

Evaluación del efecto de una matriz de alginato de sodio y almidón de maíz en la supervivencia de *Lactocaseibacillus rhamnosus* encapsulado por extrusión con potencial uso en alimentación de aves

Mayra Andrea Tejada Rico

Asesoras:

Liliana Londoño Hernández

Andrea Vásquez García

Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería ECBTI
Maestría en Biotecnología Alimentaria
2025

Declaración de Derechos de Propiedad Intelectual

La autora de la presente propuesta manifiesta que conoce el contenido del Acuerdo 06 de 2008, Estatuto de Propiedad Intelectual de la UNAD, Artículo 39 referente a la cesión voluntaria y libre de los derechos de propiedad intelectual de los productos generados a partir de la presente propuesta. Asimismo, conoce el contenido del Artículo 40 del mismo Acuerdo, relacionado con la autorización de uso del trabajo para fines de consulta y mención en los catálogos bibliográficos de la UNAD.

Resumen

En el mercado existen diversos productos probióticos empleados como aditivos en la nutrición de animales de producción, que pueden presentar problemas con la viabilidad de los microorganismos que contienen, al presentar una baja tasa de supervivencia por diferentes condiciones tecnológicas, ambientales y gastrointestinales, por lo cual se usa la encapsulación como estrategia para incrementar la viabilidad del probiótico. El objetivo del trabajo fue evaluar las condiciones de supervivencia del microorganismo *Lacticaseibacillus rhamnosus* usando una membrana compuesta por almidón de maíz y alginato sódico. Para esto se utilizó un diseño experimental de mezclas para elegir la concentración de los materiales encapsulantes más favorable para la supervivencia del microorganismo, evaluándose la resistencia de la mezcla con mayor eficiencia a condiciones ácidas gástricas simuladas a valores de pH 1 y 2. Se obtuvo que la mezcla con mejor eficiencia de encapsulación fue la de almidón de maíz al 10% y de alginato de sodio a 2%, con una viabilidad promedio de 45,59%, es decir, no se consiguió una viabilidad superior al 70% que era la esperada. Adicionalmente, una vez sometidas las perlas de la concentración indicada a valores de potencial de hidrógeno bajos y un tiempo de 120 minutos no hubo supervivencia del microorganismo, es decir, la matriz encapsulante propuesta no fue efectiva en la conservación del lactobacilo para el tiempo promedio máximo que tarda un alimento en pasar por el estómago de las aves de corral, por ende, no fue posible obtener un prototipo de cápsula resistente, que conservará establemente a *L. rhamnosus* y asegurará su sobrevivencia durante todo el procesamiento, almacenamiento y consumo, para ser utilizado como suplemento en alimentación avícola.

Palabras claves: Encapsulación, probióticos, membrana, cápsulas, alimentación animal.

Abstract

There are several probiotic products on the market used as additives in the nutrition of production animals, which can present problems with the viability of the microorganisms they contain, presenting a low survival rate due to different technological, environmental and gastrointestinal conditions, which is why encapsulation is used as a strategy to increase the viability of the probiotic. The objective of the work was to evaluate the survival conditions of the microorganism *Lactobacillus rhamnosus* using a membrane composed of corn starch and sodium alginate. For this, an experimental mixture design was used to choose the concentration of the encapsulating materials most favorable for the survival of the microorganism, evaluating the resistance of the mixture with greater efficiency to simulated gastric acid conditions at pH values 1 and 2. It was obtained that the mixture with the best encapsulation efficiency was that of 10% corn starch and 2% sodium alginate, with an average viability of 45.59%, that is, a viability higher than 70%, which was expected, was not achieved. Additionally, once the pearls of the indicated concentration were subjected to low hydrogen potential values and a time of 120 minutes, there was no survival of the microorganism, that is, the proposed encapsulating matrix was not effective in the conservation of *Lactobacillus* for the maximum average time that a food takes to pass through the stomach of poultry, therefore, it was not possible to obtain a resistant capsule prototype, which will stably conserve *L. rhamnosus* and ensure its survival throughout the processing, storage and consumption, to be used as a supplement in poultry feed.

Keywords: Encapsulation, probiotics, membrane, capsules, animal feed

Tabla de Contenido

Introducción	9
Planteamiento del Problema	11
Justificación	14
Objetivos	18
Objetivo General.....	18
Objetivos Específicos	18
Marco Conceptual y Teórico.....	19
Probióticos.....	19
Probióticos en Alimentación Avícola.....	21
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	23
Encapsulación	24
Encapsulación por Extrusión	25
Materiales de Encapsulación.....	25
Metodología	30
Materiales y Métodos	30
Materiales	30
Métodos.....	31
Análisis Estadístico	38
Resultados y Análisis	40
Concentración de Alginato y Almidón de Maíz	40

Tasa de Supervivencia.....	45
Características de las Cápsulas	48
Liberación de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> de las Cápsulas Expuestas a pH 1 y 2	51
Conclusiones	58
Recomendaciones	60
Referencias Bibliográficas.....	62

Lista de figuras

Figura 1 <i>Encapsulación de probióticos mediante las técnicas de emulsión y extrusión por goteo, usando alginato como matriz de encapsulación.</i>	26
Figura 2 <i>Estructura del alginato</i>	27
Figura 3 <i>Estructura de la amilosa y amilopectina</i>	29
Figura 4 <i>Activación de la cepa</i>	32
Figura 5 <i>Preparación de la muestra</i>	34
Figura 6 <i>Encapsulación de la muestra</i>	35
Figura 7 <i>Liberación de <i>L. rhamnosus</i> a valores de pH de 1 y 2</i>	39
Figura 8 <i>Recuento en placa Muy Numeroso para Contar (MNPC)</i>	42
Figura 9 <i>Rastreo de respuesta</i>	43
Figura 10 <i>Optimización de respuesta</i>	44
Figura 11 <i>Eficiencia de encapsulación vs concentración de alginato</i>	46
Figura 12 <i>Variación de color de las microcápsulas</i>	49
Figura 13 <i>Morfología de cápsula vista en un microscopio óptico</i>	50
Figura 14 <i>Morfología de cápsulas vistas en un microscopio y estereoscopio electrónicos</i>	50
Figura 15 <i>Supervivencia de <i>L. rhamnosus</i> encapsulado expuesto a pH 1 y 2</i>	52
Figura 16 <i>Morfología de las colonias después de ser sometidas a condiciones ácidas</i>	54

Lista de tablas

Tabla 1 <i>Nuevos nombres para algunas antiguas especies probióticas de Lactobacillus</i>	20
Tabla 2 <i>Nomenclatura utilizada para los microorganismos probióticos</i>	21
Tabla 3 <i>Mezclas de las concentraciones de los medios encapsulantes aleatorizadas</i>	33
Tabla 4 <i>Registro de recuento microbiano de concentración inicial</i>	40
Tabla 5 <i>Registro de recuento microbiano de cápsulas disueltas</i>	41
Tabla 6 <i>Eficiencia de encapsulación de las corridas experimentales</i>	45

Introducción

En las últimas décadas, el uso de probióticos en la alimentación animal ha cobrado especial relevancia debido a los múltiples beneficios que ofrecen, entre ellos, la mejora del rendimiento productivo, la estimulación del sistema inmune y el aumento en la resistencia frente a enfermedades. En el caso específico de la producción avícola, hoy en día uno de sus mayores desafíos es mantener altos niveles de eficiencia sin comprometer la salud animal ni la seguridad del consumidor. Durante décadas, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento fue una práctica común en la industria, lo que contribuyó al desarrollo de aves más resistentes y productivas. Sin embargo, este modelo ha demostrado tener efectos secundarios preocupantes, como el incremento de la resistencia antimicrobiana en patógenos zoonóticos y la posible transferencia de esa resistencia a los seres humanos a través del consumo de carne contaminada.

La creciente demanda por alimentos más saludables, seguros y producidos bajo prácticas sostenibles ha impulsado la investigación de nuevas estrategias para la mejora del bienestar animal sin comprometer la eficiencia productiva. En este contexto, los probióticos han demostrado ser aliados importantes, no solo por sus efectos beneficiosos a nivel digestivo e inmunológico, sino también por su potencial para reducir la necesidad de antibióticos en la industria avícola. No obstante, el uso efectivo de probióticos plantea su propio reto: lograr que estos microorganismos lleguen vivos y activos al intestino, lugar donde ejercen su función. La acidez gástrica, las condiciones de almacenamiento y los procesos de elaboración de alimentos reducen su viabilidad, comprometiendo su eficacia. En este contexto, la encapsulación se presenta como una estrategia técnica esencial. De entre las diversas metodologías disponibles, la

técnica de extrusión destaca por ser accesible, de bajo costo, poco agresiva para los microorganismos y compatible con una variedad de materiales encapsulantes.

Particularmente, el uso de alginato de sodio y almidón de maíz como materiales de recubrimiento ha sido ampliamente documentado por sus propiedades protectoras, su biocompatibilidad y su capacidad para formar estructuras estables. Sin embargo, pese a la vasta literatura sobre encapsulación de probióticos, pocos estudios han explorado de forma conjunta el uso de alginato y almidón de maíz en la técnica de extrusión aplicados a *Lactocaseibacillus rhamnosus*, una cepa con alto potencial por su actividad antimicrobiana y resistencia a condiciones adversas del sistema digestivo.

Este trabajo busca justamente abordar ese vacío investigativo y se propuso evaluar el efecto de esta matriz dual sobre la viabilidad del probiótico bajo condiciones ácidas simuladas (pH 1 y 2), similares a las del sistema digestivo de las aves de corral.

Planteamiento del Problema

Los probióticos son microorganismos que producen beneficios a la salud de quienes los consumen, ya sean seres humanos o animales; su uso en alimentación animal es cada vez más extendido, debido a que se ha demostrado que mejora el rendimiento de crecimiento, la resistencia a enfermedades, la estimulación inmune, entre otras (Vimon et al., 2023); específicamente en aves, su aplicación empezó a incrementarse desde 2006 cuando la Comunidad Europea prohibió el uso de antibióticos como subterapéuticos en las granjas avícolas (Díaz et al., 2017), ya que estos son usados no sólo como medicamentos para las aves, sino también como promotores de crecimiento con el objetivo de incrementar la eficiencia productiva del sector; debido a lo anterior han surgido problemas de resistencia a enfermedades microbianas en las aves y reacciones cruzadas con antibióticos humanos en las personas que consumen la carne contaminada con estos medicamentos (González et al., 2020), por lo cual muchos países han prohibido o restringido su uso (Muñoz, 2019; Scolari, 2019), dando así lugar que se busquen otras formas para mejorar las condiciones de salud y desarrollo de los animales de las granjas avícolas, como es el uso de probióticos.

Adicional a lo anterior, la creciente demanda de alimentos sanos y orgánicos, hace que se estudien otras posibilidades de desarrollo en el sector que sean mucho más amigables no solo con el medio ambiente, sino con las aves en sí y también con la población consumidora, y que además ofrezcan resultados económicos más favorables (González et al., 2020; Nunes et al., 2016); los microorganismos probióticos son presentados como ingredientes activos en los alimentos funcionales (Rodríguez et al., 2016) y hacen parte de esas otras opciones que actualmente son tan atractivas por sus funciones diferenciadas y benéficas para quienes los

consumen, en este caso, para las aves, pero para que estos sean aprovechados deben encontrarse en los alimentos, hasta su vida útil, en una concentración mínima de 10^6 UFC/g de acuerdo con el Ministerio de Salud y Protección Social (2021), además de ser capaces de sobrevivir al paso por el tracto digestivo superior hasta llegar a los intestinos para conseguir los efectos funcionales que proveen (Bernal et al., 2017), en caso contrario los microorganismos probióticos pierden su viabilidad (De Araújo, 2016).

La calidad de estos productos probióticos deriva del fabricante, siendo posible que no se cumplan las normas de calidad, como la garantía de la potencia (conservación de la viabilidad hasta el final de la vida útil), la pureza y la identidad, siendo demostrado que diversos productos presentes en el mercado no cumplen lo declarado en la etiqueta (Organización Mundial de Gastroenterología, 2023).

Es por lo anterior, que surge la necesidad de proteger estos microorganismos mediante algún sistema, para preservarlos de los factores ambientales, no sólo durante el procesamiento, almacenamiento sino también durante la primera fase de la digestión, es por eso que surge la encapsulación de probióticos como una solución, la cual puede realizarse bajo diferentes técnicas, para este caso se elige la encapsulación por extrusión debido a que esta es una tecnología simple (De La Cruz y Terán, 2013), muy amigable con los microorganismos al ser suave en comparación con otras técnicas (Pérez et al., 2013), es de fácil proceso, no lleva sustancias tóxicas (Jiménez, 2010; Pérez et al., 2013); y permite realizarse en condiciones aeróbicas y anaeróbicas de acuerdo al tipo de microorganismo a utilizar (Jiménez, 2010); y como materiales encapsulantes se proponen el alginato y el almidón de maíz, por ser productos no perjudiciales, de fácil adquisición y con cualidades reconocidas para la encapsulación.

Lopes et al. (2017) menciona que existen diferentes referencias sobre encapsulación de *Lactobacillus* usando alginato como encapsulante, como *Lactobacillus bulgaricus* (Chen et al., 2014) *L. plantarum* (Wang et al., 2016), *L. fermentum* (Martin et al. 2013), *L. acidophilus* (Etchepare et al., 2016), *L. rhamnosus* usando proteína de suero e isomaltooligosacárido (Liu et al., 2016), sílice (Zhao et al., 2016), pectina (Li et al., 2016), quitosano (Gandomi et al., 2016) y proteína de suero (Doherty et al., 2012).

Conforme a lo anterior, ¿cuál es el efecto de una matriz a base de alginato y almidón de maíz en la encapsulación por extrusión del probiótico *Lacticaseibacillus rhamnosus* y su supervivencia a condiciones ácidas con valores de pH 1 y 2?

Justificación

La flora intestinal reforzada con probióticos no sólo sirve para mantener la autorregulación de la respuesta inmune, sino también como estimulante de los mecanismos de defensa de la mucosa gastrointestinal al reducir el pH lo cual favorece la digestibilidad, la absorción de nutrientes, la disminución de microorganismos patógenos y la recuperación luego de circunstancias debilitantes o de estrés. Todo lo anterior, beneficia a las aves haciendo que sean menos propensas a enfermedades al tener una mejor respuesta inmune; además implica la reducción de la aplicación de antibióticos tanto para tratamiento de enfermedades como promotores de crecimiento, al haber un mejor aprovechamiento de nutrientes y por ende una mayor conversión alimenticia (Chávez et al., 2015; González et al., 2020; Nunes et al., 2016).

Gracias al reconocimiento de los beneficios de los probióticos en las aves y de las adopciones de países europeos como de Estados Unidos en cuanto a las producciones aviares libres de antibióticos o a la prohibición y /o reducción de uso de ciertas sustancias (Rosales et al., 2023), es posible observar que a nivel nacional el consumo de los mismos ha ido creciendo a punto tal que al menos entre el 30 y el 40 % de las granjas avícolas los han usado alguna vez, siendo aplicados tanto en el agua como en el concentrado y principalmente importados a pesar que existen probióticos de producción nacional (Barajas, 2018).

Para este caso, se elige el *Lacticaseibacillus rhamnosus* por su conocida actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* y protección antiviral contra el rotavirus (Duvós, 2016); también es resistente al pH bajo y a los fluidos biliares, no inhibe el crecimiento de otras bacterias ácido lácticas (Calderón et al., 2007), tiene una elevada capacidad de adhesión a la mucosa intestinal facilitando la

colonización; además está catalogado QPS (Qualified Presumption of Safety) por la EFSA (European Food Safety Authority) (Sacco S.r.l., 2017) y es utilizado en una gran variedad de alimentos funcionales desde hace más de dos décadas (Duvós, 2016).

Una de las metodologías para la conservación con una alta viabilidad y estabilidad de los microorganismos probióticos se encuentra la encapsulación (De Araújo, 2016), puesto que los protege de los factores medioambientales al recubrirlos por una matriz protectora (Rodríguez et al., 2016). Entre las técnicas de encapsulación de microorganismos se tienen métodos químicos que por lo general son más complejos y costosos, como la polimerización interfacial, la co-cristalización, la incompatibilidad polimérica, entre otros, y los métodos físicos entre los cuales se encuentran algunos que pueden ser muy costosos como la liofilización, mientras que otros son más accesibles económica y tecnológicamente que pueden ser una buena opción para incrementar el desarrollo de la producción en el país de este tipo de productos como la extrusión (Parra, 2010), la cual es poco agresiva, se puede usar en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y no utiliza sustancias nocivas para los microorganismos (Páez, 2013).

