "probióticos muertos", ya que es un uso incorrecto del término. Además, para que un producto pueda ser considerado probiótico, debe demostrarse que genera un efecto beneficioso en el organismo al que se administra, superando los efectos observados en un placebo. (FAO, 2001)

Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido-lácticas, también conocidas por sus siglas BAL, comprenden un grupo diverso de microorganismos que comparten características comunes. En general, son bacterias Gram positivas, no esporuladas, anaerobias facultativas, tolerantes a los ácidos y estrictamente fermentativas, produciendo ácido láctico a partir de azúcares. (Makarova et al., 2006)

Este grupo de bacterias tiene una destacada capacidad para realizar transformaciones alimentarias, principalmente relacionadas con la fermentación, y son capaces de sintetizar importantes metabolitos como el ácido láctico y péptidos de cadena corta con actividad

antimicrobiana, denominados bacteriocinas, que benefician tanto a humanos como a animales. (Soccol et.al, 2010)

Las BAL se utilizan ampliamente en la industria alimentaria no solo para prolongar la vida útil de los productos, sino también para preservar y mejorar sus características organolépticas y calidad microbiológica, debido a su acción antagónica contra los microorganismos que deterioran los alimentos. (Ramos Gorbeña, 2008)

En los productos lácteos, las BAL desempeñan funciones clave como la producción de ácido láctico, lo que reduce el pH y contribuye al sabor, además de facilitar la coagulación de las caseínas, que es esencial en la textura de productos como quesos y leches fermentadas. También, generan otros metabolitos que intervienen en el aroma y el sabor, como el diacetilo y los productos de la proteólisis. Además, participan en la bioconservación de alimentos mediante la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas con propiedades antimicrobianas. Los alimentos fermentados, además, aportan BAL vivas al tracto gastrointestinal humano, incluidas algunas cepas que actúan como probióticos, proporcionando beneficios para la salud animal. (Requena, 2018)

Las BAL probióticas pueden reforzar la barrera intestinal, competir con patógenos, producir vitaminas y ejercer efectos moduladores en la homeostasis, lo que contribuye a la salud general del organismo.

Probióticos en la Alimentación Avícola

Estudios recientes han demostrado que el uso de probióticos en la dieta animal mejora significativamente los parámetros productivos en la cría de rumiantes y no rumiantes, lo que ayuda a satisfacer la creciente demanda de productos de origen animal. La inclusión de probióticos en la alimentación de animales de producción se perfila como una opción viable, ya

que optimiza indicadores productivos y económicos, ofreciendo una alternativa para mejorar los parámetros zootécnicos sin comprometer el valor nutricional del producto final. Además, garantiza la obtención de productos seguros y de alta calidad. (Soccol et al., 2010)

En el mercado actual, existen diversas presentaciones comerciales de probióticos para la alimentación animal, que incluyen desde productos con una sola especie microbiana hasta combinaciones multiespecie, por ejemplo:

Bacillus subtilis: Una bacteria formadora de esporas que puede sobrevivir las condiciones adversas del tracto digestivo y producir enzimas que mejoran la digestibilidad de los alimentos.

Enterococcus faecium: Conocida por su capacidad para competir con patógenos y modular la respuesta inmune en el intestino.

Saccharomyces cerevisiae (levadura): Ampliamente utilizado, especialmente en rumiantes, para estabilizar el pH del rumen, mejorar la fermentación y la digestión de la fibra. También es común en monogástricos para modular el microbiota intestinal.

Lactobacillus acidophilus: Una bacteria láctica que ayuda a mantener un equilibrio saludable del microbiota intestinal y puede mejorar la absorción de nutrientes.

En la Figura 1, se observan algunos ejemplos de presentación de levadura en polvo como el margen derecho *Bacillus Subtilis* en presentación polvo y el *Saccharomyces cerevisiae* en el margen izquierdo.

Figura 1

Probióticos Comerciales Utilizados en la Alimentación Animal.



Nota. Fotografía tomada de productos disponibles en el mercado. De izquierda a derecha:

Probios BR® e **Instant Success®**. Elaboración propia.

Algunos probióticos son fabricados localmente o llegan al país en forma pura y luego son vehiculizados. “Los de elaboración nacional son los que se pueden adicionar al agua y los que se agregan al alimento son importados, calculo que más del 80 por ciento proviene de empresas europeas y norteamericanas.

Presentación de probióticos en el mercado como alternativa de producción limpia

Los probióticos disponibles pueden estar basados en bacterias, hongos, o microorganismos formadores y no formadores de esporas. (Bajagai et al., 2016). Entre ellos, se destacan los probióticos autóctonos, que utilizan microorganismos nativos del tracto gastrointestinal del animal, como los pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y

Bifidobacterium y los probióticos alóctonos, que emplean microorganismos no presentes de forma natural en el sistema digestivo, como algunas levaduras. (Bajagai et al., 2016)

La mayoría de los probióticos pertenecen a las bacterias ácido-lácticas (BAL), que juegan un papel crucial en la mejora de la función intestinal tanto en humanos como en animales. Estos microorganismos poseen la capacidad de modular el sistema inmunológico del huésped, competir con patógenos por la colonización del tracto gastrointestinal y mejorar la digestión, entre otros beneficios. (De Araújo et al., 2015)

Los probióticos comparten ciertas características clave: deben ser seguros para el huésped, tolerados por el sistema inmunológico, resistentes a los ácidos gástricos y las sales biliares, capaces de adherirse a la mucosa intestinal y colonizarla, producir sustancias que beneficien el epitelio intestinal, y potenciar las defensas inmunitarias del organismo. (De Araujo et al., 2015). Además, deben cumplir con criterios técnicos, como estabilidad genética, viabilidad durante el almacenamiento y procesamiento, resistencia a fagos y la capacidad de producirse a gran escala. (FAO, 2001)

En el ámbito de la producción animal, los probióticos han ganado atención como una alternativa a los Antibióticos Promotores del Crecimiento (APC). Estos microorganismos ayudan a equilibrar el microbiota intestinal al producir metabolitos con actividad antimicrobiana, controlando el desarrollo de enterobacterias peligrosas para la salud pública y promoviendo el bienestar y crecimiento del animal. (De Araújo et al., 2015)

Sin embargo, cuando se administran en matrices alimentarias, los probióticos pueden verse afectados por condiciones adversas, como el calor, el pH o la humedad, lo que compromete su viabilidad. Para que un probiótico sea efectivo, debe cumplir con ciertos requisitos: debe poseer buenas propiedades tecnológicas que le permitan ser fabricado e incorporado en

productos alimenticios sin perder viabilidad o funcionalidad, y debe ser capaz de sobrevivir el paso por el tracto gastrointestinal superior, llegando vivo y bioactivo al sitio de acción.

(Semyonov et al., 2010). Debe contener una cantidad mínima de microorganismos vivos. Esta concentración se suele expresar en UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo (en productos sólidos) o por mililitro (en productos líquidos). Una concentración de 10^7 UFC por gramo o mililitro se considera el mínimo requerido para asegurar que los microorganismos sobrevivan.

Finalmente, los probióticos pueden influir positivamente en la salud animal al modular la composición del microbiota intestinal, inhibiendo patógenos mediante la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas, y favoreciendo la presencia de microorganismos beneficiosos en el ecosistema intestinal.

Microorganismos Utilizados Como Probiótico: Lactobacillus rhamnosus

El género *Lactobacillus*, perteneciente a la familia *Lactobacillaceae*, está compuesto por microorganismos Gram positivos que presentan células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque a veces también se observan bacilos cortos o coco bacilos. Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-3 mm) y crecen óptimamente en un pH entre 5.5 y 6.2; su crecimiento se detiene con pH entre 3.6 y 4.0, disminuyendo notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Estas bacterias tienen una resistencia característica a la bilis, un factor importante para su colonización en el intestino. (Gao et al., 2022)

En la industria alimentaria, se utilizan cepas como *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. plantarum*, entre otras, debido a sus amplios beneficios para el bienestar animal y su consideración como no patógenas. (Tormo, 2006). La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son aerotolerantes, creciendo bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas, y pueden

estimular su crecimiento con concentraciones de CO₂ entre el 5 y el 10%, los *Lactobacillus* son mesófilos con un límite superior de 40 °C. Los hormo fermentativos transforman glucosa y hexosas aldehídicas en ácido láctico, mientras que los heteros fermentativos pueden generar otros productos finales. (Villalobos-Samaniego et al., 2020)

Lacticaseibacillus rhamnosus es una bacteria que vive de forma natural en el cuerpo y se encuentra principalmente en los intestinos. Se utiliza como probiótico, o "bacteria amistosa", para prevenir el crecimiento de bacterias dañinas en el estómago y los intestinos.

En este trabajo se tratarán las características del género *Lactobacillus* y, en concreto, de *Lacticaseibacillus rhamnosus* al tratarse del microorganismo utilizado como probiótico en la parte experimental.

