



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EFECTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN DE *Pediococcus acidilactici* Y
Lactobacillus plantarum EN ALGINATO-GOMA ARÁBIGA PARA SU USO COMO
PROBIÓTICOS**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
IVONNE LIZETH SANDOVAL MOSQUEDA**

**TUTOR PRINCIPAL:
ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA**

**LUIS CORONA GOCHI
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A Omar,

Mi compañero de vida y mi mejor amigo. Por permitirme ser libre para cumplir mis metas y apoyar mis sueños.

A mis padres,

Con mucho cariño para ustedes, por haber sido mí guía y ejemplo. Espero que comprendan que mis logros son también sus logros y que estaré eternamente agradecida por todo su amor y sacrificios.

A mis hermanos,

Itzel, Edgar y Jonathan. Por acompañarme desde la infancia, el camino recorrido estuvo lleno de alegrías y en los momentos de tristeza, gracias a ustedes, jamás sentí soledad.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la UNAM por los apoyos recibidos durante los estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 339105 recibida durante el periodo 2015-1 a 2016-2.

A mi tutora Adriana Llorente Bousquets, por el apoyo y la dedicación a mi desarrollo profesional, por ser una excelente profesora y depositar su confianza en mí para que este proyecto culminara en buenos resultados. Debe saber que este trabajo me deja un gran cariño por las BL y un profundo agradecimiento hacia usted.

A mi comité tutorial: Dr. José Francisco Montiel Sosa y Dr. Luis Corona Gochi, por sus observaciones y guía durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez, por la oportunidad de realizar la PCR en su laboratorio.

A la profesora Zaira Guadarrama, por la colaboración en la elaboración del Análisis de Perfil de Textura.

A la M. en C. Sofía González Gallardo por su apoyo en la observación en microscopía electrónica de barrido.

A la Dra. Silvina Fadda y Alejandra Orihuel por la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo durante la estancia realizada en CERELA-CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina. La hospitalidad y confianza brindadas deja en mí un gran cariño hacia ustedes y a su familia.

A mi compañera de Maestría Yoselín del Castillo, debes saber que tu amistad y compañía en el laboratorio ayudaron aligerar el camino recorrido.

RESUMEN

En el campo de la producción animal se ha estudiado el uso de bacterias lácticas (BL) como probióticos, para ayudar a mantener un perfil microbiano favorable, en el intestino, al reducir la microbiota colibacilar en animales durante periodos de estrés. De este modo estudios realizados en animales domésticos para evaluar el efecto de la administración de probióticos muestran una mejora en los parámetros productivos, en paralelo se investigan diversos microorganismos probióticos y sus efectos sobre la salud animal, como una alternativa al uso de los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento. Los efectos benéficos de las bacterias probióticas dependen de la viabilidad de las células en el intestino. Diversos estudios muestran que la microencapsulación de cepas probióticas con el uso de soportes (prebióticos) mejora su viabilidad bajo condiciones de estrés (temperatura, pH y almacenamiento). Las cepas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, con potencial probiótico en pruebas *in vitro*, llevan a esta nueva investigación cuyo objetivo fue aplicar el uso de biopolímeros (alginato de sodio y goma arábica) en su microencapsulación, para su posterior aplicación como probióticos en animales no rumiantes. Se aplicó PCR para la identificación de las cepas (FAO/OMS). Fueron evaluados los parámetros de perfil de textura (TPA) y características microscópicas del sistema elaborado mediante extrusión. Las cepas cultivadas y liofilizadas se adicionaron en los soportes de biopolímeros (alginato y goma arábica). Fue determinada la viabilidad de los cultivos de los probióticos previos a su encapsulación, en las microcápsulas y posterior a su liofilización, así como pruebas *in vitro* bajo condiciones de tracto gastrointestinal (TGI). En la evaluación del sistema de microcápsulas, los extruidos formados con alginato solo y en combinación de goma arábica al 1 y 2% presentaron mayor fuerza en el TPA y demostraron su integridad frente a la liofilización. La microencapsulación de ambas cepas con el uso de leche descremada, alginato y goma arábica, permitieron una mayor viabilidad ($P < 0.05$) frente al proceso de liofilización, así como en su evaluación bajo condiciones simuladas de TGI *in vitro*.