Además, entre los materiales usados como matriz encapsulante, se cuentan con proteínas, carbohidratos y lípidos permitiendo escoger entre diversos productos, aunque generalmente se eligen polisacáridos, puesto que son fáciles de degradar por la microbiota intestinal, no son digeridos en el tracto gastrointestinal superior y facilitan la formación esférica de las microcápsulas (Páez, 2013; Rodríguez et al., 2016), por eso se escogen el almidón de maíz y el alginato, siendo este último utilizado frecuentemente en estos procesos por garantizar una mayor viabilidad (De Araújo, 2016). Nezamdoost et al. (2023) resalta el uso del alginato en la administración de probióticos tanto en la industria alimentaria como médica, también destaca la microencapsulación de diversos probióticos con diferentes matrices basadas en alginatos con

otros componentes y sus técnicas de encapsulación, entre los que se encuentran la encapsulación de *L. rhamnosus* en alginato de sodio y β -glucano mediante secado en spray; en alginato con polisacáridos como celulosa y pectina, con lípidos como manteca de cacao o grasas lácteas, entre otras.

Velloso et al. (2023) expone el uso y cualidades del almidón en la encapsulación y menciona diversas revisiones bibliográficas realizadas como “el control de liberación y el papel del almidón en el proceso de encapsulación” por Boosani y Jafari (2021) y Zhu (2017); la “evaluación de las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera de materiales a base de almidón” por Hoyos et al. (2018), Niranjana y Prashantha, (2018) y Shah et al. (2016); las “propiedades antibacterianas y antioxidantes de las películas de almidón, su capacidad para servir como barrera ultravioleta (UV), vapor de agua y oxígeno” de Cui et al. (2021) y Lauer y Smith (2020). Adicional a lo anterior, Velloso et al. (2023) también indican que desde el 2014 ha habido un incremento acelerado en el estudio de la “encapsulación de microorganismos en una matriz de almidón para aplicaciones en diferentes áreas”, donde el 93% de las publicaciones han sido referentes al sector agroalimentario, siendo el uso de membrana de almidón para encapsulación la más explorada para la transmisión de probióticos, donde los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* fueron los más estudiados.

Aunque la literatura menciona el alginato en combinación con otras sustancias u almidones, no se ha encontrado por el momento un documento que contenga esta misma mezcla, el mismo método de encapsulación y que se utilice con *L. rhamnosus*; por eso se eligen estos parámetros de trabajo.

El impacto esperado de los resultados de este trabajo es que, en caso de ser favorables, puedan ser implementados u adoptados por la industria avícola y sus adyacentes a cualquier

escala, para el provecho de las aves, la población consumidora y del sector en general. En caso de ser negativos, se esperaría que se continuara con el estudio y la investigación al respecto para encontrar otras posibles alternativas o aplicaciones que puedan ser escaladas o adoptadas.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto del alginato y el almidón de maíz como recubrimiento en la encapsulación mediante la técnica de extrusión del probiótico *Lacticaseibacillus rhamnosus*, en su supervivencia a condiciones ácidas con valores de pH 1 y 2.

Objetivos Específicos

Determinar la concentración de alginato y almidón de maíz en la encapsulación de *Lacticaseibacillus rhamnosus* que permita conservar la viabilidad del microorganismo en las cápsulas por recuento microbiano y determinación de la eficiencia de encapsulación.

Caracterizar las cápsulas obtenidas mediante la definición de su morfología a través de análisis microscópico y macroscópico.

Cuantificar la liberación de la cepa a valores de pH 1 y 2, usando soluciones ácidas similares a los jugos gástricos de aves de corral.

Marco Conceptual y Teórico

En el presente marco teórico y conceptual se abordan dos temáticas principales que dan un soporte de base al proyecto de investigación, las cuales son: (1) probióticos y (2) encapsulación, dentro de los cuales se describen sus generalidades y las particularidades aplicadas al proyecto.

Probióticos

De acuerdo al informe del trabajo conjunto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentos (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (WHO) (2002), los probióticos son definidos como “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del consumidor”; y entre los requisitos que deben cumplir para que sean considerados como tal están: las cepas usadas en humanos deben ser preferiblemente obtenidas de humanos, los cuales deben estar sanos, no deben ser tóxicas ni patógenas, no deben presentar genes transmisibles de resistencia a antibióticos (Rondón et al., 2015), deben ser resistentes a las sales biliares y al pH ácido del estómago (Sanz y Dalmau, 2008), deben tener buena adherencia a las superficies epiteliales, deben ser inmunoestimulantes sin conllevar procesos inflamatorios, deben poseer cualidades antimutagénicas y anticarcinogénicas, además deben conservar su viabilidad desde la fase productiva hasta su consumo y estar soportadas con estudios y evidencias científicas (Rondón et al., 2015).

Según Olveira y González (2016) los mecanismos de acción más frecuentes en la mayoría de los probióticos se tienen la “resistencia a la colonización”, la “producción de ácidos grasos de cadena corta y de acidificación del medio”, la “regulación del tránsito gastrointestinal”,

la “normalización de la microbiota”, el “aumento de la regeneración de enterocitos” y la “exclusión competitiva de patógenos”; también existen mecanismos de acción comunes a ciertas especies como lo son el antagonismo directo respecto a otras bacterias, el robustecimiento de la barrera intestinal, la neutralización de carcinógenos y la síntesis de vitaminas; e igualmente se presentan mecanismos poco comunes y muy específicos de ciertas especies como la producción de sustancias bioactivas y generación de efectos inmunológicos, endocrinológicos y neurológicos.

Entre las principales especies de probióticos se encuentran: bacterias ácido-lácticas, habitualmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Organización Mundial de Gastroenterología, 2023), los cuales son muy utilizados en la industria láctea y cárnica; bacterias no patógenas como la *Escherichia coli* Nissle 1917 y/o microbios no bacterianos como la *Saccharomyces boulardii* (Rondón et al., 2015).

En 2020 el género *Lactobacillus* fue reestructurado, ampliando la gama de microorganismos asignados y cambiando los nombres (Organización Mundial de Gastroenterología, 2023), como se aprecia en la tabla 1:

Tabla 1 Nuevos nombres para algunas antiguas especies probióticas de *Lactobacillus*

Nombre anterior	Nombre nuevo
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>

Nota. Tomado de *Probióticos y prebióticos*, Directrices mundiales de la Organización Mundial de

Gastroenterología, 2023, de <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2023.pdf>

En la tabla 2 se aprecian ejemplos de cepas comerciales y sus nombres:

Tabla 2 Nomenclatura utilizada para los microorganismos probióticos

Género	Especie	Subespecie	Designación de la cepa	Designación depositario internacional de cepas	Apodo de la cepa	Nombre del producto
<i>Lactocaseibacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	Ninguna	GG	ATCC 53103	LGG	Culturelle
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i>	<i>lactis</i>	DN-173 010	CNCM I-2494	<i>Bifidus regularis</i>	Yogur Activia
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	<i>Longum</i>	35624	NCIMB 41003	<i>Bifantis</i>	Align

Nota. Tomado de *Probióticos y prebióticos*, Directrices mundiales de la Organización Mundial de

Gastroenterología, 2023, de <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2023.pdf>

Probióticos en Alimentación Avícola

El mayor costo en la producción avícola está relacionado con la alimentación, llegando a ser hasta el 70% del costo productivo total (Cuéllar, 2022), lo cual hace que cuando hay incrementos significativos en los insumos de la alimentación animal exista un aumento considerable en el valor de la canal (Jadhav et al., 2015; Moreno, 2022); además el uso de diferentes promotores de crecimiento como antibióticos y hormonas en la alimentación de las aves implican no sólo una elevación en los costos sino que conlleva riesgos tanto para las aves como para los consumidores, al incidir al desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos y a producir efectos residuales en los huevos y carne que son consumidos por la población elevando los riesgos en la salud de ésta (Jadhav et al., 2015; Scolari, 2019); por ende, el uso de probióticos en aves benefician no sólo a los animales sino al productor, ya que gracias a sus beneficios demostrados se consigue una producción mayor y más segura (Jadhav et al., 2015).

La flora intestinal presente en las aves de corral son de dos tipos: (a) las bacterias autóctonas, que son aquellas que colonizan el intestino y proceden del medio ambiente como

resultado de la conducta alimentaria u otras actividades; (b) las bacterias exógenas, que son aquellas que se introducen como suplemento dietético, a través del agua o a la alimentación directa, en este caso, los probióticos, que pueden ser cultivos microbianos de una sola especie o mixtos, que también son llamados como productos microbianos de alimentación directa o DMF por sus siglas en inglés (Jadhav et al., 2015).

El uso de probióticos en aves ha demostrado promover el crecimiento de bacterias benéficas en el intestino (de Souza et al., 2022; Díaz et al., 2017), ayudando a la sintomatología de la disbiosis producida por el uso de antibióticos promotores de crecimiento, disminuyendo la población de patógenos entéricos en los animales (Díaz et al., 2017), incidiendo en una mayor eficiencia de rendimiento (de Souza et al., 2022); además estimulan el sistema inmunológico: optimizando la producción de inmunoglobulina-IgA, IgM, IgG y citocina, aumentando los anticuerpos y la actividad de micrófagos, lo cual hace que las aves sean menos propensas a enfermarse (Jadhav et al., 2015), aumento de la actividad de células natural killer (NK), caracterizadas por su efecto citotóxico y producción de citoquinas (Díaz et al., 2017). También disminuye las emisiones de amoníaco en los pollos, mejora la calidad de los huevos, disminuye la acumulación de grasa en el hígado y mejora el metabolismo lipídico en las gallinas ponedoras (Liu et al., 2023).

Los lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas (BAL) son comúnmente utilizados como cepas probióticas en aves, debido a la reducción de pH del contenido luminal ocasionada por los metabolitos producidos, lo cual inhibe el crecimiento de coliformes, clostridios y *Salmonella* y suprime la nocividad de *E. coli* en el sistema digestivo (Jadhav et al., 2015) y además ayudan en la prevención de ocurrencia de lesiones en la superficie de absorción del intestino (Díaz López et al., 2017).

Lacticaseibacillus rhamnosus

Este microorganismo era anteriormente llamado (años 2020 hacia atrás) *Lactobacillus rhamnosus*. Es una bacteria Gram positiva, con forma de bastón, no esporulada, heterofermentativa, sin motilidad, que produce ácido láctico y que no hidroliza arginina (USP, 2021); está catalogada como microorganismo seguro según la calificación Qualified Presumption of Safety (QPS) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2024), gracias a los polisacáridos de su superficie posee la mejor adherencia a la mucosa intestinal respecto a otros lactobacilos, genera más de 90 proteínas involucradas en inmunomodulación, actividad de bacteriófagos y formación de biopelículas (Galego, 2019); además se ha evidenciado que la suplementación con este microorganismo sirve para mejorar la diversidad de especies de la microbiota intestinal y disminuir la adhesión de patógenos como *Salmonella spp.* (Mekonnen et al., 2024).

Su uso en aves ha demostrado que estabiliza la flora intestinal y mejora la conversión alimentaria, generando una mayor digestibilidad de nutrientes; también se encontró que al ser incorporado en la alimentación de las aves durante las primeras semanas de vida mejora el tiempo de respuesta del animal al tener en menor tiempo una flora intestinal óptima; además favorece un mejor aprovechamiento de la lisina, lo cual incide en un mayor rendimiento de la pechuga y la relación de costos no se ve afectada, porque la inversión en los probióticos evita el gasto en antibióticos preventivos durante la primera semana de vida, y por el contrario, el costo por kg de peso fue menor en las aves suplementadas con este probiótico junto con *Lactobacillus acidophilus* por tener un mayor peso respecto a las que no los recibieron (Acosta et al., 2007).; adicional a lo anterior, su uso en gallinas ponedoras evidenció una mejor calidad en la cáscara

del huevo y un mejor metabolismo de lípidos, al disminuir la concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de ácidos grasos libres (FFA) en sangre (Liu et al., 2023).

Encapsulación

Conforme a Sandoval et al. (2016) la encapsulación es un proceso mediante el cual se contienen sustancias o agentes activos en el interior de otra, la cual forma un revestimiento protector del medio ambiente; este es semipermeable y controla el flujo de sustancias; la sustancia protegida recibe el nombre de centro activo, relleno, corazón o fase interna, mientras que la sustancia protectora se llama cápsula, membrana, matriz, pared o recubrimiento (Sandoval et al., 2004).

Esta aplicación tecnológica se utiliza para proteger células vivas o moléculas bioactivas (minerales, antioxidantes, vitaminas, ácidos grasos, licopenos, etc.) (Amador, 2021; Sandoval et al., 2016) para ser incorporadas en alimentos u otros productos, puesto que disminuye los procesos degradativos (oxidación, hidrólisis, etc.) (Sandoval et al., 2016) y aumenta la biodisponibilidad de los principios activos (Pino y Aragüez, 2021; Sandoval et al., 2016), además de liberar su contenido de forma controlada al pasar el tiempo o en ambientes específicos de acuerdo con el sitio de interés (Sandoval et al., 2016).

La selección del material de recubrimiento es un factor muy importante, puesto que es necesario que cumpla ciertas propiedades y que obedecen a las características del producto a encapsular, a su aplicación, su almacenamiento y a las condiciones a las que estará expuesto (Carrisales, 2022); generalmente se utilizan polímeros naturales o sintéticos, como carbohidratos (almidones, celulosa, gomas), lípidos (ácidos grasos, ceras, aceites, etc.), proteínas o materiales inorgánicos, que pueden ser mezclados entre sí para mejorar las cualidades de barrera o de mecanismo de liberación (Carrisales, 2022; Sandoval et al., 2004).

Encapsulación por Extrusión

Consiste en el paso del centro activo y de la matriz a través de un inyector a alta presión, es decir, se producen pequeñas gotas del material de recubrimiento con el relleno disperso al forzar su paso por boquillas o aberturas, entre más pequeño sea su diámetro más pequeñas son las cápsulas, las cuales se forman por endurecimiento de la matriz al entrar en contacto con una sustancia deshidratante (Sandoval et al., 2004; Sandoval et al., 2016), cuya elección dependerá del polímero utilizado como encapsulante (Jiménez, 2010); lo anterior está representado en la figura 1.

A nivel de laboratorio pueden ser usadas jeringas, pipetas, boquillas de atomizadores, discos de atomización como herramientas de goteo; a nivel industrial se utilizan sistemas de boquillas múltiples, atomizadores de discos giratorios, técnicas de corte y propulsión a chorro (Sandoval et al., 2016).

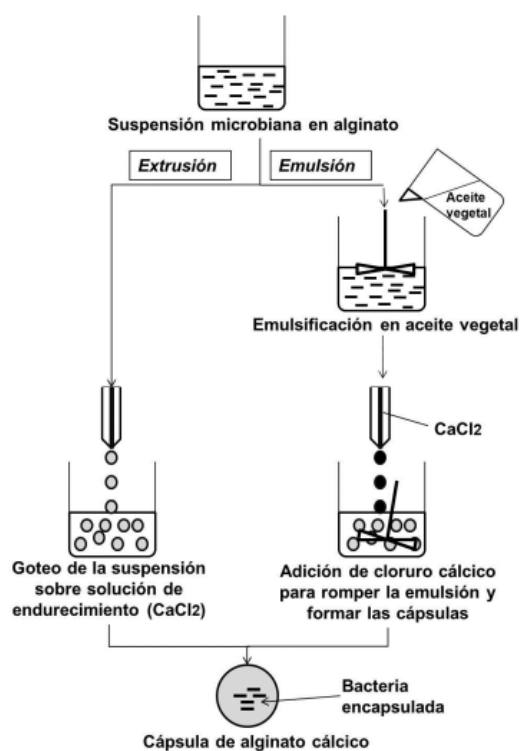
Esta tecnología posee múltiples ventajas para la encapsulación de microorganismos, debido a que es comparativamente suave, no involucra disolventes nocivos y puede ser realizada en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Sandoval et al., 2016). Además, reduce la destrucción celular e incrementa la eficiencia de encapsulación, aunque sus inconvenientes son la lenta formación y el gran tamaño de las microcápsulas (Nezamdoost et al., 2023).

Materiales de Encapsulación

Generalmente para encapsular probióticos se utilizan polisacáridos de orígenes diversos (plantas, proteínas animales, algas, bacterias) debido a que son matrices que resisten a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal superior y además son degradadas fácilmente por la microbiota intestinal (Jiménez, 2010), se ha demostrado que su uso aumenta la probabilidad en

un 85% – 95% de que las células lleguen viables al intestino (De La Cruz y Terán, 2013), lo cual permite una liberación de los microorganismos en el órgano de interés (Jiménez, 2010).

Figura 1 Encapsulación de probióticos mediante las técnicas de emulsión y extrusión por goteo, usando alginato como matriz de encapsulación.