Factores que Influyen en la Viabilidad de los Probióticos

La viabilidad de las células probióticas en los alimentos es un aspecto crucial. Las cepas deben demostrar un buen crecimiento durante la producción de biomasa y, posteriormente, ser resistentes a las condiciones de procesamiento y almacenamiento. En cuanto a la viabilidad, las células deben sobrevivir el paso por el tracto gastrointestinal durante varios días, manteniendo su funcionalidad. (De Vos et al., 2010)

No solo es importante que las células permanezcan viables, sino que también deben estar presentes en cantidades suficientes. La International Dairy Federation (IDF) establece que el nivel mínimo recomendado es de 10⁻⁶ unidades formadoras de colonias (UFC) por dosis antes del consumo. Este nivel ayuda a minimizar la muerte celular durante el paso por el estómago y a controlar su liberación en el tracto gastrointestinal, facilitando así su supervivencia. Además, las características de la matriz alimentaria a la que se incorpora el microorganismo juegan un papel fundamental en la preservación de su viabilidad. (Saad, 2013)

Encapsulación

Las técnicas de encapsulación ofrecen una solución efectiva para proteger microorganismos de los efectos adversos del entorno, que pueden comprometer su viabilidad durante el procesamiento, almacenamiento, consumo y el tránsito a través del tracto gastrointestinal. La encapsulación permite mantener la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos a lo largo del tiempo, reduciendo el daño celular al encapsular las células en materiales que las aíslan. (Rodríguez-Barona et al., 2016)

La encapsulación de microorganismos como método de inmovilización proporciona protección frente a condiciones ambientales adversas y permite una alta concentración celular, garantizando la estabilidad de los microorganismos. Los métodos de encapsulación más utilizados emplean materiales poliméricos, inorgánicos o una combinación de ambos, con el objetivo de crear un sistema que sea accesible, viable, estable y económico. (Amador, 2021)

Actualmente, existen varias técnicas para encapsular microorganismos probióticos. Al seleccionar un método, es crucial considerar factores físicos como temperatura, humedad y agitación, que afectan la supervivencia de las células. También se debe tener en cuenta la cantidad y tamaño de las cápsulas para que no sean perceptibles para el consumidor, así como las condiciones de procesamiento y conservación del producto alimenticio que contiene las cápsulas y los mecanismos de liberación de las mismas. (Martín et al., 2015). Las técnicas más comúnmente citadas para la microencapsulación de bacterias probióticas incluyen extrusión, secado por aspersión, emulsificación y liofilización. (Martin et al., 2015)

Investigaciones indican que, además de la técnica de encapsulación utilizada, el efecto protector depende en gran medida de las propiedades funcionales del material de recubrimiento. Ingredientes no digeribles de los alimentos, como los prebióticos, que poseen cualidades

protectoras para la flora gastrointestinal benéfica en humanos y animales, pueden aplicarse como materiales de recubrimiento. (Rodríguez et al., 2016)

Las características ideales de un recubrimiento para encapsulación incluyen baja viscosidad a altas concentraciones y máxima protección contra condiciones adversas como luz, pH, oxígeno y humedad. Por ejemplo, el alginato, un polisacárido aniónico, se usa en concentraciones de 0,5 a 4% para ofrecer mayor seguridad a la cápsula, mientras que el almidón, con alto contenido de amilosa, forma películas fuertes, resistentes y con gelificación rápida. (Amador, 2021)

Métodos de Encapsulación

La elección del método de encapsulación depende de varios factores, incluidos los costos, el tamaño de la cápsula, las propiedades físicas y químicas de los materiales, la aplicación prevista y el mecanismo de liberación deseado. Muchos métodos de encapsulación son propiedad intelectual de las empresas, lo que limita el acceso a información detallada. Sin embargo, los siguientes métodos son ampliamente utilizados en la industria:

Métodos Físicos. Secado por aspersion, enfriamiento por aspersion, liofilización, recubrimiento por lecho fluidizado, extrusion, coextrusion, extrusion-fusion, cocrystalizacion.

Métodos Físico-Químicos. Coalescencia, inclusion molecular, encapsulacion por liposomas. (Sandoval et al., 2004)

Sistemas por Goteo o Extrusion. Este método consiste en la producción de pequeñas gotas del material encapsulado mediante su paso a través de una aguja de jeringa o una boquilla, gracias a un generador de gotas. (De Vos et al., 2010). Los microorganismos se añaden a una solución hidrocoloide que se suspende mediante goteo en una solución endurecedora, generalmente CaCl_2 , aunque esto puede variar según los materiales de encapsulación utilizados

(alginato de sodio, almidón de maíz). El tamaño de las cápsulas obtenidas depende del diámetro de salida de la aguja o boquilla, así como de la viscosidad, la altura de caída y la concentración de la solución (Silva et al., 2011). Esta técnica es popular debido a su simplicidad, bajo costo y condiciones suaves que garantizan una alta viabilidad celular. (De Vos et al., 2010), lo que la convierte en una de las más utilizadas para probióticos.

Aunque puede resultar algo ineficiente debido al rápido endurecimiento de la superficie de la cápsula, retrasa el movimiento de los iones de reticulación en el núcleo interior, lo que resulta en cápsulas menos estables. Aunque las microcápsulas se producen convenientemente a escala de laboratorio, la intensificación del proceso es generalmente difícil debido a la lenta producción de las mismas. (Burgain et al., 2011)

Tipos de Agentes Encapsulantes

En la industria alimentaria, los principales aditivos encapsulados incluyen ácidos, colorantes, pigmentos, enzimas, microorganismos, sabores, especias, grasas y aceites, vitaminas, minerales, sales, edulcorantes, gases y agentes leudantes. Los ácidos, por ejemplo, ayudan en la conservación y procesamiento de alimentos, aunque pueden degradar colores y sabores. La encapsulación ayuda a limitar la oxidación, reducir la higroscopicidad, lograr una liberación controlada y permitir una mayor cantidad de aditivos. (Bustamante et al., 2017)

Los polisacáridos, como el alginato de sodio y el almidón de maíz, son beneficiosos para la obtención de matrices de encapsulación de microorganismos. Las matrices comunes incluyen perlas de alginato de sodio, maltodextrinas y arroz. El alginato, en particular, es uno de los principales polímeros utilizados debido a su estabilidad, formación de biopelículas y geles, facilitando el almacenamiento y conservación de microorganismos. (Amador, 2021)

Los microorganismos necesitan un soporte que los proteja de condiciones adversas y permita su transporte eficiente. Las técnicas de encapsulación mediante matrices poliméricas como el almidón de maíz y el alginato proporcionan nutrientes que pueden ser una fuente de energía para los microorganismos, manteniendo su viabilidad a lo largo del tiempo. (Amador, 2021)

La elección del material de recubrimiento es crucial para el proceso de encapsulación. Aunque el método de encapsulación puede influir en el mecanismo de liberación del material recubierto, la formulación del recubrimiento es un factor determinante. El material debe cumplir con ciertas características relacionadas con la aplicación, las condiciones de almacenamiento y el proceso al que será expuesto. La encapsulación permite el aislamiento físico de las células microbianas del entorno, protegiendo así a las células probióticas durante su tránsito por el tracto gastrointestinal, mejorando su estabilidad y permitiendo una liberación controlada. (Domínguez, 2012)

Igualmente interesa que su utilización a nivel industrial sea económicamente rentable. (Nedovic et al., 2011). Es importante identificar el equilibrio adecuado entre la supervivencia de la cepa probiótica y la eficacia de encapsulación.

Alginato de Sodio

Los alginatos son polisacáridos abundantes en las algas marinas, constituyendo hasta el 40% de su peso seco. Estos compuestos son componentes estructurales de la pared celular de las algas y cumplen funciones clave como proporcionar rigidez, elasticidad, flexibilidad y capacidad de retención de agua. Los alginatos se extraen principalmente de tres especies de algas marrones: *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*. En su estado natural, los alginatos se encuentran como una mezcla de sales de cationes presentes en el agua de mar,

principalmente Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ . Las proporciones de estos iones unidas al alginato dependen de su composición y de la selectividad del alginato para los cationes alcalinotérreos. (Avendaño-Romero, 2013).

La viscosidad de las soluciones de alginato está relacionada con la longitud de las moléculas; a mayor longitud de las cadenas, mayor es la viscosidad. Al disolverse en agua, las moléculas de alginato se hidratan, lo que incrementa su viscosidad. En un entorno ácido, la viscosidad aumenta debido a la disminución de la solubilidad del ácido algínico libre, que precipita formando un gel de alta viscosidad a un pH entre 3 y 4. (Avendaño y Romero, 2013)

El uso del alginato como material de recubrimiento presenta varias ventajas y desventajas. Entre las ventajas destacan su fácil formación alrededor de las células probióticas, su seguridad, biocompatibilidad, bajo costo y facilidad de manejo durante el proceso. Sin embargo, también presenta desventajas a nivel industrial, como su susceptibilidad a ambientes ácidos, pérdida de integridad y estabilidad mecánica, y formación de poros en la superficie de las sustancias encapsuladas. Estas deficiencias pueden ser mitigadas al combinar el alginato con otros componentes que modifiquen su estructura.