Palabras clave: Microencapsulación, Probióticos, *Pediococcus acidilactici*, Alginato, Goma arábica, Liofilización

ABSTRACT

In the field of animal production, the using of lactic bacteria (BL) like probiotics has been studied to help maintain a favorable microbial profile in the intestine by reducing colibacilar microbiota in the animals during periods of stress. Thus studies in domestic animals to evaluate the effect of probiotic administration show improvement in the production parameters. Simultaneously, several probiotic microorganisms and their effects on animal health are investigated, as an alternative to the using of antibiotics used as promoters are growth. The beneficial effects of probiotic bacteria depend on the viability of cells in the intestine. Various studies show that the microencapsulation of strains probiotic with the use of stands (Prebiotics) improves its viability under conditions of stress (temperature, pH and storage). The strains of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, with potential probiotic in *in vitro* tests, leading to this new research whose objective was to apply the use of biopolymers (Arabic gum and sodium alginate) in their microencapsulation, for later use as probiotics in non-ruminant animals. Applied PCR for identification of strains (FAO/WHO). Were evaluated the parameters of profile of texture (TPA) and features microscopic of the system made by extrusion. Cultivated and freeze-dried strains were added in brackets of biopolymers (alginate and gum Arabic). Was determined the viability of them crops of them probiotics previous to its encapsulation, in them microcapsules and back to his freeze-drying, as well as tests in *in vitro* low conditions of gastrointestinal tract (GIT). In the evaluation of the system of microcapsules, the extruded formed with alginate alone and in combination of gum Arabic to the 1 and 2% showed greater strength in the TPA and showed his integrity against the freeze. The microencapsulation of both strains using skim milk, alginate, and gum Arabic, allowed a greater viability ($P < 0.05$) facing the freeze-drying process, as well as their assessment under conditions simulated TGI *in vitro*.

Key words: Microencapsulation, probiotics, *Pediococcus acidilactici*, alginate, gum Arabic, freeze-drying

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE CUADROS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	XII
INTRODUCCIÓN	- 1 -
CAPÍTULO 1: REVISIÓN DE LITERATURA	- 3 -
1.1. Probióticos	- 4 -
1.2. Mecanismos de acción de los probióticos	- 4 -
1.2.1. Control sobre patógenos	- 5 -
1.2.2. Mantenimiento de la barrera intestinal	- 6 -
1.2.2.1. Secreción de mucina	- 6 -
1.2.2.2. Sobre complejos de unión.....	- 7 -
1.2.2.3. Producción de defensinas.....	- 9 -
1.2.3. Modulación del sistema inmunológico.....	- 10 -
1.2.3.1. Producción de citocinas	- 10 -
1.2.3.2. Producción de IgA	- 11 -
1.2.3.3. Efectos Nutricionales	- 11 -
1.3. Uso de Probióticos en la producción animal.....	- 12 -
1.4. Uso de probióticos a nivel de salud animal.....	- 14 -
1.4.1. Gastroenteritis	- 15 -
1.4.2. Alergias	- 15 -
1.4.3. Obesidad.....	- 16 -
1.4.4. Cáncer.....	- 17 -
1.5. Criterios para la evaluación de probióticos	- 18 -
1.5.1. Identificación del género, especie y cepa	- 18 -
1.5.2. Pruebas <i>in vitro</i> para detectar los probióticos potenciales	- 18 -
1.5.3. Seguridad de los probióticos	- 18 -
1.6. Bacterias Lácticas (BL).....	- 19 -