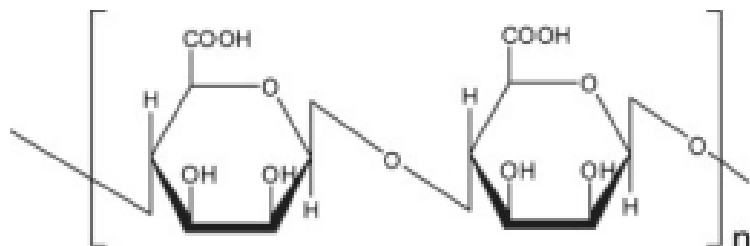
Nota. Tomada de *Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral*, por María Jiménez Pranteda, 2010, de <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/15077/19121507.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Para este proyecto se eligen los siguientes polisacáridos:

Alginato de Sodio. Es uno de los polisacáridos más usados, es proveniente de algas marinas pardas y de algunas especies bacterianas como *Pseudomonas* y *Azotobacter* (Nezamdoost et al., 2023), que está formado por bloques de residuos de los ácidos (**1** → **4**) – **β** –D manurónico y **α**-L- glucurónico distribuidos aleatoriamente como se observa en la figura 2;

por ende, es posible obtener alginatos con diferentes cantidades de los dos ácidos que equivale a tener alginatos con diversos grados de estabilidad mecánica (Jiménez, 2010).

Figura 2 Estructura del alginato



Nota. Tomada de *Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral*, por María Jiménez Pranteda, 2010, de <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/15077/19121507.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

El alginato de sodio se caracteriza por ser de bajo costo, no es tóxico, tienen una gran biocompatibilidad, se gelifica suavemente al añadirle cationes divalentes como iones de calcio (Noor et al., 2022), lo cual hace que tenga capacidad de controlar la liberación de acuerdo con el grupo carboxilo (Mohammadalinejhad et al., 2023).

La formación del revestimiento protector de las cápsulas se da por la reacción de gelificación iónica entre el alginato (polianión) y un ion de carga contraria, en este caso se usó cloruro de calcio (CaCl_2) al 0,1M (catión), al introducir por goteo la solución formada entre microorganismo-alginato en la solución de CaCl_2 con agitación constante, creándose una membrana permeable pero insoluble en agua (Montes, 2013).

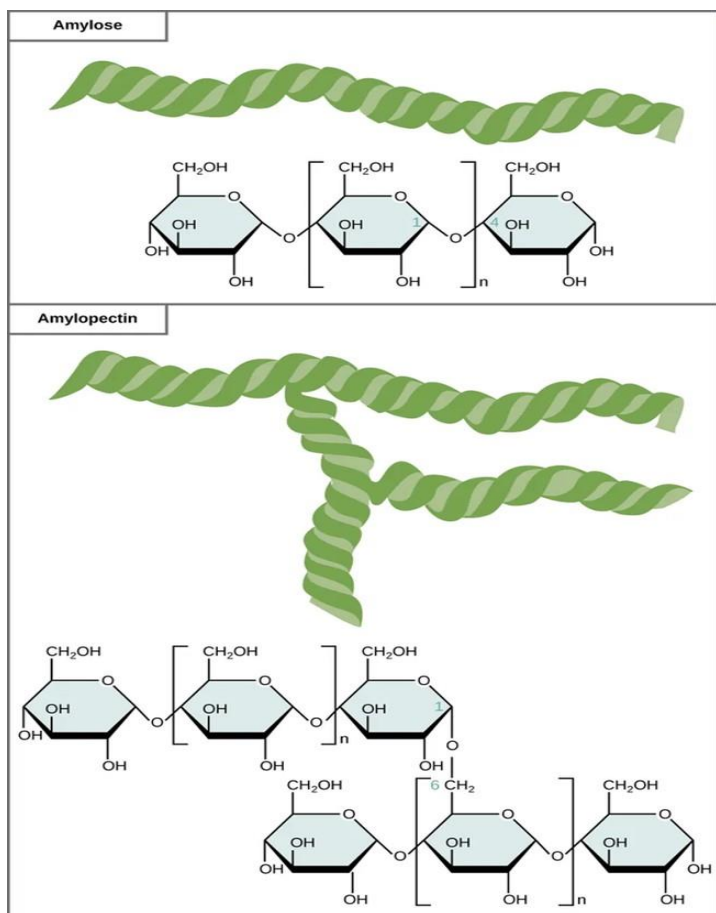
Además, se ha demostrado que colonias de *Lactocaseibacillus rhamnosus* microencapsuladas en alginato continuaron viables a pH 2 durante más de 48 horas, respecto a las células sin encapsular, las cuales fueron inactivadas completamente en las mismas condiciones (Montes, 2013).

Almidón de Maíz. El almidón es básicamente el almacenamiento de azúcares en plantas, es decir, luego de que éstas sintetizan la glucosa, los excesos que quedan luego de los requerimientos energéticos, se almacenan en diversas partes de la planta como almidón. Para su asimilación en el organismo es necesario el uso de enzimas, como las amilasas, que lo convierten en monosacáridos y disacáridos, los cuales son más fáciles de digerir.

El almidón está conformado por una mezcla de amilosa y amilopectina, que son formas poliméricas de la glucosa; las cuales están unidos por enlaces glucosídicos α 1-4 o α 1-6, la amilosa se conforma de cadenas no ramificadas de monómeros de glucosa unidos únicamente por enlaces α 1-4 y la amilopectina se compone de cadenas ramificadas, cuyas moléculas de glucosa están unida por enlaces α 1-4 en su segmento recto y por enlaces α 1-6 en sus ramificaciones (Amador, 2021; Rye et al., 2016), lo cual se puede apreciar en la figura 3. De acuerdo con Agama et al. (2013) la amilosa no se distribuye uniformemente dentro de los anillos concéntricos del granulo de almidón, puesto que su ubicación depende de los sitios disponibles que deja la amilopectina después de sintetizarse; lo anterior es importante debido a que las proporciones de los dos compuestos en el gránulo de almidón afectan la absorción y retención de agua, incidiendo así en la formación de geles (Amorós, 2013).

El almidón de maíz es comúnmente empleado como medio encapsulante por su fácil acceso, costo bajo y de fácil manejo. Además, su interacción con el alginato de sodio en proporciones adecuadas deriva en una mayor protección de la sustancia encapsulada (Alavi et al., 2022).

Figura 3 Estructura de la amilosa y amilopectina



Nota. Tomada de *Biología*, por Rye et al., 2016, <https://openstax.org/books/biology/pages/3-2-carbohidratos>

Metodología

Materiales y Métodos

Materiales

Ácido Clorhídrico (CAS 7647-01-0). Fue suministrado por el laboratorio de fisicoquímica de la sede nacional José Celestino Mutis de la ciudad de Bogotá, era de grado reactivo para laboratorio, y de marca Panreac.

Agar y Caldo MRS. Ambos productos usados fueron suministrados por el laboratorio del CEAD de Palmira, y su marca era Condalab; los dos fueron almacenados a temperatura ambiente y en lugar seco libre de humedad.

Alginato de Sodio (CAS 9005-38-3) y Almidón de Maíz (CAS 9005-25-8). Ambos productos usados fueron suministrados por el laboratorio del CEAD de Palmira, el alginato de sodio era de tipo genérico y no tenía marca alguna, el almidón de maíz era genérico, para uso culinario y su marca era Madre Tierra.

Ambos productos fueron almacenados en su empaque original, a temperatura ambiente y en lugar seco libre de humedad, ya que no requerían refrigeración.

Cepa de *L. rhamnosus*. El microorganismo trabajado era de tipo comercial y para consumo humano, su nombre era Bioflor de la marca Procaps, el cual consistía en sobres de 3 g, con la cepa *L. rhamnosus* CNCM I-4036 con adición de fructooligosacáridos (FOS), de acuerdo con el fabricante cada sobre contiene 100 mg del microorganismo y 500mg de FOS. Los sobres previos a su uso se conservaron a temperatura ambiente ya que no requerían refrigeración.

Cloruro de Calcio (CAS 10043-52-4). Este producto fue suministrado por el laboratorio del CEAD de Palmira, era tipo genérico y de marca Naturquim.

Cloruro de Sodio (CAS 7647-14-5). Fue suministrado por el laboratorio de fisicoquímica de la sede nacional José Celestino Mutis de la ciudad de Bogotá, era de grado reactivo para laboratorio, y de marca Química Mercurio.

Peptona (CAS 91079-40-2). Este producto fue adquirido de forma comercial y su marca fue Peptona Universal M66 de Merck.

Métodos

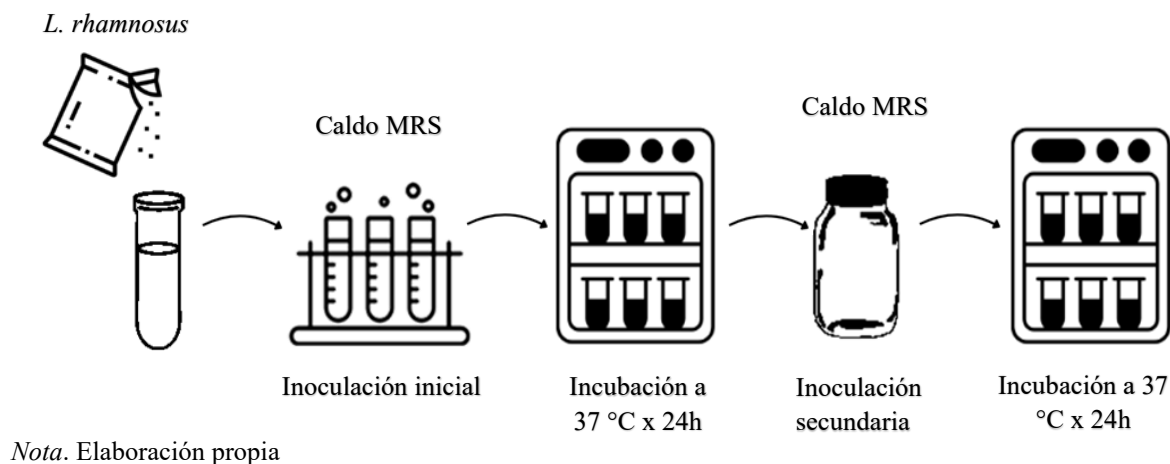
Determinación de la Concentración de Alginato y Almidón de Maíz en la Encapsulación de *Lacticaseibacillus rhamnosus*

Activación de la Cepa. Para la reactivación de la cepa, se usó un sobre de 3g, disolviéndose 1g por tubo de 9 mL con caldo MRS, en total se inocularon tres tubos, los cuales se incubaron a 37 °C por 24h, tiempo en el cual se evidenció crecimiento microbiano debido la fermentación del medio (cambio de color del caldo y enturbiamiento) y precipitación celular, posteriormente se usaron los tubos para inocular tres frascos tapa rosca azul graduados de 250 mL con 90 mL de caldo MRS cada uno, los cuales se incubaron a 37 °C por 24 h; posterior a esto se siguieron inoculando más tubos de ensayo usando tanto caldo MRS como el prototipo de medio de cultivo a base suero de leche (14,24 g/L) , leche de soya (10 g/L) y azúcar (15,76 g/L) desarrollado entre la UNAD del CEAD de Palmira en colaboración con el SENA del Valle del Cauca, para mantener activa la cepa.

Para el proceso de encapsulación el inóculo previamente obtenido fue cosechado a las 24 h, posteriormente sembrado (1mL) a tubos de ensayo con 4 mL de caldo MRS, incubado a 37 °C por 24 h para luego inocular con 5 tubos de ensayo un matraz de 500 mL con 250 mL de caldo MRS, el cual se dejó a 37°C por 24 h para seguidamente usarse en la encapsulación.

La compilación de la activación de la cepa se representó en la figura 4.

Figura 4 Activación de la cepa



Preparación de la Muestra. Se realizó en dos pasos, el primero consistió en la elaboración de soluciones de alginato de sodio (AS) desde el 1% hasta el 2% (Vega, 2017) con almidón de maíz (AL) desde el 10% (Parra, 2010) al 15% (De La Cruz y Terán, 2013), para lo cual en primer lugar se diluyó el alginato en agua destilada estéril en un vaso de precipitado con agitación constante y posteriormente se adicionó a esta solución el almidón de maíz lentamente hasta disolución completa, dejando la mezcla anterior durante 24 h en agitación para una buena homogenización, evitando así la presencia de grumos; se realizaron diferentes mezclas de las dos sustancias a temperatura ambiente; como se presenta en el siguiente diseño experimental.

Diseño Experimental. Para determinar la mejor formulación de los materiales encapsulantes se propuso utilizar un diseño de mezclas de dos componentes ($q=2$), diseño centroide simple, donde los valores de los componentes que se desean analizar son:

$$x_i = 0, \frac{1}{4}, \frac{1}{2}, \frac{3}{4}, 1$$

Es decir,

$$(x_1, x_2) = (0,1); (1,0); (0,50; 0,50); (0,25; 0,75); (0,75; 0,25)$$

Se aclara que para este diseño no se contempló como valor mínimo de concentración 0% de alginato, puesto que para que se dé la encapsulación siempre debe haber alginato, por ende, se tomó como valor mínimo de concentración de este componente el 1%. Además se tomó como nivel de significancia un valor de $\alpha = 0.05$ y un nivel de confianza el 95%.

El diseño experimental de mezcla centroide simple se usa cuando se adicionan puntos en el interior de la región plana, donde se encuentran definidos los componentes, para obtener mezclas que contienen todos los ingredientes, como es el caso de esta propuesta; además con este diseño se explora la relación entre la proporción de diferentes componentes de la mezcla y cómo estas proporciones afectan la variable de interés (Gómez et al., 2013) como se aprecia en la tabla 3.

Tabla 3 Mezclas de las concentraciones de los medios encapsulantes aleatorizadas

Orden Est	Orden Corrida	Tipo Pt	Bloques	X ₁	X ₂	Y
3	1	0	1	1,50	12,50	a
9	2	1	1	1,75	11,25	b
7	3	1	1	1,00	15,00	c
10	4	-1	1	1,25	13,75	d
6	5	1	1	2,00	10,00	e
5	6	-1	1	1,25	13,75	f
4	7	-1	1	1,75	11,25	g
2	8	1	1	1,00	15,00	h
8	9	0	1	1,50	12,50	i
1	10	1	1	2,00	10,00	j

Nota. Elaboración propia

Donde:

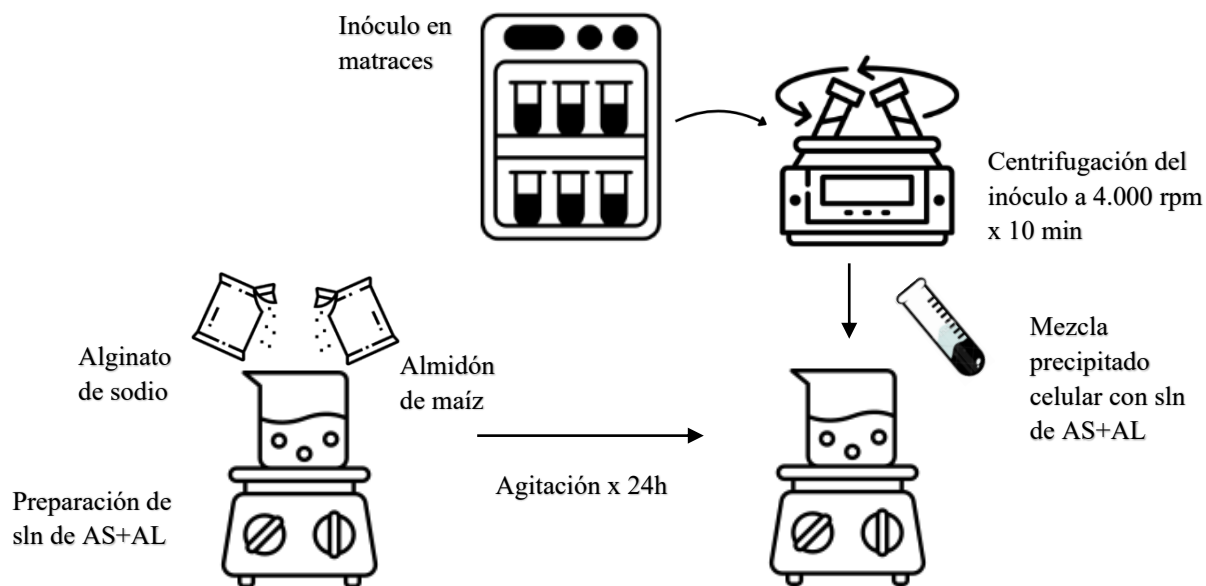
X₁ concentración de alginato de sodio en porcentaje

X₂ concentración de almidón de maíz en porcentaje

Y concentración bacteriana encapsulada en UFC/g

El segundo paso consistió en la preparación de la suspensión microbiana, para esto se tomaron los 250 mL de caldo MRS inoculado con la cepa e incubado durante 24 h, se centrifugaron durante 10 minutos a 4.000 rpm, luego se eliminó el caldo sobrenadante y se dejó sólo el precipitado celular, el cual fue mezclado posteriormente con las soluciones de AS+AL. Este paso junto con el primero se esquematizaron en la figura 5.