Almidón de Maíz

El almidón es un polisacárido compuesto por un gran número de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos. Está constituido principalmente por dos tipos de polímeros: la amilosa, que es un polímero lineal formado por moléculas de D-glucopiranosas unidas mediante enlaces α (1 \rightarrow 4), y la amilopectina, un polímero ramificado de glucosa en el que las moléculas están unidas mediante enlaces α (1 \rightarrow 4) en las porciones lineales y enlaces α (1 \rightarrow 6) en las ramificaciones. La proporción de amilosa y amilopectina en el almidón influye en la absorción y

retención de agua, y por ende en la capacidad de formación de geles, lo que afecta sus propiedades funcionales. (Sajilata, 2006)

El almidón es el principal componente del maíz (Zhu et al., 2011), y sus propiedades físico-químicas y funcionales están estrechamente relacionadas con su estructura. El almidón está formado por los polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina, que se organizan en anillos concéntricos para formar la estructura granular. La distribución de amilosa dentro de estos anillos varía entre el centro y la periferia del gránulo, ya que ocupa los espacios disponibles dejados por la amilopectina durante su síntesis. (Agama-Acevedo et al., 2013)

Una de las propiedades más importantes del almidón natural es su semicristalinidad, donde la amilopectina es el componente principal responsable de la cristalización en la mayoría de los almidones. La parte amorfa del almidón está formada por regiones ramificadas de amilopectina y amilosa. Las propiedades comercialmente significativas del almidón, como su resistencia mecánica y flexibilidad, dependen de la fortaleza y características de la región cristalina, que a su vez dependen de la relación entre amilosa y amilopectina, el tipo de planta, la distribución del peso molecular, el grado de ramificación y el proceso de formación de cada componente del polímero. (García, 2015)

El almidón resistente es aquel que no es digerido por las amilasas pancreáticas en el intestino delgado y puede llegar al colon, donde es fermentado. Los gránulos de almidón se consideran una superficie ideal para la adhesión de microorganismos, lo que mejora su viabilidad hasta llegar al intestino y los mantiene metabólicamente activos. (Kumar & Singh, 2007).

Metodología

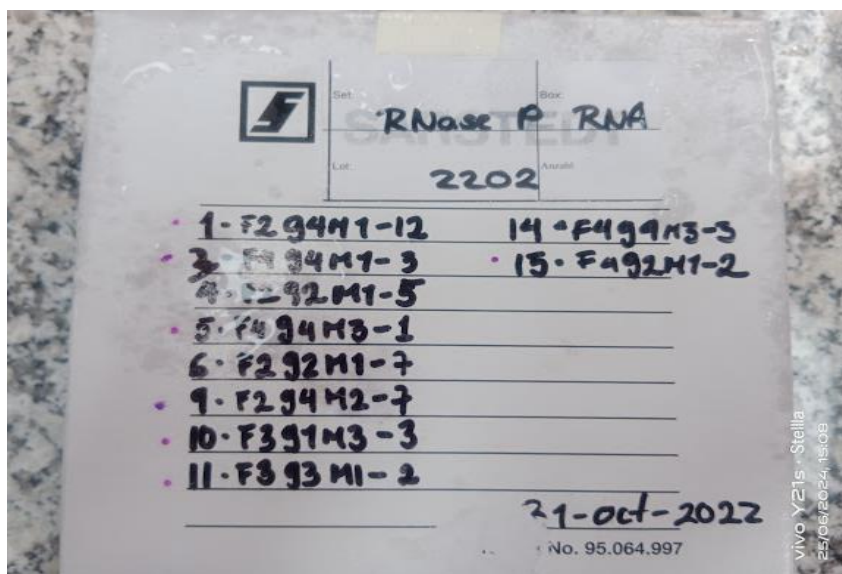
Metodología Experimental

Reactivación del Microorganismo

El cepario a cargo de la UNAD es la encargada de suministrar el microorganismo probiótico utilizado para llevar a cabo la encapsulación *Lactobacillus rhamnosus*, el cual se encuentra identificado de esta manera RNase P. RNA Lote 2202- # 11 F393 M1-1, como se observa en la Figura 2.

Figura 2

Reactivación del Microorganismo



Nota. Identificación de la BAL dentro del congelador de la UNAD

Figura 3

Preparación de los Microtubos con Glicerol

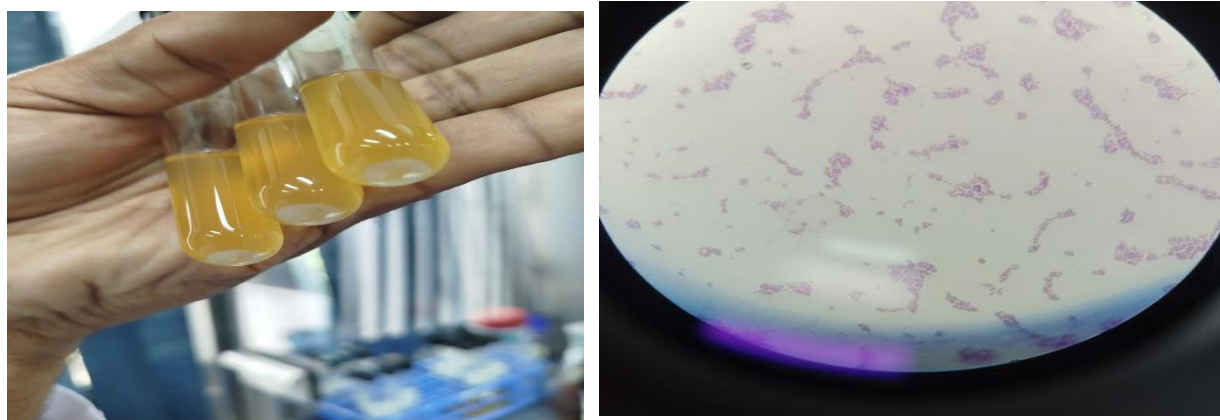


Nota. Preparación de los microtubos con glicerol 40% v/v

Para comenzar con la experimentación, se partió de un criovial de células microbianas (cultivo stock) en 800 μL de caldo MRS (Condalab) y glicerol al 40% (v/v). ver Figura 3. La muestra, contenida en un *Eppendorf* se agito y se dejó a temperatura ambiente para reactivar la bacteria. Posteriormente se preparó una suspensión bacteriana con caldo MRS Broth (Condalab), distribuyendo 5ml en 10 tubos de ensayo. Se inocularon 100 μL en cada tubo de ensayo, y se en incubaron (en incubadora marca Memmert) a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió a confirmar la presencia de la BAL mediante una tinción de Gram como se observa en la Figura 4, lo cual permite confirmar que el cultivo es puro y que las bacterias son Gram positivas, ayudando a asegurar la calidad y eficacia del proceso.

Figura 4

Crecimiento de la BAL - Tinción de Gram



Nota. Microfotografía de una tinción de Gram de *Lactobacillus sp.*

Con la punta de un asa se toma la muestra y se coloca en un portaobjetos previamente esterilizado:

Se aplica cristal violeta, un tinte que se adhiere a la pared celular de las bacterias durante 1 minuto y luego se retira los restos con la ayuda cetona y agua destilada.

Se aplica Lugol, que forma un complejo con el cristal violeta, reforzando la unión al peptidoglicano de la pared celular durante 1 minuto, se retira con agua destilada.

Se aplica safranina, un tinte rosa que se une a las bacterias que han perdido el cristal violeta-Lugol.

Se lleva al microscopio y se buscan las bacterias en el objetivo donde mejor se observen.

Preparación de la Bacteria BAL

En un Erlenmeyer de 500 mL previamente aforado, se preparó la suspensión bacteriana con MRS Broth (Condalab). Esta se llevó a la autoclave (Phoenix Lufenco) durante 15 minutos a 121 °C. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le adicionó el 10% del contenido de los tubos con la BAL de ensayo (18 mL) en una cabina de flujo laminar como se

observa en la Figura 5. Esto se realizó cumpliendo con los protocolos de bioseguridad para mantener la exenidad de la BAL. Finalmente, se tapó el Erlenmeyer con papel aluminio y se llevó a incubar (incubadora marca Memmert) durante 24 horas a 37 °C, en condiciones estáticas y de microaerobiosis.

Figura 5

Preparación de la Bacteria



Nota. Adición del cultivo de Bacteria Ácido Láctica (BAL) al Erlenmeyer con medio MRS Broth. El proceso se realiza bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar

Obtención de Cultivos

Para la obtención de los cultivos, se procedió de la siguiente manera: del Erlenmeyer que se dejó en incubación el día anterior con el 10% de la BAL, y dentro de la cámara de flujo laminar (cumpliendo con todos los protocolos de bioseguridad), se tomaron 12 mL del caldo nutritivo con la cepa en cada tubo Falcon.