1.6.1.	Género <i>Pediococcus</i>	20 -
1.6.1.1.	<i>Pediococcus acidilactici</i>	21 -
1.6.2.	Género <i>Lactobacillus</i>	21 -
1.6.2.1.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	22 -
1.7.	Condiciones de tracto gastrointestinal en animales monogástricos	22 -
1.7.1.	Condiciones gástricas	22 -
1.7.2.	Condiciones intestinales	23 -
1.8.	Mantenimiento y protección de probióticos	23 -
1.8.1.	Liofilización de bacterias probióticas	24 -
1.8.2.	Microencapsulación de probióticos	24 -
1.8.2.1.	Materiales utilizados en la microencapsulación	25 -
1.8.2.1.1.	Biopolímeros	25 -
1.8.2.1.2.	Prebióticos	26 -
1.8.2.2.	Métodos utilizados para la microencapsulación	26 -
CAPÍTULO 2: Desarrollo y caracterización e un sistema de microcápsulas con alginato y goma aábiga para su utilización como soportes de probióticos		28 -
1.	Introducción	30 -
2.	Materiales y métodos	31 -
2.1.	Elaboración del sistema extruido con alginato de sodio	31 -
2.2.	Liofilización de extruidos	31 -
2.3.	Reconstitución de las microcápsulas	31 -
2.4.	Uso de la goma arábica en la formación del sistema	32 -
2.5.	Análisis de perfil de textura (TPA) de los extruidos	32 -
2.6.	Observación de las microcápsulas por microscopía electrónica de barrido (MEB)	32 -
3.	Análisis estadístico	33 -
4.	Resultados y discusión	33 -
4.1.	Elaboración del sistema mediante extrusión de alginato de sodio	33 -
4.2.	Análisis de Perfil de Textura de perlas extruidas	33 -
4.3.	Evaluación de las perlas de alginato/goma arábica antes y después de la liofilización	35 -

4.4. Morfología de los extruidos liofilizados por microscopía electrónica de barrido (MEB)	- 37 -
5. Conclusiones	- 39 -
6. Resultados Sobresalientes	- 39 -
7. Agradecimientos	- 40 -
8. Referencias	- 40 -
CAPÍTULO 3: Efecto de la microencapsulación de las cepas probióticas <i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i> en alginato-goma arábica y su evaluación bajo condiciones simuladas de tracto gastrointestinal	- 42 -
1. Introducción	- 44 -
2. Materiales y métodos	- 45 -
2.1. Cepas bacterianas y manejo de cultivos	- 45 -
2.2. Verificación de la Identificación de las cepas mediante PCR	- 46 -
2.2.1. Extracción de ADN	- 46 -
2.2.2. PCR de la cepa <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	- 46 -
2.2.3. PCR de la cepa de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014	- 47 -
2.2.4. Electroforesis de los productos amplificados	- 47 -
2.3. Manejo de las células	- 48 -
2.3.1. Construcción de las cinéticas de crecimiento de las cepas	- 48 -
2.3.2. Preparación de las células para la microencapsulación	- 48 -
2.4. Microencapsulación y liofilización de las cepas en el sistema de alginato-goma arábica	- 48 -
2.4.1. Determinación de viabilidad de <i>P. acidilactici</i> y <i>L. plantarum</i> en los tratamientos microencapsulados liofilizados	- 49 -
2.5. Microencapsulación y liofilización de las cepas con el uso de un crioprotector (leche descremada al 10%)	- 49 -
2.6. Desafío de las cepas microencapsuladas bajo condiciones de medio gástrico simulado	- 50 -
2.7. Desafío de las cepas microencapsuladas bajo condiciones de medio intestinal	- 50 -
2.8. Tolerancia de las cepas microencapsuladas en medio gástrico seguido de medio intestinal	- 50 -
3. Análisis estadístico	- 51 -