Figura 5 Preparación de la muestra

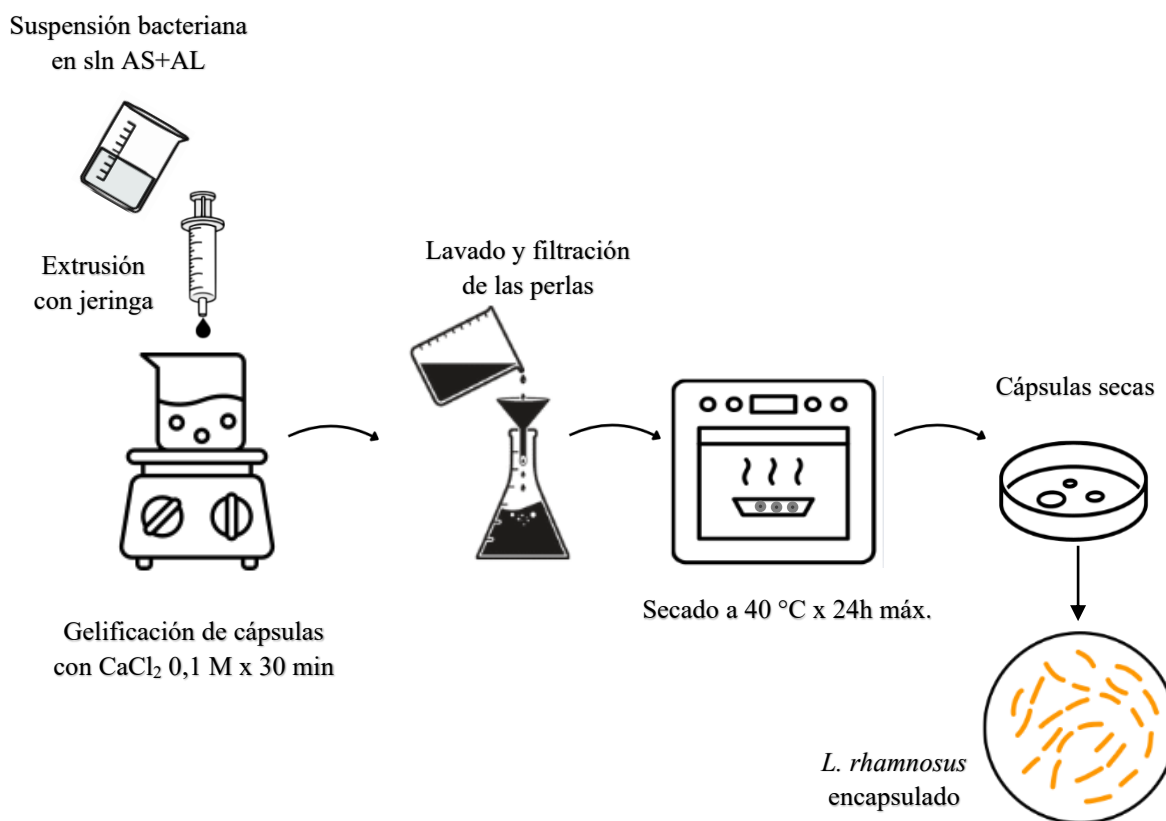


Nota. Elaboración propia

Encapsulación por Extrusión. Se mezclaron 10 mL de suspensión activa (6 mL de precipitado de *L. rhamnosus* en 4mL de agua peptonada estéril) en 90 mL de solución de alginato + almidón (AS+AL) de las diferentes concentraciones preparadas; esta mezcla se pasó a través de jeringas de 5 mL con aguja 21G para la formación de las perlas, usando 200 mL de solución estéril de cloruro de calcio (CaCl_2) al 0.1M (2,219 g de CaCl_2 llevados a un matraz aforado de 200 mL con agua destilada) como solución de endurecimiento (De La Cruz y Terán, 2013). Pasados 30 minutos de gelificación en el CaCl_2 , se filtraron y se lavaron las cápsulas

formadas con agua destilada estéril para eliminar restos de la solución de CaCl_2 y posible células no encapsuladas presentes en el exterior de las mismas, posteriormente se centrifugaron las cápsulas a 4.000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el agua sobrenadante, luego se secaron en estufa de secado de convección natural a $40\text{ }^\circ\text{C}$ por mínimo 12 horas y hasta 24 horas máximo, para luego ser almacenadas en un recipiente libre de humedad y de luz solar directa hasta su uso (De La Cruz y Terán, 2013; Vega, 2017). Lo descrito anteriormente quedó visualizado en la figura 6. Cada prueba de encapsulación se realizó por duplicado.

Figura 6 Encapsulación de la muestra



Nota. Elaboración propia

Para esta prueba primero se realizó de forma duplicada la extrusión de cápsulas sin microorganismo a las concentraciones de 1% AS – 15%AL y 2% AS – 10%AL, para adaptar y

perfeccionar la técnica utilizada, y se dejaron como muestra control, almacenadas en un recipiente color ámbar y a temperatura ambiente.

Cuantificación de las Células Viables. Las cápsulas secas se pesaron en cantidades de 1 g, posteriormente se maceraron en un mortero previamente esterilizado, el polvo obtenido se disolvió en 9 mL agua peptonada estéril y se dejó reposar 30 minutos para que activara el microorganismo. Luego se sembró en profundidad en agar MRS, se llevó a incubación a 37 °C por 48 h y se tomó lectura del número de colonias en placa (Vega, 2017), promediándose el número de colonias contadas por cada dilución realizada.

Posteriormente se estimó la densidad bacteriana expresada en UFC/g tomando en cuenta las dos diluciones que presentaban colonias contables (máximo 250 colonias), que en este caso fueron las diluciones ocho y nueve, y se aplicó la ecuación 1 (ICONTEC, 2009):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1^x \times d} \quad 1)$$

donde,

C suma de colonias contadas en las dos cajas conservadas provenientes de dos diluciones sucesivas;

V volumen del inóculo utilizado en cada caja en mililitros

d primera dilución seleccionada

Este análisis se hizo por duplicado.

Determinación de la Eficiencia de Encapsulación. La eficiencia del proceso se describe como la relación entre las células viables del encapsulamiento y la concentración inicial del inóculo (De La Cruz y Terán, 2013), y se calculó aplicando la ecuación 2:

$$EE(\%) = \frac{(N)}{N_0} \times 100 \quad 2)$$

donde,

N logaritmo del total de bacterias encapsuladas liberadas medidas en UFC/g, determinado mediante reconstitución de las microcápsulas y posterior aplicación del método de diluciones sucesivas.

N_0 logaritmo del total de bacterias presentes en el extracto inicial en UFC

La liberación de *L. rhamnosus*, se llevó a cabo como se explicó anteriormente y se realizó por duplicado.

Caracterización de las cápsulas obtenidas mediante la definición de su morfología a través de análisis microscópico y macroscópico.

Determinación de la Morfología de las Cápsulas. Se realizó un análisis macroscópico y microscópico del tamaño y la forma de las cápsulas obtenidas, mediante el uso de un estereoscopio y microscopio, respectivamente (Vega, 2017). Para esto se colocaron en una caja de Petri entre 3 a 5 unidades de cápsulas y se observaron bajo el estereoscopio modelo StereoBlue S de la marca Euromex para detallar su forma, tamaño y aspecto exterior superficialmente. Este análisis se hizo por triplicado.

Posteriormente se observaron inicialmente bajo el microscopio óptico marca Olympus modelo CH 21 y posteriormente se utilizó un microscopio electrónico modelo BioBlue digital con salida de vídeo de la marca Euromex, para revisar su aspecto exterior con mayor precisión, lo que permitió una mejor visualización de las cápsulas. Este análisis se hizo por triplicado.

Cuantificación la liberación de la cepa *Lacticaseibacillus rhamnosus* a valores de pH de 1 y 2.

Viabilidad de Lacticaseibacillus rhamnosus a Valores de pH de 1 y 2. El estómago de las aves de corral se encuentra dividido en dos partes, el proventrículo, el cual secreta ácido

clorhídrico para iniciar la digestión y la molleja, la cual tritura de forma mecánica el alimento (Rodrigues y Choct, 2018).

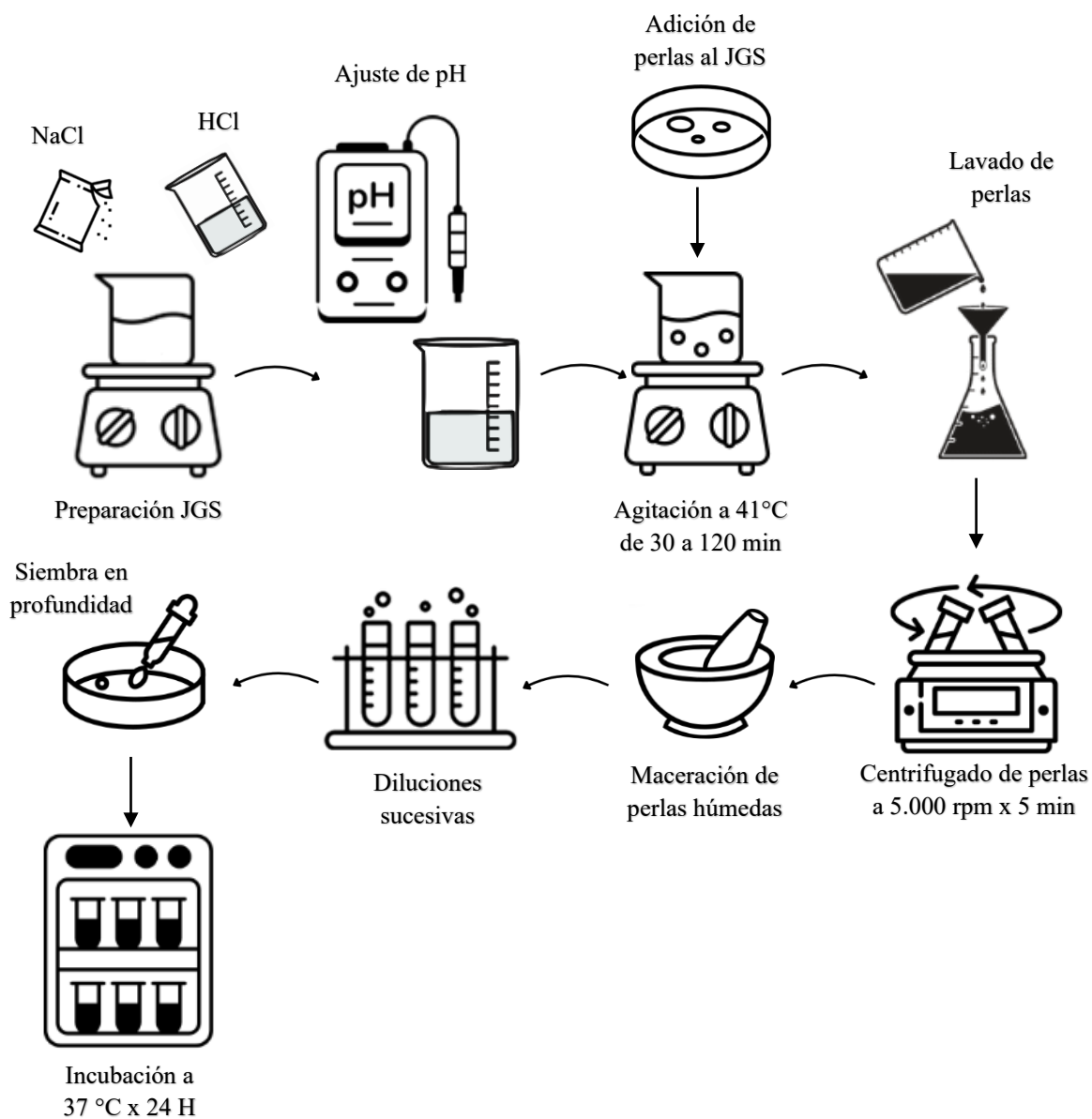
Los valores mínimos de pH estomacal que presentan las aves, en este caso pollos, oscilan entre 1 y 2 (Angel et al., 2013; Rodrigues y Choct, 2018); por lo tanto para evaluar a viabilidad de la cepa a estos pH bajos, se utilizó una solución de NaCl al 0,9% (0,9 g de NaCl llevados a un matraz aforado de 100 mL con agua destilada) ajustando el pH a 1 y 2 respectivamente, mediante la adición de HCl a 1M, como simulación de la condición ácida del estómago, de la cual se tomaron 100 mL y se le añadieron una cantidad establecida de cápsulas (10 g) de la concentración 2% AS – 10% AL, para luego llevarse a agitación e incubación a 41 °C durante 120 minutos (adaptado de Vega, 2017), que es el tiempo promedio máximo que demora el paso del alimento por el estómago del ave, siendo el tiempo promedio estándar entre 40-60 min (Angel et al., 2013); tomándose muestras a los tiempos 30, 60, 90 y 120 minutos, las cuales se sometieron a dos lavados sucesivos con agua destilada estéril y a dos lavados con agua de peptona para la eliminación del jugo gástrico simulado, seguidos de una centrifugación a 5.000 rpm por cinco minutos, para posterior cuantificación de células viables, la cual fue descrita previamente, con la variación de que las cápsulas estaban húmedas. Esta prueba se realizó por duplicado. El procedimiento anteriormente descrito se representó en la figura 7.

Análisis Estadístico

El diseño experimental se analizó usando el programa Minitab, una vez seleccionado el diseño y alimentado, se procedió a realizar el análisis estadístico para evaluar la significancia de los efectos y determinar si las proporciones de los componentes tenían un efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta; adicional a eso se estimaron los coeficientes de regresión para establecer cuál de los coeficientes de interacción era de mayor valor. Como el

objetivo era encontrar la mezcla óptima de los componentes, se generó una curva de optimización para maximizar la respuesta y el gráfico de rastreo de respuesta.

Figura 7 Liberación de *L. rhamnosus* a valores de pH de 1 y 2



Nota. Elaboración propia

Resultados y Análisis

Concentración de Alginato y Almidón de Maíz

La concentración bacteriana inicial del inóculo de todas las corridas del diseño experimental, previa a la encapsulación y después de 24 h de incubación en caldo MRS, se calcularon usando la ecuación 1 y se incluyeron en la tabla 4. Se descartaron las lecturas de la dilución 10^{-9} de las corridas nueve y diez, debido a que presentaron recuentos que duplicaban los de la dilución anterior (10^{-8}), por ende, no se tuvieron en cuenta para calcular el recuento y sólo se tomó en consideración el recuento de la dilución menor.

Tabla 4 Registro de recuento microbiano de concentración inicial

Dilución	Recuento microbiano en UFC/ g									
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5	Corrida 6	Corrida 7	Corrida 8	Corrida 9	Corrida 10
	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio
10^{-5}	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC
10^{-6}	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC
10^{-7}	138	>250	>250	>250	>250	>250	>250	MNPC	>250	>250
10^{-8}	26	17	20	267	121	72	144	75	118	177
10^{-9}	2	2	2	74	5	10	27	12	-	-
Recuento	$2,5 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$3,1 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{10}$	$7,9 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,8 \times 10^{10}$

Nota. Los recuentos de las diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-5} no fueron tenidos en cuenta puesto que estos valores eran Muy Numerosos Para Contar (MNPC) y no se podía estimar con claridad el número de colonias por placa. Para identificar las concentraciones de los órdenes de corrida ver la tabla 3. El recuento se estimó teniendo en cuenta las diluciones que pudieron ser contadas. *Fuente.* Autor

El recuento promedio general de concentración bacteriana inicial fue de $1,1 \times 10^{10}$ UFC/g. Lo anterior implica que la concentración de los sobres utilizados para el aislamiento de la cepa cumplía con el requerimiento terapéutico mínimo recomendado (10^6 UFC/g) y que su activación y conservación fue adecuada.

En las figuras 8a, 8b y 8c se aprecia la diferencia del recuento de colonias conforme a la dilución empleada, observándose los altos recuentos microbianos de la corrida 4 para las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} , de las cuales no se obtuvo un recuento contable.