La muestra se concentró por centrifugación (Centrífuga Único PowerSpin DX C8724) a 4000 rpm durante 15 minutos como lo muestra la Figura 6. El objetivo de este paso fue obtener suficiente biomasa, descartando el sobrenadante de cada tubo. El pellet resultante se recolectó en un solo tubo Falcon para la posterior encapsulación como se observa en la Figura 7.

Figura 6*Centrifuga de Laboratorio*

Nota. Centrifuga (Único PowerSpin DX C8724)

Figura 7*Obtención del Pellet*

Nota. Pellet resultante de la centrifugación.

Encapsulación

Para la encapsulación, se utilizaron alginato de sodio (Natural Quim) y almidón de maíz (Madre Tierra) como materiales de recubrimiento. Se empleó cloruro de calcio (Natural Quim) a 0.5 M como agente reticulante de las cápsulas se muestran en la Figura 8. Todo el material usado en el proceso de encapsulación se esterilizó en la autoclave (Phoenix Lufanco) a 121 °C durante 15 minutos para eliminar posibles microorganismos. Posteriormente, se trabajó en la cámara de flujo laminar (AIR LH 090) para mantener un ambiente estéril y evitar contaminaciones.

Para la formación de las cápsulas, se preparó una mezcla con 1 g (0.4%) de alginato de sodio y 2 g (1%) de almidón de maíz en un volumen final de 200 mL (98.05%) de agua destilada. En un vaso precipitado, se inició mezclando el almidón de maíz en el agua destilada bajo agitación continua moderada. Consecutivamente, se adicionó el alginato de sodio y la mezcla se dejó durante 24 horas en agitación constante a 200 rpm a temperatura ambiente en un agitador magnético (marca Heidolph). Transcurrido este tiempo, se incorporó la biomasa obtenida de *Lactobacillus rhamnosus* (1.5 mL) y se continuó la agitación por 30 minutos más hasta conseguir una mezcla homogénea.

Figura 8

Material para Encapsular



Nota. Materiales utilizados para la encapsulación. Se muestran los polímeros (alginato de sodio y almidón de maíz) y el agente reticulante (cloruro de calcio).

Preparación de la Capsulas Almidón de Maíz – Alginato de Sodio

El método de encapsulación se realizó mediante la técnica de sistema por goteo o extrusión, siguiendo la metodología propuesta por Cañón (2021).

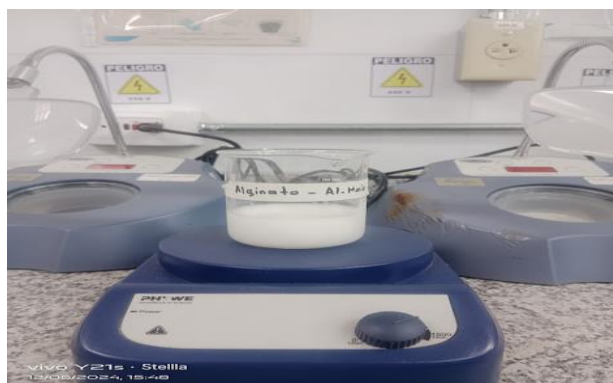
Para la preparación de las perlas, se utilizó una jeringa con aguja de 2 mm. Se tomó la mezcla de alginato de sodio y almidón de maíz, que se encontraba en agitación continua a 200 rpm, como se observa en la Figura 9, y se goteó sobre una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) 1 M, como muestra la Figura 10. Este procedimiento se repitió de manera constante hasta terminar con toda la mezcla contenida en el Erlenmeyer.

La solución de cloruro de calcio se mantuvo en agitación constante (en agitador marca Heidolph) a 110 rpm durante 30 minutos. Esto se hizo con el fin de lograr el entrecruzamiento total del alginato de calcio, el almidón y las células de la BAL por acción del CaCl_2 , permitiendo la formación de las perlas como podemos observar en la Figura 11.

Posteriormente, se realizó un lavado con agua destilada para eliminar el exceso de las soluciones de CaCl_2 como se observa claramente en la Figura 12. Para ello, se utilizó un colador y un frasco lavador. Las perlas obtenidas se colocaron en una caja de Petri como se observa en la Figura 13 y se llevaron al horno (marca E&Q) a $40\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

Figura 9

Elaboración de Cápsulas



Nota. Mezcla polimérica alginato de sodio y almidón de maíz en agitación

Figura 10

Solución de Goteo



Nota. Goteo sobre una solución de CaCl_2

Figura 11*Agitación de Cápsulas*

Nota. Agitación para permitir entrecruzamiento entre los materiales poliméricos

Figura 12*Lavado de Cápsulas*

Nota. Lavado de capsulas con agua destilada.

Caracterización de las Cápsulas

Las cápsulas no fueron sometidas a ningún tratamiento previo a su análisis. Se utilizó un microscopio electrónico binocular simple (marca Serie E) para la observación detallada de los capsulas. Se seleccionaron aleatoriamente quince, las cuales se colocaron directamente en un

portaobjetos para su visualización. Las observaciones se realizaron con objetivos de 1x, 10x y 40x, además de un zoom óptico de 100x. Este procedimiento permitió identificar cápsulas con características diversas, a partir de las cuales se establecieron comparaciones.

Figura 13

Caracterización de Cápsulas



Nota. La imagen muestra cápsulas con superficie lisa y forma esférica, y a su vez cápsulas con textura rugosas y forma irregular.

Medición de cápsulas



Nota. Calibrador o Vernier instrumento de medición de magnitudes de alta precisión

El pie de rey también conocido como calibrador o vernier, es un instrumento de medición de magnitudes de alta precisión que sirve para medir las dimensiones de pequeños objetos o superficies y conocer sus diámetros interiores y exteriores con un alto grado de precisión, se utilizó para medir las capsulas, en mm como se observa en la Figura 13. La metodología para evaluar el color se realizó visual igual que la metodología anterior se tomaron varias capsulas y se comparó el color utilizando un fondo oscuro y con buenas condiciones de iluminación, para medir la forma se compararon directamente, donde se colocan dos a tres formas lado a lado para identificar similitudes y diferencias (Tabla 2).

Cuantificación de Microorganismos en las Cápsulas

Para determinar la presencia y el recuento de microorganismos viables en las cápsulas, se siguió el siguiente procedimiento:

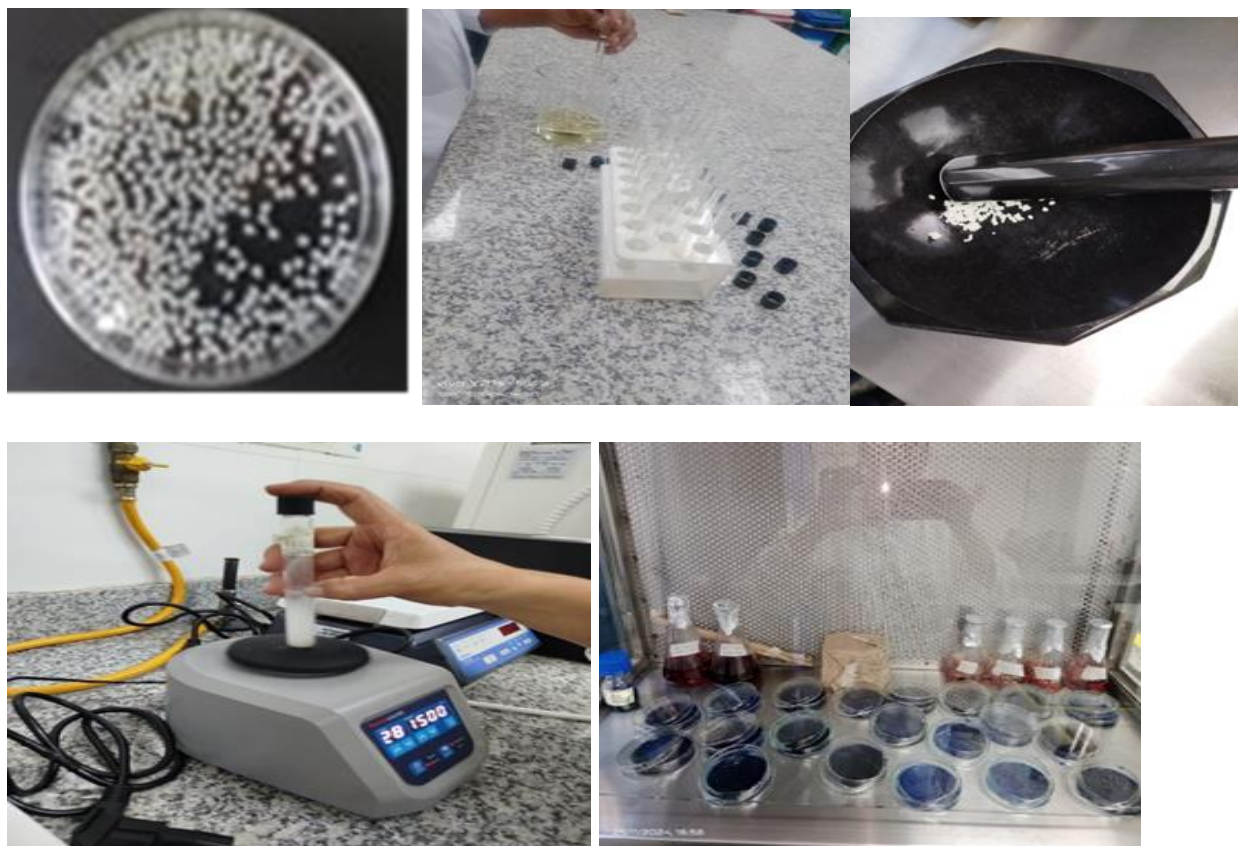
Inicialmente, se tomó 1 gramo de cápsulas formadas y se maceró suavemente utilizando un mortero previamente esterilizado hasta lograr su completa desintegración. La muestra desintegrada se resuspendió en 9 mL de agua Peptonada al 1% (marca Condalab). Para asegurar una homogenización adecuada, la mezcla se agitó en un vortex (marca Thermoscientific) a 500 rpm a temperatura ambiente, un método adaptado de (Reid, 2005) para favorecer la dispersión uniforme.

Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas en base 10, desde 10^{-1} hasta 10^{-6} (véase Figura 14 para el esquema de dilución y siembra). Una vez que las cápsulas se disolvieron completamente en las diluciones, se tomaron 100 μ L de cada una. Estas alícuotas se sembraron en cajas de Petri que contenían Agar nutritivo (Condalab). La siembra se realizó mediante la técnica por superficie, permitiendo la determinación del contenido de Unidades Formadoras de

Colonias por gramo (UFC/g) de las cápsulas, lo que refleja el número de microorganismos viables presentes.

Figura 14

Verificación de Microorganismos Viables



Nota. En la imagen se observa la verificación de los microorganismos desde las capsulas, preparación de diluciones, y siembra por agotamiento en cajas de Petri

Después del período de incubación, se procedió al recuento de microorganismos utilizando un contador de colonias (CS6PLUS Stuart). La cuantificación de microorganismos se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{ml/g} = \#Colonias \quad X \quad FD \text{ (Inverso)}$$

Además del recuento inicial, la viabilidad de los microorganismos en la matriz sólida de las perlas se evaluó durante un periodo de 0 a 10 días. Este seguimiento a lo largo del tiempo permitió determinar el número de bacterias vivas presentes en diferentes momentos, ofreciendo información crucial sobre la estabilidad y supervivencia microbiana dentro de la encapsulación.

Resistencia a los Jugos Gástricos

El objetivo principal de la encapsulación es proteger el microorganismo a su paso por el estómago y permitir la liberación en el intestino, es por eso que se simularon las condiciones gástricas y comprobar la resistencia de los materiales encapsulantes utilizados. La composición de los jugos gástricos simulados se ajustó al protocolo descrito por Ki-Yong & Tae-Ryeon (2000). Véase Tabla 1.

Para la elaboración de los Jugos Gástricos Simulados (JGS), se midieron 50 mL de agua destilada como base. A esta se le adicionó 1 mL de cloruro de calcio. Posteriormente, el pH de la solución se ajustó a 1.08 utilizando ácido clorhídrico 1M (HCl 1M). Para este ajuste de pH, se empleó un pH-metro (marca Milwaukee). Los insumos y equipos utilizados en la preparación de los JGS se visualizan en la Figura 15.

Tabla 1

Composición de JGS

Cloruro de Calcio al 1%
Ajuste de pH a 1 con HI 1 M

Figura 15*Preparación de JGS*

Nota. La imagen muestra los materiales utilizados para la elaboración de JGS, incluyendo reactivos y el pH-metro.

Las cápsulas, elaboradas con una combinación de alginato de sodio y almidón de maíz, fueron sometidas a un tratamiento gastrointestinal simulado para evaluar su comportamiento y resistencia en condiciones ácidas.

Para esta simulación, 1 gramo de cápsulas se depositó en 9 mL de Jugos Gástricos Simulados (JGS). Las muestras se incubaron durante 90 minutos a 37 °C, con agitación intermitente de 60 segundos a 40 rpm en un vortex (Thermoscientific). Este movimiento en el vortex permitió que el contenido se desplazara de un extremo a otro del tubo, emulando eficazmente los movimientos peristálticos que ocurren naturalmente en el tracto gastrointestinal, todo se trabajó en medios estériles para mantener la exenidad del microorganismo véase Fig., 16.

Transcurridos los 90 minutos de exposición a los JGS, se procedió a realizar diluciones seriadas en base 10, desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . Finalmente, se determinó el número de células viables mediante la técnica de siembra en superficie, lo que permitió obtener el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) de cápsula después del tratamiento gástrico.

$$\frac{UFC}{ml/g} = \#Colonias \quad X \quad FD \text{ (Inverso)}$$

Figura 16

Equipos Para Trabajo en Condiciones Estériles



Autoclave



Cabina de flujo laminar

Nota. Equipos utilizados para la elaboración de capsulas. Preparación de medios, siembra y encapsulación.

Resultados

De acuerdo a la literatura que se ha reportado, las bacterias ácido lácticas representan una alternativa de uso como probiótico por su efecto benéfico sobre las células huésped, permitiendo que con sus propiedades puedan resistir la composición y bajo pH de los jugos gástricos, y la producción de enzimas, al igual que su acción bactericida y bacteriostática frente a otra flora como patógenos que puedan colonizar la el tracto gastrointestinal.

Obtención de la Biomasa de *Lactobacillus rhamnosus*

La BAL se dejó en crecimiento durante 24 horas en caldo nutritivo MRS (marca Condalab) y a partir de ello se procedió a recuperar las células mediante el proceso de centrifugación mencionado en la metodología. Obteniéndose un total de biomasa de 18 ml de *Lactobacillus rhamnosus*.

Encapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* en Alginato de Sodio y Almidón de Maíz

Para la encapsulación, monitoreamos las fases de crecimiento bacteriano y realizamos una tinción de Gram, según lo detallado en la metodología. Este paso es crucial porque el crecimiento de poblaciones bacterianas en un sistema de cultivo cerrado está limitado por el agotamiento de nutrientes o la acumulación de productos metabólicos tóxicos. Las condiciones de laboratorio, ya sea en medios de cultivo sólidos o líquidos, simulan un sistema cerrado sin un aporte continuo de nutrientes. De esta forma, comprobamos el crecimiento y confirmamos la pureza del cultivo mediante la aparición de una pequeña colonia blanquecina en el fondo del tubo con el medio líquido.

Caracterización de las Cápsulas

Las cápsulas desarrolladas a partir de la combinación de alginato de sodio y almidón de maíz fueron caracterizadas por sus propiedades morfológicas y físicas, incluyendo color, forma y

tamaño. Se observaron cápsulas irregulares, esféricas como ligeramente ovaladas o alargadas Véase Figura 17. Estas variaciones morfológicas podrían atribuirse a la influencia de parámetros de encapsulación como la velocidad de goteo y la distancia entre la aguja y la solución endurecedora de CaCl_2 , aspectos que deben ser controlados véase Tabla 2.

En cuanto a la resistencia, se evidenció que las cápsulas de mayor tamaño (>2 mm) fueron más resistentes a la fragmentación, lo cual se apreció claramente durante el proceso de maceración para determinar la eficacia de encapsulación. Estas cápsulas se percibieron duras al tacto y no mostraron cambios significativos en sus características físicas a lo largo de 10 días ver Tabla 2. Esto sugiere que la proporción de alginato de sodio y almidón de maíz utilizada en la matriz fue adecuada para mantener la integridad física de las cápsulas.