4. Resultados y discusión	- 51 -
4.1. Identidad de las cepas mediante PCR	- 51 -
4.2. Cinéticas de crecimiento bacteriano.....	- 53 -
4.3. Porcentaje de encapsulación de las cepas en el sistema elaborado con alginato/goma arábica	- 54 -
4.4. Viabilidad de las cepas microencapsuladas frente a la liofilización	- 55 -
4.5. Microencapsulación y liofilización de las cepas con el uso de leche descremada al 10%.....	- 56 -
4.6. Viabilidad de células microencapsuladas desafiadas en jugo gástrico simulado	- 58 -
4.7. Viabilidad de células encapsuladas en medio intestinal aislado	- 60 -
4.8. Desafío de células encapsuladas en medio gástrico seguido de medio intestinal	- 61 -
5. Conclusiones	- 63 -
6. Referencias	- 64 -
DISCUSIÓN GENERAL	- 68 -
REFERENCIAS	- 72 -
ANEXOS	- 80 -

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Elaboración del sistema de extrusión con alginato de sodio.....	- 33 -
Cuadro 2 Parámetros texturales de los extruidos.....	- 35 -
Cuadro 3 Sistema extruido con alginato y goma arábica en diferentes concentraciones.....	- 36 -
Cuadro 4 Viabilidad (%) de cepas encapsuladas por mL de extruido.....	- 55 -
Cuadro 5 Efecto de la liofilización en la viabilidad de cepas microencapsuladas en el sistema de alginato-goma arábica.....	- 56 -
Cuadro 6 Desafío en jugo gástrico simulado de la cepa <i>P. acidilactici</i> microencapsulada liofilizada.....	- 59 -
Cuadro 7 Desafío en jugo gástrico simulado de la cepa <i>L. plantarum</i> microencapsulada liofilizada.....	- 60 -
Cuadro 8 Efecto de la encapsulación de la cepa <i>P. acidilactici</i> en prueba de tolerancia intestinal.....	- 61 -
Cuadro 9 Efecto de la encapsulación de la cepa <i>L. plantarum</i> en prueba de tolerancia intestinal.....	- 61 -
Cuadro 10 Efecto de la microencapsulación de <i>P. acidilactici</i> en medio gástrico seguido de medio intestinal.....	- 62 -
Cuadro 11 Efecto de la microencapsulación de <i>L. plantarum</i> en medio gástrico e intestinal simulados.....	- 63 -
Cuadro 12 Medio MRS formulado modificado por Llorente (1998).....	- 80 -
Cuadro 13 Secuencia de los primers utilizados para la identificación de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042.....	- 82 -
Cuadro 14 Secuencia de los primers utilizados para la identificación de <i>L. plantarum</i>	- 82 -
Cuadro 15 Cinética de crecimiento de la cepa <i>P. acidilactici</i>	- 83 -
Cuadro 16 Cinética de crecimiento de la cepa <i>L. plantarum</i>	- 83 -
Cuadro 17 UFC/mL y viabilidad de las cepas microencapsuladas.....	- 84 -

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo de acción asociados a probióticos	- 5 -
Figura 2 Tipos de uniones celulares presentes en el epitelio intestinal	- 8 -
Figura 3 Cambios que se han producido en la clasificación de las BL.....	- 20 -
Figura 4 Modelo de gelificación “caja de huevo”	- 25 -
Figura 5 Diagrama de flujo de la microencapsulación de bacterias.	- 27 -
Figura 6 Análisis de perfil de textura de los extruidos	- 34 -
Figura 7 Morfología de extruidos liofilizados en microscopio óptico.....	- 37 -
Figura 8 Imágenes de MEB de microcápsulas liofilizadas	- 39 -
Figura 9 Patrón electroforético de los productos de PCR en la identificación de <i>P.acidilactici</i> y <i>L.plantarum</i>	- 52 -
Figura 10 Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	- 53 -
Figura 11 Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014.....	- 54 -
Figura 12 Efecto de soportes en la liofilización de cepas microencapsuladas de cepas microencapsuladas	- 58 -
Figura 13 Características de <i>P. acidilactici</i>	- 81 -
Figura 14 Características de <i>L. plantarum</i>	- 81 -