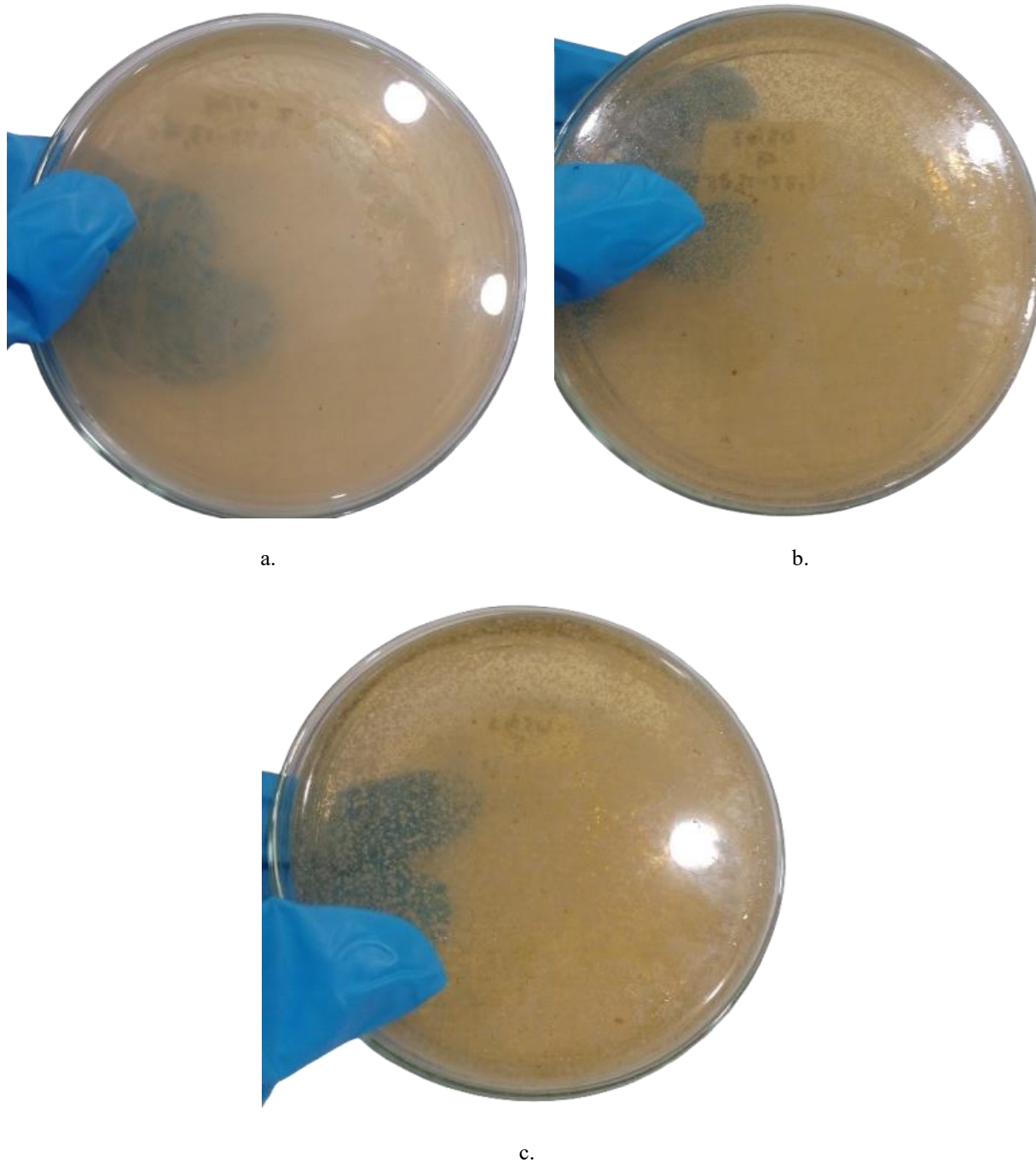
En la tabla 5 se recopilaron los resultados de la concentración bacteriana de las cápsulas disueltas de todas las corridas del diseño experimental, teniéndose que el recuento promedio general de concentración bacteriana de las cápsulas fue de $4,1 \times 10^4$ UFC/g.

Tabla 5 Registro de recuento microbiano de cápsulas disueltas

Dilución	Recuento microbiano en UFC/ g									
	Corrida 1 Promedio	Corrida 2 Promedio	Corrida 3 Promedio	Corrida 4 Promedio	Corrida 5 Promedio	Corrida 6 Promedio	Corrida 7 Promedio	Corrida 8 Promedio	Corrida 9 Promedio	Corrida 10 Promedio
10^{-2}	73	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	86	>250
10^{-3}	4	61	62	35	75	17	30	54	7	77
10^{-4}	-	6	4	3	7	2	3	10	1	4
10^{-5}	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Recuento	$6,9 \times 10^3$	$6,0 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$6,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$	$7,3 \times 10^3$	$7,4 \times 10^4$

Nota. Los recuentos de 10^{-1} no fueron tenidos en cuenta puesto que estos valores fueron mayores a 250 colonias y no se podía estimar con claridad el número de colonias por placa. *Fuente.* Autor

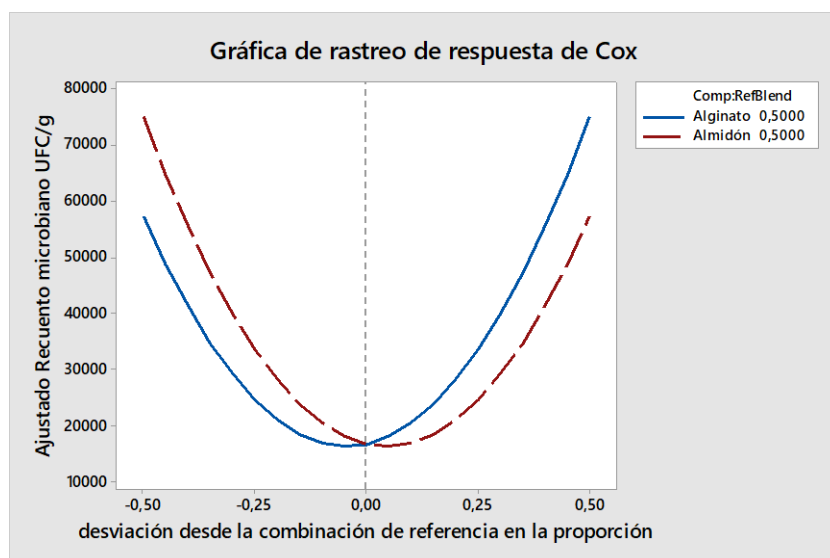
Figura 8 Recuento en placa Muy Numeroso para Contar (MNPC)



Nota. Todas las fotos pertenecen a la corrida 4 (1,25% AS – 13,75% AL). La figura 8a corresponde a la placa de la dilución 10^{-2} ; la figura 8b concierne a la placa de la dilución 10^{-4} y la figura 8c es de la placa de la dilución de 10^{-6} , por lo tanto sus recuentos no fueron tenidos en cuenta puesto que estos valores eran Muy Numerosos Para Contar (MNPC). *Fuente.* Autor

De acuerdo con el análisis estadístico arrojado por el programa MINITAB, el modelo de regresión fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$), siendo el valor de p de 0,003; el coeficiente de regresión (R^2) obtenido fue de 80,59% y el alginato presentó el mayor coeficiente dentro del modelo, lo cual implicó que a mayor concentración de alginato, mayor recuento microbiano en las cápsulas, lo cual es confirmado en la obtención de las gráficas de rastreo de respuesta y de optimización de mezcla, tomándose para esta última como valor máximo $7,0 \times 10^4$ UFC/g; que corresponden a las figuras 9 y 10, que se presentan a continuación:

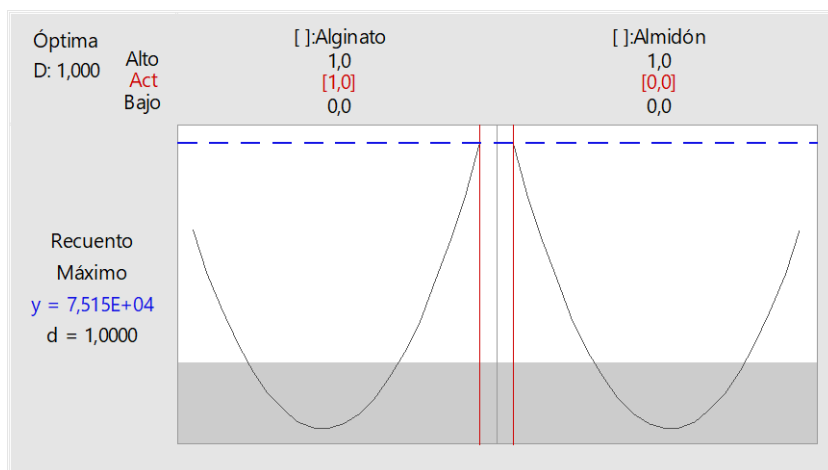
Figura 9 Rastreo de respuesta



Nota. Elaboración propia

La figura muestra cómo los componentes afectaron la respuesta, en este caso, el recuento microbiano en las cápsulas. Se observó que el alginato tuvo un efecto más significativo que el almidón, debido a que su concentración más alta condujo a un aumento en la respuesta, lo que indicó un efecto positivo del alginato sobre el recuento microbiano.

Figura 10 Optimización de respuesta



Nota. Elaboración propia

De acuerdo con los resultados obtenidos, se encontró que la mejor concentración de componentes para realizar la encapsulación es la solución con 2% de alginato y 10% de almidón. Este resultado concuerda con lo expresado por Amorós (2013), quien presentó que la eficiencia de la encapsulación por extrusión de *L. acidophilus* usando mezclas de alginato al 1% con almidón en diferentes proporciones (1,25%, 1,75%, 2%, 2,25% y 4,5%) osciló entre 51,21 % y 69,39%, siendo la de mayor eficiencia la mezcla polimérica de alginato al 1% y almidón al 1,25% y la de menor eficiencia la que tenía almidón al 4,5%, exponiendo que la eficacia disminuía conforme incrementaba la proporción de almidón, lo cual se atribuyó a que debido al aumento de la cantidad almidón podía reducirse el espacio físico interior de las perlas. Esto también coincide con Afzaal et al (2022), quienes indicaron que la eficiencia de la encapsulación fue mayor con el alginato de sodio al 1,71% que con aislado de proteína de suero al 6%, obteniendo porcentajes del 99% y 95% respectivamente.

Tasa de Supervivencia

Una vez conocida la concentración inicial de los inóculos utilizados para la encapsulación y la concentración celular de las perlas secas se procedió a calcular la eficiencia de la encapsulación de cada ensayo aplicando la ecuación 2, la cual se aprecia en la tabla 6. A partir de estos datos se elaboró la figura 11, que muestra los promedios de eficiencia de encapsulación correspondientes a los pares de corridas con igual concentración de alginato y almidón, con sus respectivas barras de error que representan la variabilidad entre réplicas.

Tabla 6 Eficiencia de encapsulación de las corridas experimentales

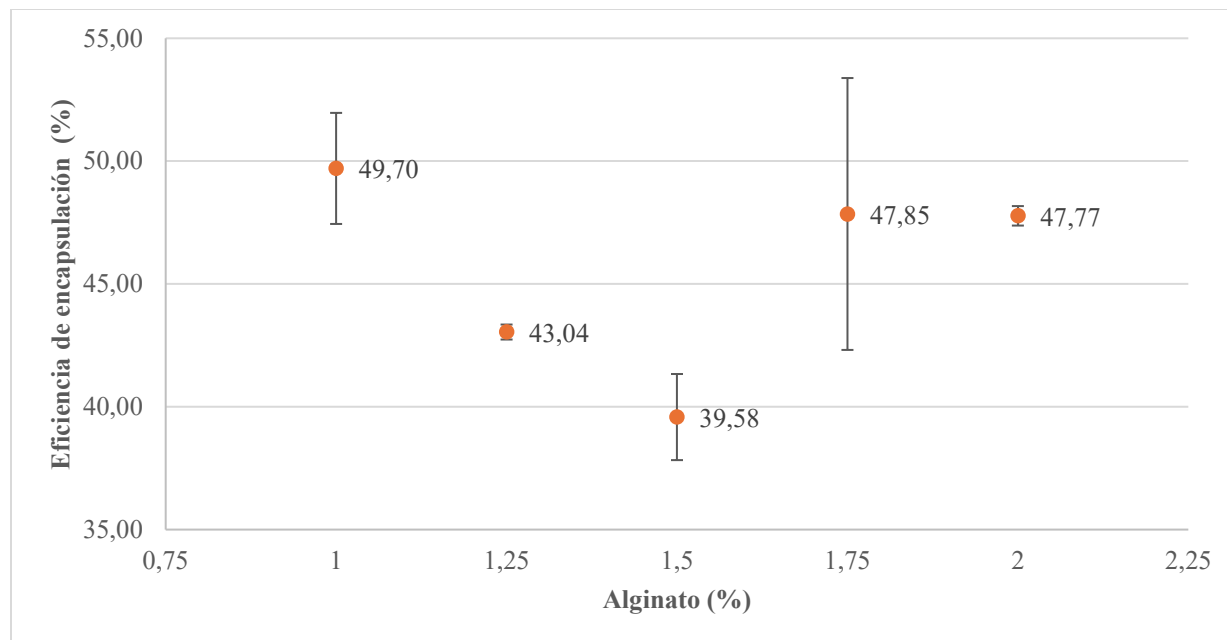
Orden Corrida	Concentración de alginato %	Concentración de almidón %	Recuento microbiano inicial UFC/ g	Recuento microbiano cápsulas secas UFC/ g	Eficiencia de encapsulación %
1	1,50	12,50	$2,5 \times 10^9$	$6,9 \times 10^3$	40,82
2	1,75	11,25	$1,7 \times 10^9$	$6,0 \times 10^4$	51,76
3	1,00	15,00	$2,0 \times 10^9$	$5,9 \times 10^4$	51,30
4	1,25	13,75	$3,1 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^4$	43,26
5	2,00	10,00	$1,1 \times 10^{10}$	$6,8 \times 10^4$	48,05
6	1,25	13,75	$7,4 \times 10^9$	$1,7 \times 10^4$	42,83
7	1,75	11,25	$1,6 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^4$	43,93
8	1,00	15,00	$7,9 \times 10^9$	$5,8 \times 10^4$	48,10
9	1,50	12,50	$1,2 \times 10^9$	$7,3 \times 10^3$	38,34
10	2,00	10,00	$1,8 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^4$	47,49

Nota. Elaboración propia

Conforme a lo evidenciado en la tabla 6, ninguna de las corridas realizadas satisfizo el requerimiento mínimo de concentración bacteriana de 10^6 UFC/g que deberían tener las cápsulas, debido a que el promedio general fue de $4,1 \times 10^4$ UFC/g que corresponde al 45,59%. En particular para la formulación con 2% de alginato y 10% de almidón, el promedio de encapsulación fue del 47,77%. Asimismo, no se logró obtener el porcentaje de eficiencia de encapsulación mínimo de 70% considerado como el valor de referencia, basado en diversos

estudios que realizaron ensayos con métodos de encapsulación físicos, matrices y microorganismos similares, como es el caso de Martin et al. (2013) quienes obtuvieron una eficiencia del 97% en la encapsulación por emulsificación de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 usando alginato más almidón.

Figura 11 Eficiencia de encapsulación vs concentración de alginato



Nota. Elaboración propia

De La Cruz y Terán (2013) reportaron una eficiencia de encapsulación por extrusión con alginato de 82% de *Lactobacillus casei*; mientras que (Silva et al., 2018) obtuvieron en la encapsulación de *Lactobacillus acidophilus* usando alginato, mezcla de alginato y goma laca como material de pared y aceite de girasol como núcleo, tasas de supervivencia de 83 % por extrusión y de 95% por coextrusión en promedio respectivamente. Mientras que en otro tipo de productos encapsulados se presentaron resultados no tan favorables como es el caso de Lupo et al., (2012), quienes mencionan que en la preparación de cápsulas bajo la técnica por extrusión

del producto enzimático comercial Flavourzyme® de Novozymes® usando matrices de alginato, alginato-almidón y alginato-pectina sobre una solución de calcio con y sin adición quitosano, los resultados mostraron una baja eficacia de encapsulación para todas las matrices ensayadas.

Los resultados más análogos que pudiesen compararse son los arrojados por Yin et al., (2024), quienes indicaron obtener tasas de supervivencia de 43,23% y 53,16% para emulsión simple de aceite-agua y emulsiones dobles respectivamente en la encapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* GG con adición de prebióticos, en donde la mayor tasa de supervivencia obtenida fue con inulina añadida del 65,16%.

Una de las causas del bajo porcentaje de eficiencia de encapsulación, pudo deberse a una baja liberación de células de las cápsulas debido al método de liberación aplicado, que en este caso fue físico, maceración en mortero, y no químico como es habitual al usar soluciones que disuelvan el alginato como la solución tampón fosfato salino (PBS); este método aunque rompe las perlas formadas, no garantiza la total liberación celular ni la ausencia de daño al microorganismo; debido a que durante la fricción puede afectarse la viabilidad celular, porque la presión física puede dañar la membrana celular.

Los microorganismos probióticos pueden sufrir varios tipos de estrés, como el térmico, osmótico, oxidativo y otros, los cuales inducen lesiones en múltiples sitios celulares, como la membrana citoplasmática, los ribosomas y los cromosomas, lo que ocasiona la desactivación de las células (Liu et al., 2018), para este caso se descarta que la disminuida eficiencia de encapsulación fuera debido a estrés térmico durante los ensayos, debido a la baja temperatura de secado (Soukoulis et al., 2014), la cual no superó los 60 °C. Sin embargo, es importante considerar que la cepa utilizada podría haber sufrido de estrés térmico previamente durante su producción industrial; asimismo el estrés osmótico también podría haber influido en los

resultados obtenidos, dado que la cepa utilizada pudiese ser sensible a esta condición o haber sufrido la misma durante su obtención industrial; además de que la concentración de almidón (igual o superior al 10%) pudiese ayudar a generar una deshidratación en las células, teniendo en cuenta que la concentración más adecuada de este componente fue la de menor valor, lo cual es consistente con lo expresado anteriormente por Amorós (2013).