Tabla 2

Propiedades Morfológicas y Físicas de las Cápsulas

# Capsulas a concentración 1.5 ml	Dia 0		Dia 10	
	Forma	Color	Forma	Color
1	2	1	2	1
2	2	1	2	1
3	3	1	3	1
4	3	1	3	1
5	2	1	2	1
6	1	3	1	1
7	3	2	3	1
8	2	1	2	1
9	3	1	3	1
10	2	1	2	1
11	2	1	2	1
12	2	1	2	1

# Capsulas a concentración 1.5 ml	Dia 0		Dia 10	
	Forma	Color	Forma	Color
13	3	2	3	1
14	3	1	3	1
15	1	2	1	1

Nota. Se puede establecer las características morfológicas de las capsulas los días 0 y 10

Color blanco:1

Redonda:1

Color Cafe:2

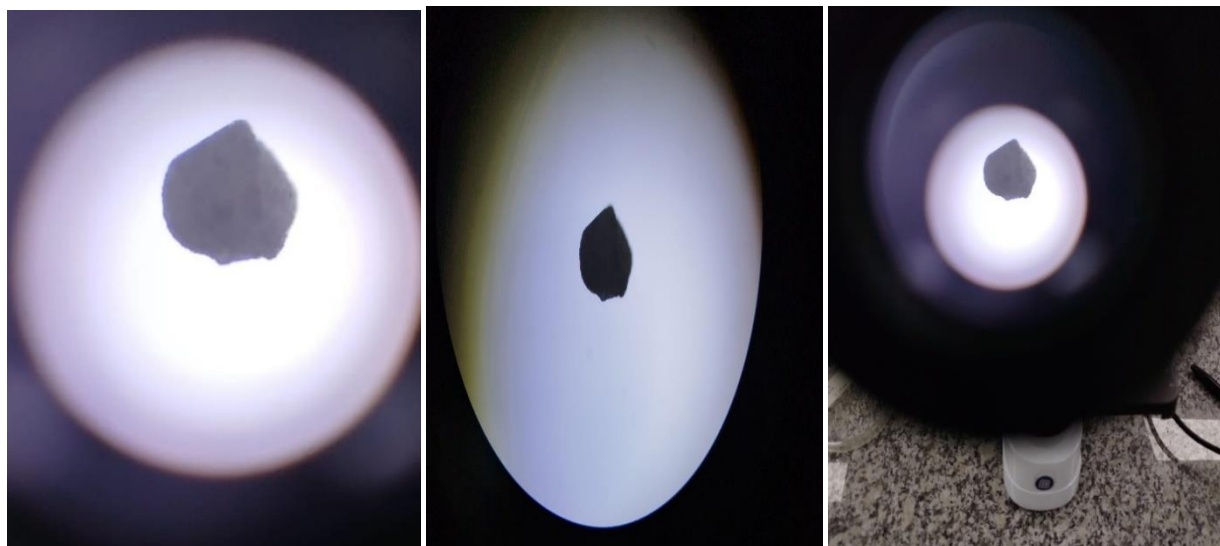
Ovalada o alargada :2

Color Otro:3

Otra:3

Figura 17

Capsulas Vistas a Través del Microscopio



Nota. Morfología de cápsulas de alginato de sodio y almidón de maíz observadas al Microscopio.

Viabilidad de la Encapsulación

El recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) mediante siembra por superficie arrojó los siguientes resultados para el Día 0: 4×10^{-5} UFC/ml/g y 4×10^{-6} UFC/ml/g.

Con base en estos resultados ver Tabla 3 y Figura 18, se deduce que la cantidad de células encapsuladas no es directamente proporcional a la cantidad de células inoculadas inicialmente. Este hallazgo puede atribuirse a varios factores:

Capacidad Límite de las Cápsulas. El espacio físico dentro de las cápsulas podría imponer una limitación a la cantidad de células que pueden albergar.

Pérdida Celular Durante la Formación. Pudo haber una pérdida de células hacia la solución de cloruro de calcio (CaCl_2) durante el proceso de encapsulación.

Integridad Física del Material de Encapsulación. La pérdida celular también depende directamente de la integridad del material de encapsulación y de la velocidad a la que se forman las cápsulas.

Pérdida de Viabilidad: Es posible que parte de las células perdieran su viabilidad dentro de las cápsulas, afectando el recuento final.

Tabla 3

Resultados Obtenidos Viabilidad día 0

G. de cápsulas utilizada	Dilución	# UFC	Resultado
1	1×10^{-1}	>300	3.0×10^{-3} UFC/ml
1	1×10^{-1}	>300	3.0×10^{-3} UFC/ml
1	1×10^{-2}	43	4.3×10^{-3} UFC/ml
1	1×10^{-2}	Contaminada	
1	1×10^{-3}	36	3.6×10^{-3} UFC/ml
1	1×10^{-3}	40	4.0×10^{-4} UFC/ml

G. de cápsulas utilizada	Dilución	# UFC	Resultado
1	1×10^{-4}	10	1×10^{-5} UFC/ml
1	1×10^{-5}	0	0 UFC
1	1×10^{-5}	0	0 UFC
1	1×10^{-6}	0	0 UFC
1	1×10^{-6}	0	0 UFC
1			

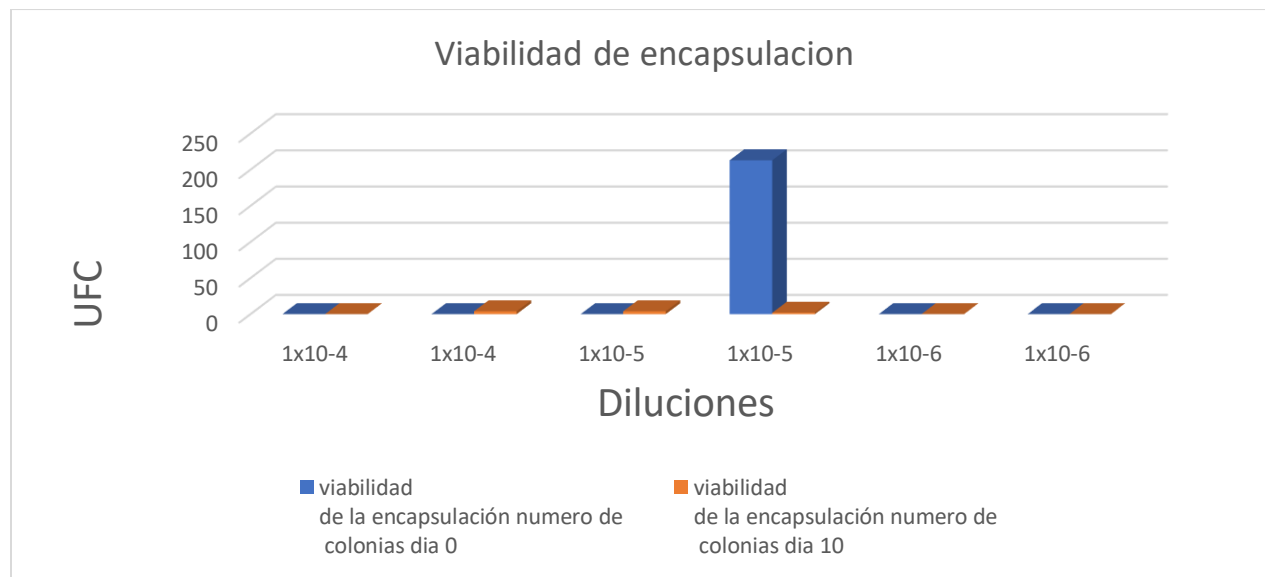
El número total de células en el medio mostró un aumento progresivo, lo que concuerda con las fases típicas del crecimiento bacteriano. Inicialmente, durante la fase exponencial, se observa un incremento significativo en el número de células viables. Posteriormente, en la fase estacionaria, la pérdida de células por muerte se equilibra con la formación de nuevas células en esta fase, el recuento total de células puede incrementarse ligeramente, aunque el número de bacterias viables permanece constante.

Podemos deducir que la fase de adaptación del microorganismo a las condiciones de crecimiento tiene una duración máxima de 48 horas. La fase exponencial de duplicación celular se inicia aproximadamente a las 24 horas y se extiende hasta las 48 horas. A partir de las 48 horas, comienza la fase estacionaria, donde la tasa de crecimiento disminuye debido al agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos metabólicos tóxicos.

Finalmente, tras la fase estacionaria, la tasa de muerte celular se incrementa y el número de bacterias viables disminuye rápidamente, lo que resulta en un notable declive de la curva de crecimiento, como se evidencia en los resultados del Día 10 véase Tabla 4. Figura 19.

Tabla 4*Resultados Obtenidos Viabilidad día 10*

G de cápsulas utilizada	Dilución	# UFC	Resultado
1	1×10^{-4}	0	0 UFC
1	1×10^{-4}	4	4×10^{-5} UFC/ml
1	1×10^{-5}	4	4×10^{-6} UFC/ml
1	1×10^{-5}	2	2×10^{-6} UFC/ml
1	1×10^{-6}	0	0 UFC
1	1×10^{-6}	0	0 UFC

Figura 18*# UFC en las capsulas día 0 y día 10*

Nota. Cantidad de células retenidas en las cápsulas en función del volumen de inóculo en la solución de encapsulación.

Evaluación de las Cápsulas Sometidas a los Jugos Gástricos Simulados (JGS)

Los resultados de la evaluación de las cápsulas de *Lactobacillus rhamnosus* sometidas a jugos gástricos simulados (JGS), muestran una baja viabilidad inicial o poco crecimiento el día 0 véase tabla 5, Fig. 19, en diluciones de 5.4×10^{-5} UFC/ml/g, se observó un incremento notable en las células viables para el día 10.