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

$A_{600\text{nm}}$: Absorbancia a 600 nanómetros

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

CaCl_2 : cloruro de calcio

FAO: Food and Agriculture Organization

g: gramo

GALT: Tejido linfoide asociado al intestino

IFN- γ : Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

ldh: Lactato deshidrogenasa

M: células M del intestino delgado

NK: células Natural killer

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns

PBS: Buffer Fosfato Salino

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

pH: potencial de Hidrogeniones

spp.: especies

Th: células T-helper

TLR: Toll-like receptor

TNF: Tumour necrosis factor

Treg: células T reguladoras

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro

v/v: volumen/volumen

μg : microgramo

μl : microlitro

μm : micrómetro

INTRODUCCIÓN

El término probiótico se utiliza para designar los microorganismos que tienen efectos benéficos para humanos y animales. Fue el científico ruso Eli Metchnikoff quien apreció en regiones de Bulgaria, donde el consumo de leches fermentadas era habitual, que la longevidad se veía significativamente aumentada (Metchnikoff, 1907). Por otra parte el pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias bífidas, que por el contrario, abundaban en los niños sanos, sugiriendo la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea facilitaría el restablecimiento de una flora intestinal sana (Tissier, 1906). Las obras de Metchnikoff y Tissier fueron las primeras propuestas científicas con respecto a la utilización probiótica de bacterias, aun cuando la palabra “probiótico” no se acuñó sino hasta 1960 (FAO/OMS, 2002).

El uso de probióticos en la producción animal se ha incrementado considerablemente en los últimos 15 años, debido a que estos microorganismos pueden ayudar a optimizar los resultados zootécnicos (Chaucheyras y Durand, 2010). Recientemente el interés del uso de probióticos está enfocado en la eliminación de los antibióticos promotores de crecimiento y la reducción de patógenos bacterianos en los productos de origen animal para el consumo humano (Mozzi, 2016). La administración de probióticos en los piensos de los animales, es escasa, ya que la mayoría no sobreviven a las altas temperaturas de la granulación y durante el almacenamiento, por lo cual deben ser administrados como aditivos previamente protegidos mediante diferentes tratamientos que aseguren su viabilidad y eficacia. Principalmente estos aditivos probióticos puede ser en forma líquida, de polvo, en bolo, encapsulados o microencapsulados (Carro, 2014; Yirga, 2015).

En cuanto a los trabajos previos sobre la línea de investigación, se demostró que el sobrenadante del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 ejerce actividad inhibitoria sobre el crecimiento de microorganismos patógenos tales como *Staphylococcus aureus* (Llorente 1998; Rivera 2004; Llorente, 2008), *E. coli* (Hernandez, 2013), *Salmonella*

Typhimurium, *Listeria innocua* (Llorente, 2008), *Listeria monocytogenes* (Martinez, 2011) y *Pseudomonas aeruginosa* (Martinez, 2011; Munguía, 2015).

Ceron (2014) realizó la caracterización de *P. acidilactici* ATTC 8042 como probiótico potencial y su evaluación comparativa con *Lactobacillus plantarum* ATTC 8014 realizando las pruebas de hemólisis, sobrevivencia al tracto gastrointestinal, adherencia a *mucus* y prueba de sensibilidad a antibióticos. De las cuales determinó que *P. acidilactici* carece de actividad hemolítica y presentó mayor número de resistencias a antibióticos en comparación con *L. plantarum*. El estudio *in vitro* de sobrevivencia al tracto gastrointestinal mostró diferencias significativas, donde *L. plantarum* tuvo mayor tolerancia a las condiciones gástricas e intestinales en comparación a *P. acidilactici* y comprobó que ambas cepas poseen la misma capacidad de adherencia a *mucus* porcino, característica que le confiere la posibilidad de colonizar el intestino.

Por lo expuesto anteriormente el objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso de biopolímeros (alginato de sodio y goma arábiga) en la microencapsulación de las cepas *P. acidilactici* y *L. plantarum* para su posterior aplicación como probióticos de uso veterinario.

CAPÍTULO 1

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Probióticos

El término probiótico cuyo significado griego es “a favor de la vida” se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales con respecto a la salud no solo del tracto gastrointestinal, sino también respiratorio, urogenital, así como modulador del sistema inmune.