Características de las Cápsulas

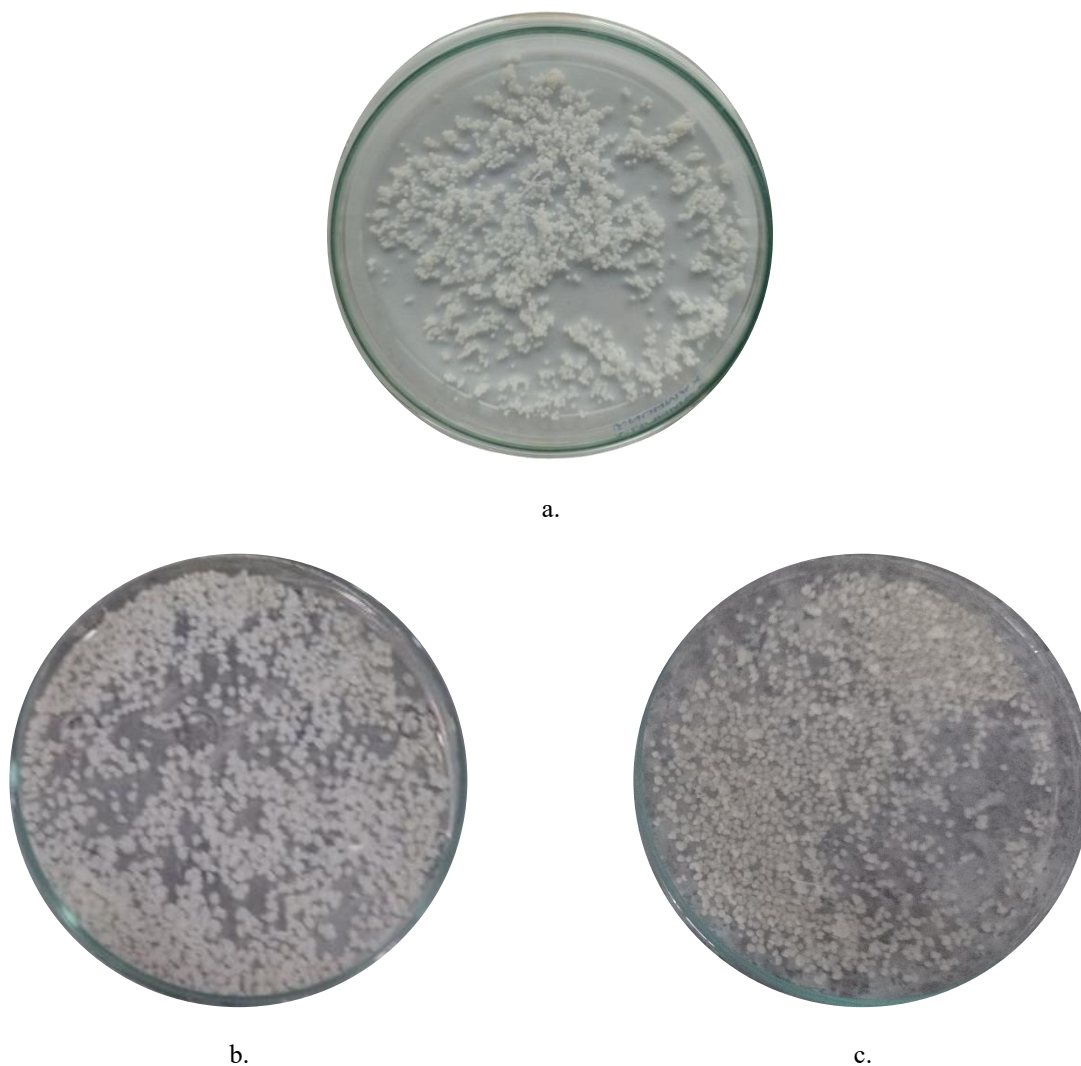
Respecto a la morfología de las cápsulas obtenidas se encontró que aunque su forma inicial, era más de tipo esférica, una vez se secaban tendían a ser más ovaladas y en algunos casos un poco más alargadas, e incluso se formaron algunos gránulos compuestos de varias esferas, debiéndose esto a la agrupación de las mismas y posible falta de movimiento durante el secado, es decir, que durante el proceso de secado, aquellas cápsulas que se pudieron supervisar dentro de las primeras 12 horas y se estuvieron moviendo con regularidad para evitar la adhesión entre ellas presentaron una forma final más esférica que ovalada.

Además aunque el color de las cápsulas en el momento de la encapsulación siempre fue blanquecino, durante el secado este varió desde el blanco pálido pasando al blanco opaco y/o a blanco hueso y ligeramente crema claro e incluso hubo algunas microcápsulas que adquirieron tonalidades amarillas/marrones, la diferencia en tonalidades es apreciable en las figuras 12a, 12b y 12c; notándose que aparentemente a mayor concentración de almidón más oscuro el color; lo cual se pudiera justificar con un posible proceso de descomposición de azúcares reductores presentes en el almidón y/o en el alginato, el cual puede pronunciarse más en presencia de humedad.

También pudo deberse a la variación del contenido celular presente en las cápsulas; a la presencia de trazas del medio de cultivo MRS, el cual, a pesar de ser eliminado en su gran

mayoría, en el momento de la adición del precipitado celular a la solución de encapsulación es posible que se hayan ido junto con la muestra algunos microlitros del caldo, haciendo que las esferas quedaran ligeramente más oscuras unas a otras.

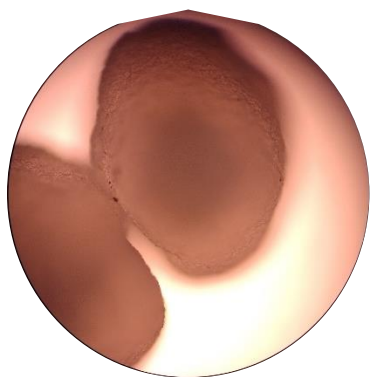
Figura 12 *Variación de color de las microcápsulas*



Nota. La figura 12a corresponde al orden de corrida 1 (1,5%AS – 12.5%AL); la figura 12b corresponde a la corrida 2 (1,75%AS – 11.25AL) y la figura 12c corresponde a la corrida 5 (2%AS – 10%AL). Entre unas y otras se aprecia una ligera variación en la tonalidad blanca y aunque la mayoría de las cápsulas tenían forma esférica bien definida previo al secado, después de esta se perdió la definición y tienden más a ser ovaladas. *Fuente.* Autor

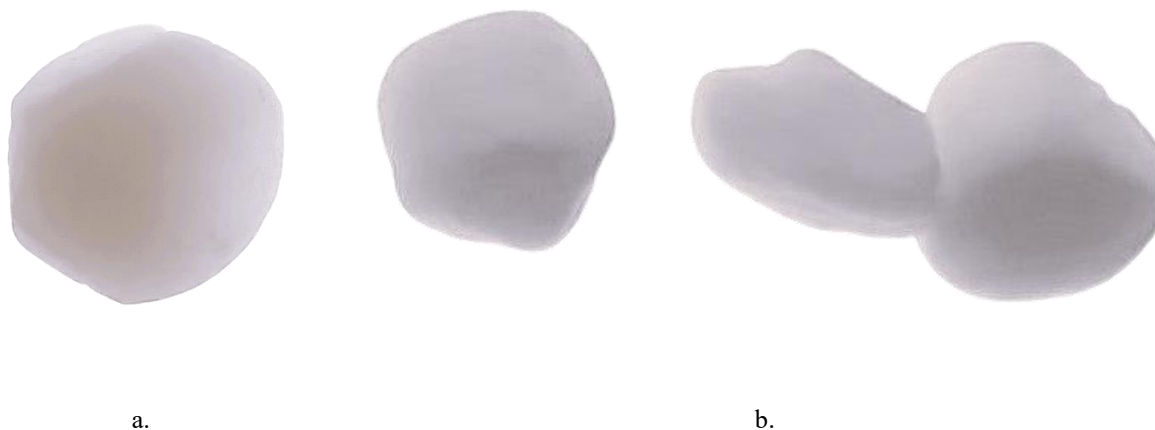
Con relación al aspecto las microcápsulas, mientras están húmedas presentan una forma predominantemente esférica y de bordes redondeados, pero una vez secas presentaron una apariencia seca y rugosa, siendo más notorio en algunas que en otras, lo cual puede observarse en las figuras 13, 14a y 14b que muestran la forma de las cápsulas vistas desde el microscopio óptico Olympus, el microscopio electrónico BioBlue Digital y el estereoscopio StereoBlue S.

Figura 13 *Morfología de cápsula vista en un microscopio óptico*



Nota. La figura corresponde a una cápsula de orden de corrida 10 (2% AS-10% AL), se aprecia forma ovalada, de bordes definidos y aspecto ligeramente rugoso. *Fuente.* Autor

Figura 14 *Morfología de cápsulas vistas en un microscopio y estereoscopio electrónicos*



Nota. Las figuras corresponden a cápsulas de orden de corrida 10 (2% AS-10% AL), la figura 14a fue obtenida con el microscopio electrónico, observándose una cápsula de forma esférica, de bordes definidos y lisos; mientras que

las cápsulas de la figura 14b fueron exploradas con el estereoscopio electrónico, apreciándose formas irregulares diferentes tanto esféricas como ovaladas y de borde liso. *Fuente.* Autor

Respecto al tamaño, las cápsulas húmedas midieron entre 2 a 4,5 mm, luego del secado y medidas con el estereoscopio oscilaron entre 1,0 y 2,0mm en promedio, lo cual de acuerdo con Amorós (2013) y Vega (2017) es un buen tamaño para la técnica empleada, en este caso la extrusión, puesto que según los autores generalmente el tamaño ronda entre los 2 y 5 mm, y se ve afectado por el diámetro del orificio de goteo, en este caso de la aguja utilizada; la velocidad de goteo, la altura de caída, la concentración, temperatura y velocidad de flujo de la solución endurecedora .

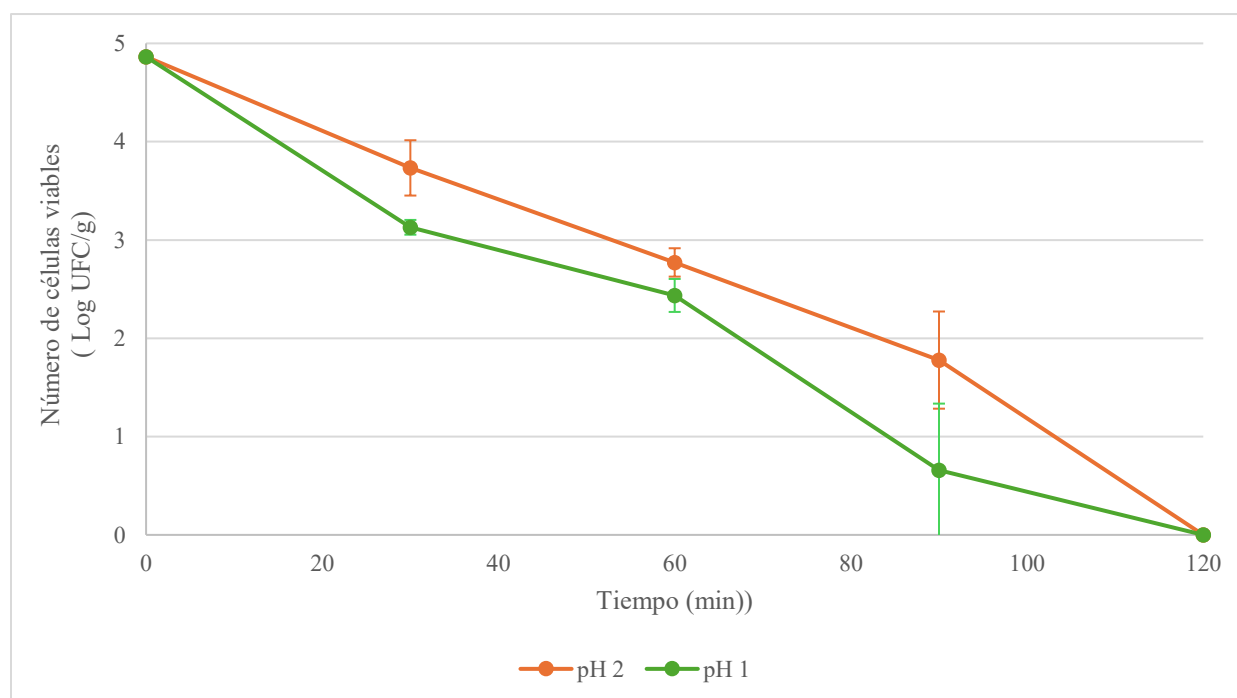
Liberación de *Lacticaseibacillus rhamnosus* de las Cápsulas Expuestas a pH 1 y 2

El recuento celular original de bacterias probióticas encapsuladas fue en promedio de 4,86 log UFC/g como se muestra en la figura 15, donde se presentaron los resultados obtenidos de las pruebas de viabilidad realizadas a las cápsulas formadas con 2% AS y 10% de AL, sometidas a condiciones de jugo gástrico simulado (JGS) *in vitro* a diferentes tiempos de permanencia.

En ésta se evidenció que dentro de los primeros 30 minutos del ensayo la viabilidad de las células encapsuladas expuestas a los valores de pH indicados tuvo una reducción de 1,73 log UFC/g y 1,14 log UFC/g, lo cual corresponde a una pérdida de más del 99% de células viables en ambos casos; transcurrido el tiempo máximo de exposición no se evidenció crecimiento microbiano en las placas sembradas con MRS, lo que indica que ninguna bacteria sobrevivió al ensayo, a pesar de que *L. rhamnosus* es conocido por su fuerte resistencia a condiciones ácidas, lo cual implicaría que la formulación utilizada como material de pared no proporcionó la suficiente protección a las células encapsuladas. Este resultado de reducción de más del 90% de

viabilidad del lactobacilo, concuerda con lo reportado por Amorós (2013), quien describió que en un ensayo de prueba sometiendo a *L. acidophilus* encapsulado en una matriz de alginato al 1% y almidón al 1,25% a jugo gástrico simulado a pH 2 durante 45 y 90 minutos se obtuvo una reducción de 1 log y 3 log UFC/g respectivamente, partiendo de una concentración inicial superior de 1×10^9 UFC/g, es decir, que la células retenidas que conservaron su viabilidad fue aproximadamente del 20% a los 45 minutos y prácticamente nula a los 90 minutos.

Figura 15 Supervivencia de *L. rhamnosus* encapsulado expuesto a pH 1 y 2



Nota. Los puntos representan el promedio de dos réplicas, y las barras de error indican la desviación estándar calculada sobre los valores transformados (\log_{10}). Debido al número limitado de réplicas, estos datos deben interpretarse con precaución y no se consideran estadísticamente significativos. *Fuente.* Autor

.A partir de los resultados obtenidos el investigador procedió a incrementar la proporción de almidón a 1,75%, 2%, 2,25% y 4,5% manteniendo constante la concentración de alginato (1%), encontrando que transcurridos los 90 minutos de exposición a JGS para todos los ensayos, la cantidad de bacilos viables descendió por debajo de 10^7 UFC/g, excepto el que contenía 1,75%

de almidón, el cual se conservó por encima de ese umbral. Asimismo se evidenció un incremento en la viabilidad celular al incrementar la proporción de almidón por encima del 1,25%, aunque superando el 2% el comportamiento fue variable y no mantuvo la misma correlación.

Resultados análogos pero más favorecedores presentaron (Silva et al., 2018), quienes evaluaron la viabilidad de *L. acidophilus* encapsulado por extrusión en matrices de alginato y alginato-goma laca, en fluido gástrico simulado a pH 1,8 durante 120 min de exposición seguido de fluido intestinal simulado a pH 6,5 durante 180 min, obteniendo una reducción próxima de 2 log UFC/g para ambos casos, partiendo de una concentración celular inicial cercana a los 8 log UFC/g. Sin embargo al adicionar a aceite de girasol a ambas matrices, y sometiendo a las mismas condiciones de simulación, se obtuvo una reducción de aproximadamente 1,4 y 0,9 log UFC/g, respectivamente, lo cual indicó que la matriz lipídica minimizó la exposición de los probióticos a las condiciones gastrointestinales, mejorando su supervivencia.