A pesar de la exposición a los JGS, las reducciones logarítmicas obtenidas en las cápsulas mostraron una cantidad significativa de células viables en diluciones de 10^{-5} (1.1×10^{-9} UFC/ml/g y 10^{-6} 8.9×10^{-8} UFCml/g. ver tabla 6. Esto indica que el microorganismo encapsulado está proliferando activamente, lo que se atribuye a la utilización del almidón de maíz como fuente de energía dentro de la matriz de la cápsula. Este crecimiento sostenido es el resultado del metabolismo bacteriano, una serie de reacciones químicas y enzimáticas que permiten a *Lactobacillus. rhamnosus* mantenerse viable y multiplicarse como se ilustra en la Figura 19.

La capacidad de *Lactobacillus rhamnosus* para sobrevivir en condiciones ácidas y la presencia de bilis en el estómago e intestino es bien conocida. Este probiótico puede disminuir el pH del sustrato por debajo de 4.0 mediante la formación de ácidos como el láctico y acético, una característica crucial para su supervivencia y para ejercer sus efectos beneficiosos.

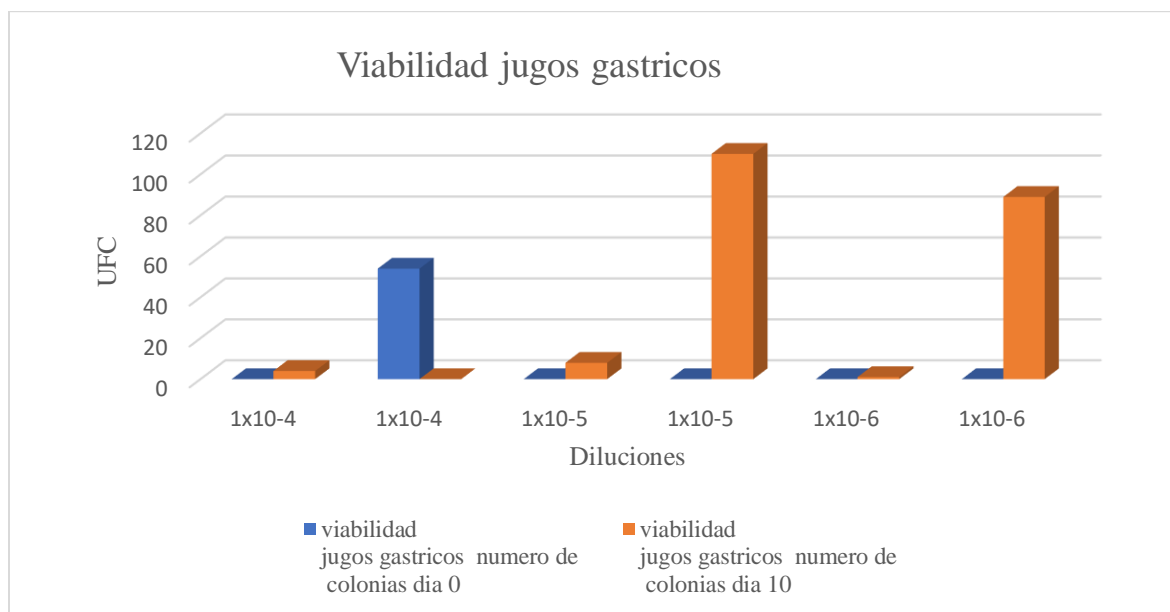
La realización de cada siembra en superficie por triplicado en los diferentes tiempos, y el análisis del promedio de las UFC ml/g recuperados, refuerza la fiabilidad de estos hallazgos. Todo esto es fundamental para garantizar que los probióticos puedan actuar de manera efectiva y ser utilizados con éxito en aplicaciones como la producción animal, donde la viabilidad y funcionalidad en el tracto gastrointestinal son críticas.

Tabla 5*Resultados Obtenidos JGS día 0*

Grs de cápsulas utilizada	Dilución	# UFC	Resultado
1	1×10^{-4}	0	0 UFC/ml
1	1×10^{-4}	54	5.4×10^{-5} UFC/ml
1	1×10^{-5}	0	0 UFC/ml
1	1×10^{-5}	0	0 UFC/ ml
1	1×10^{-6}	0	0 UFC/ml
1	1×10^{-6}	0	0 UFC/ ml

Tabla 6*Resultados Obtenidos JGS día 10*

Grs de cápsulas utilizada	Dilución	# UFC	Resultado
1	1×10^{-4}	4	4×10^{-5} UFC/ml
1	1×10^{-4}	Sin crecimiento	0 UFC
1	1×10^{-5}	8	8×10^{-6} UFC /ml
1	1×10^{-5}	110	1.1×10^{-9} UFC/ml
1	1×10^{-6}	1	1×10^{-7} UFC/ml
1	1×10^{-6}	89	8.9×10^{-8} UFC/ml

Figura 19*Viabilidad de las Capsulas Durante el Paso por JGS*

Nota. Concentración de células viables retenidas en las cápsulas alginato y el almidón durante el tratamiento gástrico simulado.

Viabilidad de la BAL Almacenada en JGS por 10 Días

Se llevó a cabo un ensayo para determinar si la exposición a jugos gástricos inhibía completamente el crecimiento de bacterias en perlas encapsuladas. Estas perlas fueron mantenidas en jugos gástricos y refrigeración durante 10 días ver la tabla 8. A pesar de la aparición de contaminación microbiana, se pudieron presentar debido a varias condiciones en el aire, superficies, equipos, materiales, exposición prolongada de las cajas en las cajas de Petri, el recuento final arrojó un resultado de 6×10^{-3} UFC/g encapsulado.

Este valor representa una reducción de 2 unidades logarítmicas en comparación con la cantidad inicial de UFC/g en el día 0. Sin embargo, esta disminución no se atribuye a una actividad inhibitoria de los jugos gástricos, lo que reafirma la capacidad de la bacteria para resistir estas condiciones. Es posible que la aparente inhibición se deba a la contaminación

microbiana observada durante el recuento, donde la presencia de otros microorganismos pudo haber afectado el crecimiento de *Lactobacillus*, los cuales tienen la capacidad de reducir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo de 4.0, mediante la producción de diversos ácidos como el ácido láctico y el ácido acético.

Estos microorganismos prosperan en medios ligeramente ácidos, con un rango óptimo de desarrollo entre pH 5.5 y 6.2, y pueden tolerar valores de hasta pH 4.5. Esta característica contribuye a su supervivencia en ambientes ácidos como el tracto gastrointestinal.

Tabla 7

Resultados Obtenidos BAL Almacenada en JGS por 10 días

G de cápsulas utilizada	Dilución	# UFC	Resultado
1	1×10^{-4}	18	Contaminada
1	1×10^{-4}	111	Contaminada

Conclusiones

Este trabajo valida la eficacia de la encapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* utilizando una matriz de alginato de sodio y almidón de maíz a través del método de extrusión. Las cápsulas obtenidas no solo mostraron propiedades fisicoquímicas y morfológicas adecuadas, sino que también lograron preservar la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos probióticos de manera sobresaliente.

Un aspecto crucial que se identificó fue la notable influencia de la altura y el tipo de aguja hipodérmica (2 mm) en la eficiencia del proceso de encapsulación, lo que resalta la importancia de la optimización de los parámetros técnicos. Lo más significativo es que la encapsulación mejoró drásticamente la supervivencia de *Lactobacillus rhamnosus* en condiciones gástricas simuladas, evidenciando una impresionante supervivencia de 1.1×10^9 UFC ml/g después de 90 minutos de exposición. La continuidad de una alta viabilidad microbiana, e incluso su incremento al día 10, sugiere que el almidón actúa eficazmente como una fuente de energía dentro de la matriz, promoviendo activamente la proliferación del microorganismo encapsulado.

En síntesis, esta investigación establece una estrategia robusta y prometedora para la protección y entrega de probióticos, abriendo el camino para el desarrollo de productos funcionales con mayor eficacia y una vida útil prolongada.

Recomendaciones

Para futuros estudios, se recomienda, evaluar la optimización en el proceso de encapsulación:

Evaluar diferentes concentraciones de polímeros: Investigar cómo variaciones en las proporciones de alginato de sodio y almidón de maíz, así como la concentración del agente reticulante (CaCl_2), afectan la morfología, el tamaño, la estabilidad y la viabilidad de las cápsulas. Esto podría optimizar la protección y liberación de los probióticos.

Microscopía avanzada: Utilizar microscopía electrónica de barrido (SEM) para obtener imágenes de alta resolución de la superficie y la estructura interna de las cápsulas. Esto puede revelar detalles cruciales sobre la integración del microorganismo y la matriz.