Elías Metchnikoff (1907) ganador del Premio Nobel por el desarrollo de la teoría fagocítica e identificado como el padre de las bacterias lácticas, en su libro “La prolongación de la vida” recomendó el uso de productos lácteos fermentados que contuvieran *Lactobacillus bulgaricus*, capaces de vivir, crecer y producir efectos favorables en el tracto digestivo. Metchnikoff fue el primer investigador en desarrollar un producto terapéutico utilizando lactobacilos en forma de cápsula para administración vía enteral.

Actualmente los probióticos son definidos por el comité mixto FAO/OMS (2012) como microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas, ejercen un efecto benéfico sobre la salud del huésped (Guarner y Schaafsma, 1998).

1.2. Mecanismos de acción de los probióticos

Los probióticos afectan la composición de la microbiota intestinal ejerciendo efectos sobre patógenos, mejoran la función de la barrera intestinal, son capaces de modular el sistema inmune y de proveer efectos nutricionales (Figura 1). A continuación se describe cómo es que actúan estos microorganismos probióticos sobre el huésped.

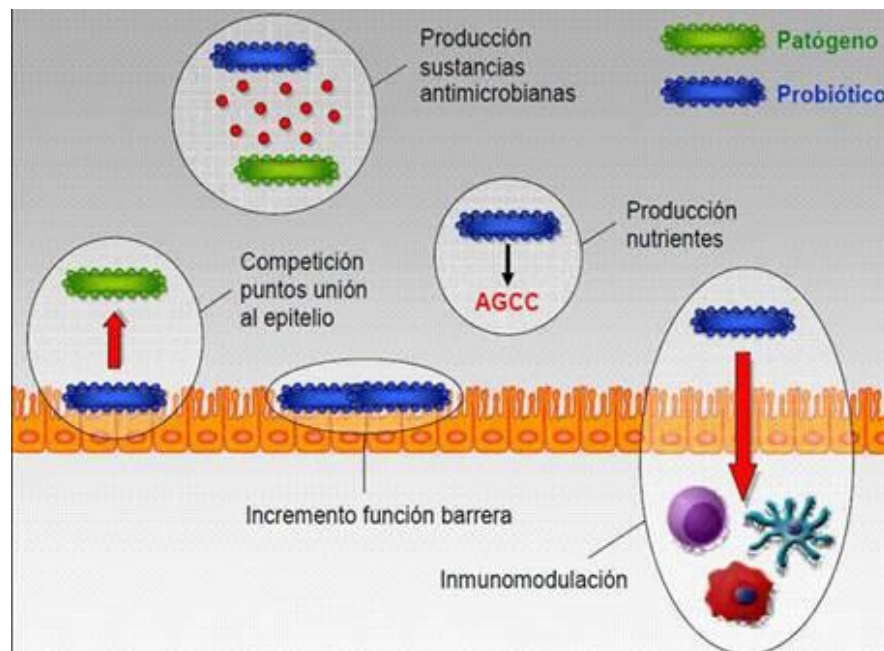


Figura 1 Mecanismo de acción asociados a probióticos (Randolph, 2013)

1.2.1. Control sobre patógenos

- **Efecto bactericida y bacteriostático.** Las bacterias probióticas producen metabolitos primarios y secundarios que pueden cumplir acciones antimicrobianas, tales como el ácido láctico, ácidos volátiles (acetato, propionato y butirato), peróxido de hidrógeno, etanol, diacetilo, BLIS (bacteriocin-like inhibitory substances) y bacteriocinas (Parra, 2010).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidas por una amplia variedad de bacterias, incluyendo a las bacterias lácticas (BL), que son activas contra otras Gram (+) como *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y algunas especies de *Bacillus* (Jeevaratnam *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). Estudios recientes han demostrado que las bacteriocinas desempeñan un papel en la microbiota intestinal para la protección contra estos patógenos transmitidos por los alimentos (Nes *et al.*, 2007).