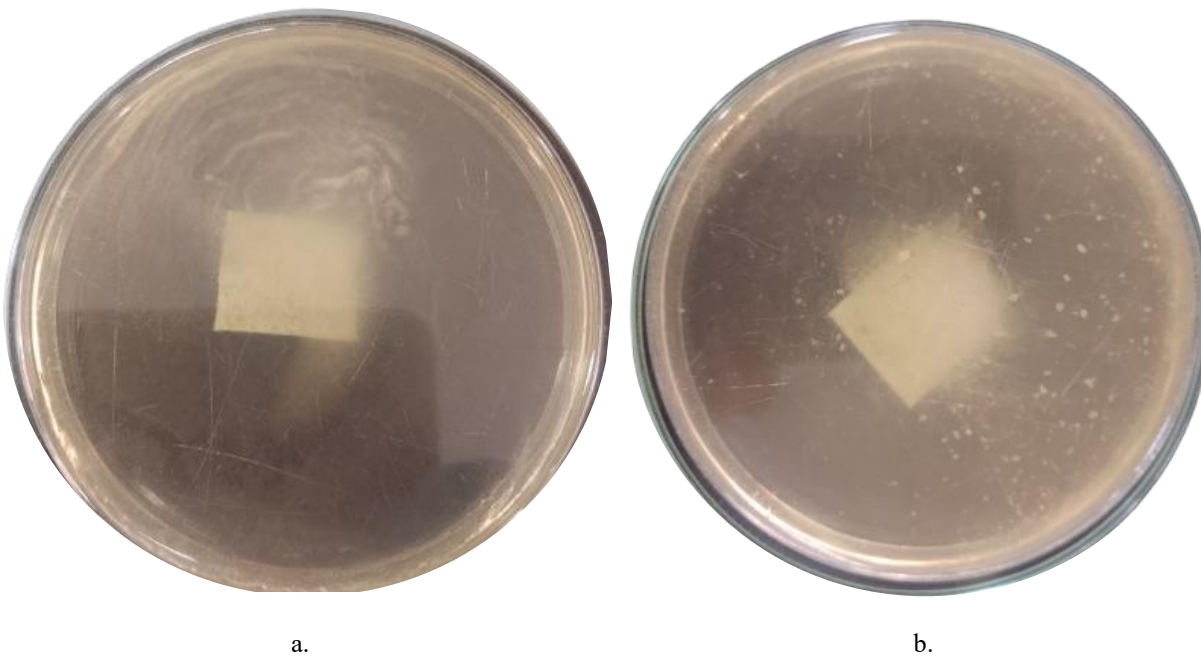
Lo anterior confirmó que el JGS redujo significativamente la viabilidad de los microorganismos evaluados. Sin embargo, es importante considerar que la magnitud de esta reducción debe analizarse en función de la concentración celular inicial presente en las cápsulas, puesto que una disminución cercana al 99% no necesariamente impide el cumplimiento del objetivo de la encapsulación, siempre que la concentración final supere las 10^6 UFC/g, considerada como el umbral mínimo para ejercer un efecto probiótico; en este caso como la concentración bacteriana inicial era inferior a 10^5 UFC/g, no fue posible alcanzar una cantidad viable suficiente tras la exposición al JGS.

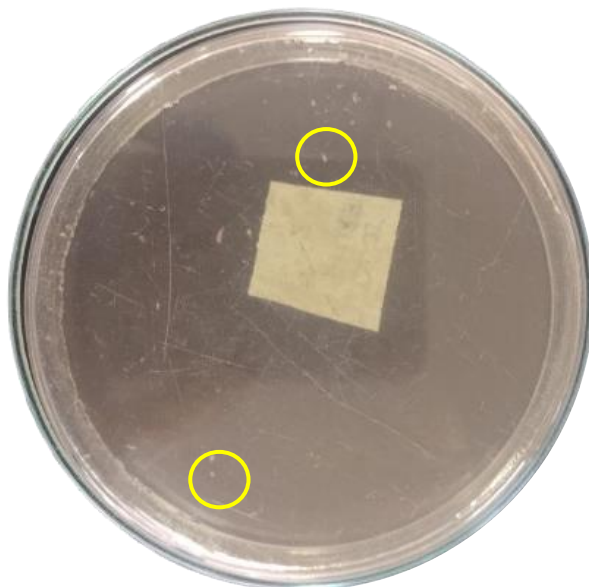
Los resultados negativos obtenidos en este ensayo cobran relevancia teniendo en cuenta que el tiempo de permanencia de los alimentos en el estómago de las aves de corral, es variable y está relacionado con diferentes factores como la edad, el peso, el estado de salud del animal, el

tipo de alimento, entre otros (Angel et al., 2013; Rodrigues y Choct, 2018), lo cual implica que sí las cápsulas no son viables después de 2 h que es el tiempo promedio máximo que demora en llegar el alimento al intestino, entonces no se cumple el objetivo de la encapsulación, que es proteger a los microorganismos viables hasta su liberación en el sitio de acción.

Respecto a la morfología de las colonias, el tamaño y la forma de las éstas después de haberse sometido al JGS, difirió de las colonias obtenidas en condiciones normales, siendo mayoritariamente pequeñas e irregulares en su forma y sus bordes, además de que su crecimiento no fue homogéneo sino más bien disperso y en algunos casos aglomerado en algún sector de la placa de Petri, como se aprecia en la figura 16, es decir, la cepa sufrió estrés ácido afectando su morfología y posiblemente otras características, lo cual concuerda con lo descrito por Stage et al. (2020), quienes exponen que LGG al estar sujeto a estrés puede conducir a mayores tasas de mutación y recombinación.

Figura 16 *Morfología de las colonias después de ser sometidas a condiciones ácidas*





c.

Nota. Nota. Todas las fotos pertenecen a las muestras de pH 2 y a la dilución 10^{-1} . La figura 16a corresponde a la muestra de los 30 min; la figura 16b a la de los 60 min y la figura 16c a la de los 90 min. *Fuente.* Autor

Además, Biswas et al. (2019) informan que estudiaron una cepa mutante de *L. rhamnosus* LRB sensible al estrés ácido, la cual tenía alterado aproximadamente el 15% de su proteoma, y además presentaba sensibilidad a otros tipos de estrés como el osmótico, térmico y a sales biliares. Asimismo, la exposición de LGG a un pH de 4,5 durante 1 o 24 h genera una respuesta transcriptómica rigurosa, donde los genes relacionados con la respuesta al estrés y la glucólisis se sobreexpresaron suprimiendo los genes involucrados en la gluconeogénesis, el metabolismo de aminoácidos y el metabolismo de nucleótidos (Bang et al., 2018).

En el JGS a pH 2, las cápsulas presentaron un rápido crecimiento en volumen por hinchazón durante los primeros 30 minutos, estabilizándose a los 60 min; mientras que en el JGS de pH1 si bien es cierto las cápsulas también se hincharon se evidenció que su tamaño y volumen era menor al del pH 2; al final del ensayo mientras que las cápsulas sometidas a pH 2 no

disminuyeron de 1mm, las de pH 1 alcanzaron a bajar hasta los 0,6 mm, es decir, tuvieron una mayor corrosión y desintegración.

La baja supervivencia microbiana a las condiciones ácidas pudo deberse a un inadecuado o insuficiente lavado de las cápsulas para el retiro de la solución ácida durante los tiempos de muestreo, haciendo que en el momento de la maceración las células liberadas entraran en contacto con sustancias agresivas, en este caso residuos de HCl, que incidieron en su crecimiento.

También pudo deberse a la falta o inadecuado relleno de la porosidad del alginato, la cual permite la permeación de oxígeno y humedad (Jumazhanova et al., 2023), esta propiedad mejora cuando el alginato se suplementa con algún otro componente, en este caso el almidón, que debió haber cumplido esta función pero se evidenció que no fue así; posiblemente porque el utilizado no tenía modificaciones químicas; su escasa ayuda como barrera efectiva pudo deberse a su sensibilidad a condiciones de pH bajo, lo cual hace que se hinche o se disuelva parcialmente, permitiendo la difusión del ácido al núcleo de la cápsula; así como a las condiciones de cizallamiento extremo (maceración de las perlas) (Ağagündüz et al., 2023). Lo anterior es consistente con lo descrito por Hoh et al. (2021), quienes explicaron que con la adición de almidón resistente gelatinizado al 2% y goma xantana al 0,3 % a una solución de alginato de sodio al 1,5% se mejoró la eficiencia de encapsulación de *L. rhamnosus* GG (LGG) pasando de 21,31% (cuando era sólo alginato) a 84,67%, y que este porcentaje se elevó a partir del uso del almidón como aditivo de relleno.

El uso de almidón modificado como componente en sistemas de liberación probiótica representa propiedades funcionales superiores frente a otros tipos de almidón así como una

mayor estabilidad en condiciones gastrointestinales y actúa como un agente prebiótico más eficiente (Ağagündüz et al., 2023), por lo cual debió haber sido la elección más adecuada.

Además, a pH 2 el alginato presenta una hidrólisis ácida que convierte los grupos $-\text{COO}-$ en $-\text{COOH}-$, debilitando la red de gel puesto que la atracción electrostática entre los grupos Ca^{2+} y $-\text{COO}-$ en la unión de caja de huevo desaparece, haciendo que las perlas se desintegren (Jumazhanova et al., 2023), y es lo que hace que se dé una liberación prolongada en el intestino; por eso es importante que el componente con cual se mezcle el alginato ayude a la formación de una barrera eficaz, para que esta desintegración sea controlada.

Conclusiones

La concentración bacteriana inicial procedente de los sobres de Bioflor fue adecuada y cumplió holgadamente con los requerimientos terapéuticos mínimos (10^6 UFC/g), cumpliendo con una correcta activación y conservación del probiótico en esta forma. Sin embargo, el contraste con la concentración bacteriana promedio final en las cápsulas evidenció una pérdida significativa de viabilidad microbiana durante el proceso de encapsulación. Este descenso estuvo probablemente relacionado con múltiples factores, entre ellos, la metodología empleada para liberar las células encapsuladas (maceración física), la naturaleza de los materiales de pared, y el estrés al que las células pudieron haber sido sometidas en distintas fases del proceso.

Entre las distintas proporciones de alginato y almidón evaluadas, la mezcla que mostró mayor eficiencia fue la compuesta por 2 % alginato y 10% almidón, alcanzando una eficiencia de encapsulación de 47,77%. A pesar de ser el mejor resultado obtenido, este valor es considerado bajo en comparación con estudios similares reportados en la literatura, donde alcanzaron eficiencias superiores al 70%, por lo que la matriz empleada no cumplió adecuadamente con los requerimientos de encapsulación esperados. La falta de una formulación más sólida limita la aplicabilidad del sistema en contextos industriales o terapéuticos.

La concentración de alginato mostró una relación positiva con el recuento de colonias, indicando que su papel como agente encapsulante fue determinante en la retención de viabilidad bacteriana; sin embargo, su efectividad fue limitada por factores como la aparente porosidad de la matriz, su sensibilidad al pH ácido y la ausencia de un coencapsulante más eficaz, como almidones modificados u otros polímeros que permitieran mejorar la estabilidad estructural.

Para las diferentes corridas experimentales, las perlas formadas presentaron formas predominantemente esféricas y ovaladas, con bordes lisos y definidos principalmente, siendo el color crema el característico. La falta de movimiento, refiriéndose a la separación de unidades, durante el secado provocó que muchas cápsulas quedaran adheridas entre sí, formándose gránulos de múltiples perlas, lo que afectó negativamente la uniformidad del producto.

Durante el tratamiento gástrico simulado, las perlas presentan un rápido hinchamiento entre los 30 y 60 minutos, estabilizándose al finalizar este último tiempo. Las cápsulas sometidas a pH 1 presentaron mayor corrosión y pérdida de tamaño en comparación con las que fueron sometidas a pH 2. A los 30 minutos de exposición a condiciones ácidas las perlas habían perdido el 99 % de su viabilidad celular. El tratamiento gástrico afectó significativamente la resistencia de la matriz encapsulante, suprimiendo su efecto protector. No se detectaron células viables pasados los 120 minutos de exposición de simulación gástrica que es el tiempo promedio máximo del paso del alimento por el estómago de las aves de corral, evidenciándose la ineficacia de la formulación para proteger los microorganismos encapsulados frente a condiciones gástricas extremas. Esta falla compromete directamente la viabilidad del producto como vehículo eficaz para la liberación controlada de probióticos en el tracto digestivo.

Recomendaciones

Conforme a los resultados obtenidos de este estudio se considera necesario reformular la matriz encapsulante. Por lo cual se recomienda para futuras investigaciones el uso de almidones modificados, puesto el almidón convencional mostró una eficacia limitada en las condiciones evaluadas. Asimismo, es pertinente explorar la incorporación de gomas naturales o un material de pared de naturaleza lipídica con el fin de mejorar la protección estructural de la cápsula y aumentar la viabilidad de los microorganismos durante su paso por condiciones gástricas simuladas.

En caso de disponibilidad, emplear un sistema de extrusión por goteo automatizado o semiautomatizado para facilitar la producción de las perlas homogéneas en tamaño y forma, mejorando así la reproducibilidad del ensayo. Este tipo de sistema también reduce la variabilidad humana y facilita el escalado del proceso.

Ejecutar la encapsulación partiendo de una concentración bacteriana inicial igual o superior a 10^{10} UFC/g, con el fin de asegurar una concentración final viable tras la exposición a condiciones adversas.

Implementar movimientos periódicos y controlados de separación de las cápsulas durante el proceso de secado para evitar su aglomeración, favorecer una distribución uniforme en la superficie de secado, minimizar la coalescencia y beneficiar la conservación de la forma esférica de las perlas, mejorando así la calidad del producto final.

Para mejorar la eficiencia de recuperación de bacterias viables procedentes de las cápsulas, se recomienda sustituir o complementar la maceración física utilizando soluciones químicas específicas como solución tampón fosfato salino (PBS) evaluando diferentes

concentraciones, intentando conseguir una liberación más completa y menos agresiva, evitando la destrucción mecánica de las células encapsuladas y optimizando la estimación de la viabilidad.

Referencias Bibliográficas

- Acosta, A., Lon-Wo, E., García, Y., Dieppa, O., & Febles, M. (2007). Efecto de una mezcla probiótica (*Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*) en el comportamiento productivo, rendimiento en canal e indicadores económicos del pollo de ceba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 41(4), 355-358.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017712011>
- Afzaal, M., Saeed, F., Hussain, M., Ismail, Z., Siddeeg, A., AL-Farga, A., & Aljobair, M. O. (2022). Influence of encapsulation on the survival of probiotics in food matrix under simulated stress conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(9), 103394.
<https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2022.103394>
- Ağagündüz, D., Özata-Uyar, G., Kocaadam-Bozkurt, B., Özturan-Şirin, A., Capasso, R., Al-Assaf, S., & Özoğul, F. (2023). A comprehensive review on food hydrocolloids as gut modulators in the food matrix and nutrition: The hydrocolloid-gut-health axis. *Food Hydrocolloids*, 145, 109068. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2023.109068>
- 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).
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952013000100001
- Alavi, N., Golmakani, M. T., & Hosseini, S. M. H. (2022). Fabrication and characterization of phycocyanin-alginate-pregelatinized corn starch composite gel beads: Effects of carriers

on kinetic stability of phycocyanin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 218, 665-678. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.07.111>

Amador Lamus, I. S. (2021). *Encapsulación de un Consorcio Microbiano con Actividad Promotora de Crecimiento Vegetal (PGPM) en una Matriz de Almidón de Yuca y Alginato* [Tesis de pregrado, Universidad de Santander].

<https://repositorio.udes.edu.co/server/api/core/bitstreams/4d831441-f0e0-4624-a494-b5a5e39451a6/content>

Amorós López, D. (2013). *Efecto del almidón en la viabilidad gastrointestinal de Lactobacillus acidophilus en biosoportres de alginato/almidón* [Tesis de maestría, Universidad de Oviedo].