Referencias Bibliográficas

- Agama-Acevedo, E., Juárez-García, E., Evangelista-Lozano, S., Rosales-Reynoso, O. L., & Bello-Pérez, L. A. (2013). Características del almidón de maíz y relación con las enzimas de su biosíntesis. *Agrociencia*, 47 (1), 1-12. Obtenido de <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v47n1/v47n1a1.pdf>
- Amador, L. I. (2021). *Encapsulación de un Consorcio Microbiano con Actividad Promotora de Crecimiento Vegetal (PGPM) en una Matriz de Almidón de Yuca y Alginato*. [Informe para optar el título de Microbiología Industrial], Universidad de Santander , Bucaramanga . Obtenido de <https://repositorio.udes.edu.co/server/api/core/bitstreams/4d831441-f0e0-4624-a494-b5a5e39451a6/content>
- Avendaño-Romero, G. L.-M. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 87-96.
- Bajagai, Y. S., Klieve, A. V., Dart, P. J., & Bryden, W. L. (2016). *Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation*. (FAO, Ed.) Rome: Harinder. Obtenido de <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/2fda2226-b000-4cee-8186-8cacab86316b/content>
- Begley, M., Gahan, C. G., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* , 29(4), 625–651. doi:<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104 (4), 467-483. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026087741000631X>

- Bustamante, M. O. (2017). Effective Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium infantis encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray dr.
- Cañon, Y. O. (2021). Diseño de una matriz comestible maltodextrina-alginato de calcio para encapsulación de Lactobacillus Casei en la aplicación en productos funcionales. Facultad de ciencias exactas, naturales y agropec.
- De Araújo, U. N., Gutiérrez, R. L., Ruiz, V. O., & Montoya, C. O. (2015). Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad. *Asociación Colombiana de Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, 23(36), 112-126. Obtenido de <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/349>
- de Lourdes Pérez-Chabela, M., Yenizey, M., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. A. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión The probiotics and their metabolites in aquaculture. A review. *Hidrobiológica*, 30(1), 93-105. (2020).
- de Lourdes Pérez-Chabela, M., Yenizey, M., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. A. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión The probiotics and their metabolites in aquaculture. A review. *Hidrobiológica*, 30(1), 93-105. (2020).
- De Lourdes Pérez-Chabela, M., Yenizey, M., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. A. (2020).
- De Vos, P., Bucko, M., Gemeiner, P., Navrátil, M., Svitel, J., & Faas, M. o. (2009). Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology. *Biomaterials* , 30(13), 2559-2570. doi:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19201460/>
- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy*

- Journal*, 20(4), 292-302. Obtenido de
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694609002167?via%3Dihub>
- Domínguez, U. A. (2012). *Microencapsulación de Lactobacillus casei ATCC334 utilizando mezclas de almidón de amaranto modificado y maltodextrina como material de pared, mediante secado por aspersión y su viabilidad en la leche en polvo (Doctoral disse.*
- Gao, H. L.–1. (2022). The Functional Roles of Lactobacillus acidophilus in Different Physiological and Pathological Processes. *Journal of microbiology and biotechnology*,.
- Gao, H., Li, X., Chen, X., Hai, D., Wei, C., Zhang, L., & Li, P. (2022). The Functional Roles of Lactobacillus acidophilus in Different Physiological and Pathological Processes. *Journal of microbiology and biotechnology*, 32(10), 1226–1233. doi:doi: 10.4014/jmb.2205.05041
- García, Q. A. (2015). *Obtención de un polímero biodegradable a partir de almidón de maíz.* Escuela Especializada en Ingeniería ITCA -FEPADE, San Salvador. Obtenido de <https://www.itca.edu.sv/wp-content/themes/elaniin-itca/docs/2015-Obtencion-de-un-polimero-biodegradable.pdf>
- Ki-Yong, L., & Tae-Ryeon, H. (2000). Survival of Bifidobacterium longum Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 869-873. Obtenido de <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aem.66.2.869-873.2000>
- Kumar, A. A., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240-251. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224407000350?via%3Dihub>

- Lee, K., & Heo, T. (2000). Supervivencia de *Bifidobacterium longum* inmovilizada en perlas de alginato de calcio en jugos gástricos simulados y solución de sales biliares. *Microbiología ambiental de Appl*, 66(2), 869-873. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10653768/>
- Makarova, A., Slesarev, Y., Wolf, A., Sorokina, B., & otros. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Biological Sciences*, 103(42), 15611-15616. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 15-25. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S146685641400160X>
- Nazzaro, F. F. (2009). *Capacidad fermentativa de Lactobacillus acidophilus encapsulado con prebióticos de alginato y supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas. Journal of Functional Foods* ,.
- Nazzaro, F. F. (2009). *Capacidad fermentativa de Lactobacillus acidophilus encapsulado con prebióticos de alginato y supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas. Journal of Functional Foods* , 1 (3), 319-323.
- Nazzaro, F. F. (2009). *Capacidad fermentativa de Lactobacillus acidophilus encapsulado con prebióticos de alginato y supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas. Journal of Functional Foods* , 1 (3), 319-323.
- Nazzaro, F. F. (2009). *Capacidad fermentativa de Lactobacillus acidophilus encapsulado con prebióticos de alginato y supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas. Journal of Functional Foods*. 1 (3), 319-323. .

- Nazzaro, F. F. (2009). Capacidad fermentativa de *Lactobacillus acidophilus* encapsulado con prebióticos de alginato y supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas. *Journal of Functional Foods* , .
- Nazzaro, F. F. (2009). Capacidad fermentativa de *Lactobacillus acidophilus* encapsulado con prebióticos de alginato y supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas. *Journal of Functional Foods* , .
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002665>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO]. (2001). *Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Cordoba-Argentina. Obtenido de <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/382476b3-4d54-4175-803f-2f26f3526256/content>
- Ramos Gorbeña, J. C. (2008). Bacterias ácido lácticas: Biopreservante de los alimentos. Obtenido de Universidad Ricardo Palma: https://www.lareferencia.info/vufind/Record/PE_174808a6de6e99cac2693973b089d376.
- Ranadheera, C., Evans, C., Adams, M., & Baines, S. (2012). In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Research International*, 49(2), 619-625. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996912003663>
- Reid, A. V. (2005). Micro entrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein. *Microencapsulation*, 22, 603- 619.

- Requena, T. (2018). 1er Simposio Internacional sobre bacterias ácido lácticas y microorganismos probióticos: bioprospección y aplicaciones biotecnológicas. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquía. Obtenido de <https://digital.csic.es/handle/10261/194782>
- Rodríguez-Barona, S., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebióticos. *Información tecnológica*, 27(6), 135-144. Obtenido de <https://www.scielo.cl/pdf/infotec/v27n6/art14.pdf>
- Saad, N. D. (2013). *An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field*. *Food Science and Technology*, 50, 1-16.
- Sajilata, M. S. (2006). *Almidón resistente: una revisión*. *Revisiones exhaustivas en ciencia y seguridad alimentaria*, 5 (1), 1-17.
- Sandoval, A. A., Rodríguez, S. E., & Ayala, A. A. (2004). Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. *73Ingeniería y Competitividad*, 5(4), 73-83. Obtenido de <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/server/api/core/bitstreams/fd1f051d-c567-4847-95e0-0ae8baa23e45/content>
- Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*, 43(1), 193-202. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996909002932>
- Silva, B.-G. A., Cyrille, Richard, Bessodes, M., & Scherman, D. o. (2011). Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. *Journal of Controlled Release*, 149(3), 209-224. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365910007893?via%3Dihub>
- Soccol. (2010).

- Soccol, C.R.; Vandenberghe, L.P.S.; Spier, M.R.; Medeiros, A.B.P.; Yamaguishi, C.T.; Lindner, J.D.; Pandey, A.; Thomaz-Soccol, V. . (2010).
- Soccol, C.R.; Vandenberghe, L.P.S.; Spier, M.R.; Medeiros, A.B.P.; Yamaguishi, C.T.; Lindner, J.D.; Pandey, A.; Thomaz-Soccol, V. 2010. The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology* 48: 413–434. (2010).
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 47-55. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160500003809?via%3Dihub>
- Tormo, C. R. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de pediatría*, 4(S1), 30-41. Obtenido de <https://www.analesdepediatria.org/es-probioticos-concepto-mecanismos-accion-articulo-13092364>
- Villalobos-Samaniego, C., Rivera-Sosa, J. M., Ramos-Jimenez, A., & Cervantes-Borunda, M. S. (2020). Métodos de evaluación del equilibrio estático y dinámico en niños de 8 a 12 años. *Nuevas tendencias en Educación Física, Deporte y Recreación*(37), 793-801. Obtenido de <https://recyt.fecyt.es/index.php/retos/article/view/67809>
- Zhu, H., Li, Z., Mao, S., Ma, B., Zhou, S., Deng, L., . . . He, J. (2011). Antitumor effect of sFlt-1 gene therapy system mediated by *Bifidobacterium Infantis* on Lewis lung cancer in mice. *Cancer Gene Ther*, 18(12), 884-896. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21921942/>