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fdigibuo.uniovi.es%2Fspace%2Fbitstream%2F10651%2F19091%2F6%2FTFM_Derek%2520Amoros%2520Lopez.pdf&psig=AOvVaw17iH_h37pRPNGtIQUpsIvA&ust=1743469068523000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CAYQrpoMahcKEwiYif3FjrOMAxUAAAAAHQAAA AAQBA

Angel, R., Kim, S. W., Li, W., & Jiménez Moreno, E. (2013). Velocidad de paso y pH intestinal en aves: implicaciones para la digestión y el uso de enzimas. En *XXIX Curso de especialización FEDNA: Avances Nutrición y Alimentación Animal*. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/05-13CAP_VIIItrad.pdf

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. (2024). *Declaraciones de propiedades saludables*. EFSA. <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/health-claims>

- Bang, M., Yong, C. C., Ko, H. J., Choi, I. G., & Oh, S. (2018). Transcriptional response and enhanced intestinal adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after acid stress. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(10), 1604-1613.
<https://doi.org/10.4014/JMB.1807.07033>,
- Barajas Maldonado, A. (2018, enero 17). *Crece el uso de probióticos en avícolas colombianas*. Wattagne. <https://www.wattagnet.com/broilers-turkeys/article/15523988/crece-el-uso-de-probioticos-en-avicolas-colombianas-wattagnet>
- Bernal Castro, C. A., Díaz Moreno, C., & Gutiérrez Cortés, C. (2017). Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Revista chilena de nutrición*, 44(4), 383-392. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182017000400383>
- Biswas, S., Keightley, A., & Biswas, I. (2019). Characterization of a stress tolerance defective mutant of *Lactobacillus rhamnosus*LRB. *Molecular oral microbiology*, 34(4), 153.
<https://doi.org/10.1111/OMI.12262>
- Calderón, O., Padilla, C., Chaves, C., Villalobos, L., & Laura Arias, María. (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(1).
https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000100007
- Carrisales Caycedo, M. F. (2022). *Evaluación de la Matriz de Alginato de Sodio y Maltodextrina Para la Encapsulación de Lactobacillus Casei* [Tesis de pregrado, Universidad de Santander]. <https://repositorio.udes.edu.co/server/api/core/bitstreams/7aec6797-37a9-40a8-a197-2fcddc3878e9/content>

- Chávez Gómez, L. A., López Herrera, A., & Parra Suescún, J. Eduardo. (2015). La inclusión de cepas probióticas mejora los parámetros inmunológicos en pollos de engorde. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10(2).
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072015000200008&lang=es
- Chen, M. Y., Zheng, W., Dong, Q. Y., Li, Z. H., Shi, L. E., & Tang, Z. X. (2014). Activity of encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-whey protein microspheres. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 736-741. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402377>
- Cuéllar Sáenz, J. A. (2022, abril 13). Conversión alimenticia en el pollo de engorde: ¿Cómo hacerla eficiente? *Veterinaria digital*.
<https://www.veterinariadigital.com/articulos/conversion-alimenticia-en-el-pollo-de-engorde-que-significa-y-como-hacerla-eficiente/>
- De Araújo Uribe, N. (2016). *Viabilidad de los Probióticos Bacillus polymyxa, Bacillus megaterium y Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus microencapsulados bajo la técnica de secado por aspersión* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/59146/32244578.2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- De La Cruz Molina, A. V., & Terán Ratti, A. R. (2013). *Evaluación de la viabilidad de Lactobacillus casei libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba* [Tesis de pregrado, Escuela Agrícola Panamericano].
<https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/75e7112a-0da0-4ac5-97f1-0992378ec34a/content>

- de Souza, O. F., Vecchi, B., Gumina, E., Matté, F., Gazoni, F. L., Hernandez Velasco, X., Hall, J. W., Stefanello, C., & Layton, S. (2022). Development and Evaluation of a Commercial Direct-Fed Microbial (Zymospore®) on the Fecal Microbiome and Growth Performance of Broiler Chickens under Experimental Challenge Conditions. *Animals*, *12*(11), 1436. <https://doi.org/10.3390/ANI12111436/S1>
- Díaz López, E. A., Ángel Isaza, J., & Ángel, D. B. (2017). Probióticos en la avicultura: una revisión. *Revista de Medicina Veterinaria*, *35*, 175-189. <https://doi.org/10.19052/mv.4400>
- Doherty, S. B., Auty, M. A., Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Brodkorb, A. (2012). Survival of entrapped *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein micro-beads during simulated ex vivo gastro-intestinal transit. *International Dairy Journal*, *22*(1), 31-43. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2011.06.009>
- Duvós, V. (2016). *Primeros pasos en la generación de un sistema de recombinación y expresión de proteínas transmembrana para Lactobacillus spp.* [Tesis de pregrado, Universidad ORT Uruguay]. <https://dspace.ort.edu.uy/bitstream/handle/20.500.11968/3343/Material%20completo.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>
- Etchepare, M. de A., Raddatz, G. C., Cichoski, A. J., Flores, É. M. M., Barin, J. S., Queiroz Zepka, L., Jacob-Lopes, E., Grosso, C. R. F., & de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *Journal of Functional Foods*, *21*, 321-329. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.12.025>

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. En *FAO/WHO*.

<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000197343.pdf>

Galego, J. (2019, septiembre). *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), 30 años de beneficios y evidencia. *El Farmacéutico*, 37-41. https://www.elfarmacautico.es/tendencias/te-interesa/lactobacillus-rhamnosus-gg-lgg-30-anos-de-beneficios-y-evidencia_110312_102.html

Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, 69, 365-371. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.01.064>

Gómez Pérez, C. R., Perotti, A. P., García Rodríguez, A., & Esmerio Mazzaferro, J. A. (2013). Diseño Mc. Lean-Anderson aplicado para obtener recubrimientos de electrodos aleados con carbono, cromo y titanio. *Ingeniería Mecánica*, 16(2), 132-143. https://www.researchgate.net/publication/317520262_Disenio_Mc_Lean-Anderson_aplicado_para_obtener_recubrimientos_de_electrodos_aleados_con_carbono_cromo_y_titanio

González Vázquez, A., Ponce Figueroa, L., Alcivar Cobeña, J., Valverde Lucio, Y., & Gabriel Ortega, J. (2020). Suplementación alimenticia con promotores de crecimiento en pollos de engorde Cobb 500. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 7(1), 3-16. <https://doi.org/10.36610/J.JSAAS.2020.070100003>

- Hoh, P. Y., Lai, K. W., How, Y. H., & Pui, L. P. (2021). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG with resistant starch and xanthan gum. *Walailak Journal of Science and Technology*, 18(15). <https://doi.org/10.48048/WJST.2021.9573>
- Jadhav, K., Sharma, K. S., Katoch, S., Sharma, V. K., & Mane, B. G. (2015). Probiotics in Broiler Poultry Feeds: A Review. *International Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 02, 4-16. www.jakraya.com/journal/ijavs
- Jiménez Pranteda, M. L. (2010). *Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral* [Tesis de doctorado, Universidad de Granada]. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/15077/19121507.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jumazhanova, M., Kakimova, Z., Zharykbasov, Y., Kassymov, S., Zhumadilova, G., Muratbayev, A., Tashybayeva, M., & Suychinov, A. (2023). Effect of the Encapsulation Process on the Viability of Probiotics in a Simulated Gastrointestinal Tract Model Medium. *Processes* 2023, Vol. 11, Page 2757, 11(9), 2757. <https://doi.org/10.3390/PR11092757>
- Li, R., Zhang, Y., Polk, D. B., Tomasula, P. M., Yan, F., & Liu, L. S. (2016). Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system. *Journal of Controlled Release*, 230, 79-87. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.04.009>
- Liu, B., Fu, N., Woo, M. W., & Chen, X. D. (2018). Heat stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its cellular membrane during droplet drying and heat treatment. *Food Research International*, 112, 56-65. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.06.006>

- Liu, L., Li, X., Zhu, Y., Massounga Bora, A. F., Zhao, Y., Du, L., Li, D., & Bi, W. (2016). Effect of microencapsulation with Maillard reaction products of whey proteins and isomaltooligosaccharide on the survival of *Lactobacillus rhamnosus*. *LWT*, *73*, 37-43. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.05.030>
- Liu, L., Zhang, G., Qu, G., Liu, B., Zhang, X., Li, G., Jin, N., Li, C., Bai, J., & Zhao, C. (2023). Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation on the production performance, egg quality, eggshell ultrastructure, and lipid metabolism of late-phase laying hens. *BMC Veterinary Research*, *19*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/S12917-023-03719-9/TABLES/5>
- Lopes, S., Bueno, L., De Aguiar Júnior, F., & Finkler, C. L. L. (2017). Preparation and characterization of alginate and gelatin microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *89*(3), 1601-1613. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170071>
- Lupo Pasin, B., González Azón, C., & Maestro Garriga, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *3*(1), 130-151. <https://oaji.net/articles/2017/4924-1495374245.pdf>
- Martin, M. J., Lara Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT - Food Science and Technology*, *53*(2), 480-486. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2013.03.019>
- Mekonnen, Y. T., Savini, F., Indio, V., Seguino, A., Giacometti, F., Serraino, A., Candela, M., & De Cesare, A. (2024). Systematic review on microbiome-related nutritional interventions

- interfering with the colonization of foodborne pathogens in broiler gut to prevent contamination of poultry meat. *Poultry Science*, 103(5), 103607.
<https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2024.103607>
- Mohammadalinejhad, S., Almonaitytè, A., Jensen, I. J., Kurek, M., & Lerfall, J. (2023). Alginate microbeads incorporated with anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) using electrostatic extrusion: Microencapsulation optimization, characterization, and stability studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 246, 125684.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.125684>
- Montes Ramírez, L. M. (2013). *Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (Lactobacillus casei ATCC 393 y Lactobacillus rhamnosus ATCC 9469)* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/11893/01107466.2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Moreno, G. (2022, diciembre). *2022, un año de grandes retos para la avicultura*. Avicultores.
<https://fenavi.org/wp-content/uploads/2023/01/revista-297.pdf>
- Muñoz Madero, C. (2019). Uso de antibióticos en avicultura: Nuevo reglamento y Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos. *LVI Symposium Científico de Avicultura*.
https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/3428_uso%20de%20antibioticos%20en%20avicultura_cristina%20munoz.pdf

- Nezamdoost-Sani, N., Khaledabad, M. A., Amiri, S., & Mousavi Khaneghah, A. (2023). Alginate and derivatives hydrogels in encapsulation of probiotic bacteria: An updated review. *Food Bioscience*, 52, 102433. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102433>
- Noor, A., Al Murad, M., Jaya Chitra, A., Babu, S. N., & Govindarajan, S. (2022). Alginate based encapsulation of polyphenols of *Piper betel* leaves: Development, stability, bio-accessibility and biological activities. *Food Bioscience*, 47, 101715. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101715>
- NTC 4092. Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis., Pub. L. No. NTC 4092 (2009). https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/11639/81649_62294.pdf?sequence=
- Nunes, R., Scherer, C., Poveda P, A., da Silva, W., Appelt, M., & Bruno, L. (2016). Use of probiotics in diets of animal or vegetable origin for broilers. *Revista MVZ Córdoba*, 21(2), 5336-5344. <https://doi.org/10.21897/RMVZ.600>
- Olveira, G., & González Molero, I. (2016). Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinología y Nutrición*, 63(9), 482-494. <https://doi.org/10.1016/J.ENDONU.2016.07.006>
- Organización Mundial de Gastroenterología. (2023). Probióticos y prebióticos. En *Directrices mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología*. <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2023.pdf>
- Páez, R. B. (2013). *Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado spray para aplicación en alimentos. estudios microbiológicos y tecnológicos* [Tesis de doctorado,

- Universidad Nacional de la Plata].
https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/38116/Documento_completo_.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Parra Huertas, R. A. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 63(2), 5669-5684.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n2/a20v63n01.pdf>
- Pérez Leonard, H., Bueno García, G., Brizuela Herrada, M. A., Tortoló Cabañas, K., & Gastón Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47(1), 14-25.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223126409003>
- Pino, J., & Aragüez, Y. (2021). Conocimientos actuales acerca de la encapsulación de aceites esenciales. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 52(1), 10-25.
<https://www.redalyc.org/journal/1816/181669387003/html/>
- Resolución 810 de 2021, Ministerio de Salud y Protección Social (2021).
https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%20No.%20810de%202021.pdf
- Rodrigues, I., & Choct, M. (2018). The foregut and its manipulation via feeding practices in the chicken. *Poultry Science*, 97(9), 3188-3206. <https://doi.org/10.3382/PS/PEY191>
- Rodríguez R, Y. A., Rojas G, A. F., & Rodríguez B, S. (2016). Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Revista Biosalud*, 15(2), 106-115.
<https://doi.org/10.17151/biosa.2016.15.2.10>
- Rondón, L., Añez Zavala, M., Salvatierra Hidalgo, A., Meneses Barrios, R. T., & Heredia Rodríguez, M. T. (2015). Probióticos: generalidades. *Archivos Venezolanos de*

Puericultura y Pediatría, 78(4), 123-128.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06492015000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Rosales, G., Fancher, B. I., & Pearson, D. B. (2023, julio 21). *Producción de pollos de engorde libres de antibióticos y con uso reducido de antibióticos*. BM Editores.

<https://bmeditores.mx/avicultura/produccion-de-pollos-de-engorde-libres-de-antibioticos-y-con-uso-reducido-de-antibioticos/>

Rye, C., Wise, R., Jurukovski, V., DeSaix, J., Choi, J., & Avissar, Y. (2016). *Biología* (OpenStax, Ed.). <https://openstax.org/books/biology/pages/3-2-carbohidratos>

Sacco S.r.l. (2017). *Lactobacillus rhamnosus SP 1: el integrador probiótico que es bueno para la salud dental*. L'integratore nutrizionale.

<https://www.saccosystem.com/n/es/novedad/lactobacillus-rhamnosus-sp-1-el-integrador-probiotico-que-es-bueno-para-la-salud-dental/491/>

Sandoval Aldana, A., Rodríguez Sandoval, E., & Ayala Aponte, A. (2004). Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. *Ingeniería y Competitividad*, 5(2), 73-83.

<https://core.ac.uk/download/pdf/11861481.pdf>

Sandoval Peraza, V. M., Cu Cañetas, T., Peraza Mercado, G., & Acereto Escoffie, O. P. (2016).

Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceuticas. En *Propiedades funcionales de hoy* (pp. 181-218).

<https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/download/98/421/857-1?inline=1>

Sanz, Y., & Dalmau, J. (2008). Los probióticos en el marco de la nueva normativa europea que regula los alimentos funcionales. *Acta Pediátrica Española*, 66(1), 27-31.

<https://www.actapediatrica.com/index.php/secciones/nutricion-infantil/348-los-probi%C3%B3ticos-en-el-marco-de-la-nueva-normativa-europea-que-regula-los-alimentos-funcionales>

Scolari, A. (2019). Reducción de uso y producción sin uso de antibióticos en pollos y pavos de engorde en Italia: aspectos comerciales, problemas sanitarios y perspectivas futuras. *LVI Symposium Científico de Avicultura*. https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/13678_reduccion%20de%20uso%20y%20produccionsinn%20uso%20de%20antibioticos%20en%20pollos%20y%20pavos%20de%20engorde%20en%20italia_%20alessandro%20scolari.pdf

Silva, M. P., Tulini, F. L., Martins, E., Penning, M., Fávoro Trindade, C. S., & Poncelet, D. (2018). Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids. *LWT*, 89, 392-399. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.11.008>

Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I. D. (2014). Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. *Food Chemistry*, 159(100), 302. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.03.008>

Stage, M., Wichmann, A., Jørgensen, M., Vera-Jimenéz, N. I., Wielje, M., Nielsen, D. S., Sandelin, A., Chen, Y., & Baker, A. (2020). *Lactobacillus rhamnosus* GG genomic and phenotypic stability in an industrial production process. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(1). https://doi.org/10.1128/AEM.02780-19/SUPPL_FILE/AEM.02780-19-S0001.PDF

USP. (2021, mayo 1). *Lactobacillus rhamnosus*. Boletín de Revisión.

https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/ES/rb/lactobacillus-rhamnosus-rb-notice-20201218-esp.pdf

Vega Sagardía, M. A. (2017). *Encapsulación de la cepa Lactobacillus fermentum UCO-979C formadora de biopelícula y su influencia en la inhibición de crecimiento de Helicobacter pylori evaluada in vitro* [Tesis de maestría, Universidad de Concepción].

http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/2595/3/Tesis_Encapsulacion_de_la_cepa_lactobacillus.pdf

Velloso, C. C. V., Lopes, M. M., Badino, A. C., & Farinas, C. S. (2023). Exploring the roles of starch for microbial encapsulation through a systematic mapping review. *Carbohydrate Polymers*, 306, 120574. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2023.120574>

Vimon, S., Kertsomboon, T., Chirachanchai, S., Angkanaporn, K., & Nuengjamnong, C. (2023). Matrices-charges of agar-alginate crosslinked microcapsules via o/w microemulsion: A non-spore forming probiotic bacteria encapsulation system for extensive viability. *Carbohydrate Polymers*, 321, 121302. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2023.121302>

Wang, L., Yu, X., Xu, H., Aguilar, Z. P., & Wei, H. (2016). Effect of skim milk coated inulin-alginate encapsulation beads on viability and gene expression of *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 8-13. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.12.001>

Yin, M., Chen, L., Chen, M., Yuan, Y., Liu, F., & Zhong, F. (2024). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in double emulsions: Role of prebiotics in improving probiotics survival during spray drying and storage. *Food Hydrocolloids*, 151, 109792. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2024.109792>

Zhao, Z., Xie, X., Wang, Z., Tao, Y., Niu, X., Huang, X., Liu, L., & Li, Z. (2016).

Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in mesoporous silica-based material: An efficiency continuous cell-recycle fermentation system for lactic acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(6), 645-651.

<https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2015.11.010>