- **Exclusión competitiva.** Las bacterias probióticas pueden contribuir a la función de la barrera intestinal evitando que se establezcan microorganismos patógenos al competir por

los sustratos disponibles en la luz intestinal así como los sitios de unión de las células epiteliales, por lo que las bacterias patógenas no disponen de un medio propicio para su desarrollo (MinTze, 2011; Malago, 2011).

Se ha demostrado que algunas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son capaces de competir con bacterias patógenas incluyendo *S. entérica*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* enterotohemorrágica y *E. coli* enteropatógena para los sitios de unión de células epiteliales (Sherman *et al.*, 2005).

Uno de los mecanismos estudiados por los cuales las cepas probióticas inhiben la adherencia de patógenos a las células intestinales es la competencia de los sitios de unión de lectinas bacterianas, sobre los receptores moleculares glico-conjugados ubicados en la superficie celular (Michail y Sherman, 2009).

1.2.2. Mantenimiento de la barrera intestinal

La barrera intestinal es un mecanismo de defensa que permite mantener la integridad del epitelio, con la producción de mucina, péptidos antimicrobianos y el complejo de adhesión de las uniones epiteliales, protegiendo así al organismo frente a la acción de agresiones externas. Numerosos estudios reportan que algunas cepas probióticas mejoran estos mecanismos.

1.2.2.1. Secreción de mucina

El epitelio intestinal se encuentra cubierto por una capa mucosa formada principalmente por mucinas, cuya función es proteger a las células epiteliales, limita la adhesión microbiana y su posterior traslocación. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular, al menos 12 genes se han identificado en su expresión, y de éstos, los genes MUC2 y MUC3 son los predominantes en la expresión de mucinas ileocolónicas (Malago *et al.*, 2011).

Se ha establecido que algunos microorganismos probióticos tienen la capacidad de inducir la secreción de mucinas, lo que ayuda a prevenir la adhesión, migración y colonización de bacterias patógenas. Mattar *et al.* (2002), utilizando un modelo experimental *in vitro* demostraron, que la adición del probiótico *Lactobacillus casei* en una monocapa de

enterocitos resultó en un aumento en la expresión del gen MUC2, con un aumento en las densidades de proteínas mediante técnicas electroforéticas, concluyendo que *Lactobacillus casei* tiene la capacidad de inhibir la traslocación bacteriana aumentando la producción de *mucus*.

Ciro *et al.* (2015), evaluaron el efecto de la adición de diferentes cepas probióticas (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* o *Enterococcus faecium*) sobre la producción de mucinas en lechones recién destetados, obteniendo en el grupo control una producción de mucinas en el día uno (185.4 μm) y en el día 30 (202.7 μm), mientras que en el grupo al cual se adicionaron probióticos se obtuvo en el día uno (186.7 μm) y un aumento altamente significativo ($P < 0.01$) al día 30 con (242.7 μm), concluyendo que la adición de *E. faecium* en la dieta promueve la producción y secreción de mucinas que puede verse reflejado en la salud intestinal de los animales.

1.2.2.2. Sobre complejos de unión

Los enterocitos constituyen por si mismos una barrera gracias a los complejos de unión que se forman entre las células y que se localizan a distintas alturas de la membrana lateral. Estas uniones se encuentran constituidas por proteínas transmembranales y citosólicas que se anclan al citoesqueleto mediante proteínas de soporte.

Los complejos de unión presentes en el epitelio intestinal se clasifican en: uniones de tipo estrecho, uniones adherentes y desmosomas (Figura 2). Las uniones adherentes y los desmosomas establecen puentes entre las células para facilitar la formación de las uniones estrechas, las cuales se localizan en la zona apical de la membrana lateral. Las uniones estrechas están formadas por un complejo multiproteico y dinámico que controlan el transporte paracelular de solutos e iones, e impide el paso de antígenos y microorganismos desde el lumen. Las proteínas que forman las uniones estrechas principalmente son las claudinas, ocludinas y proteínas de adhesión de unión. Las proteínas de soporte que unen estas proteínas al citoesqueleto son las ZO (zonula occludens) (Groschwitz y Hogan, 2009).

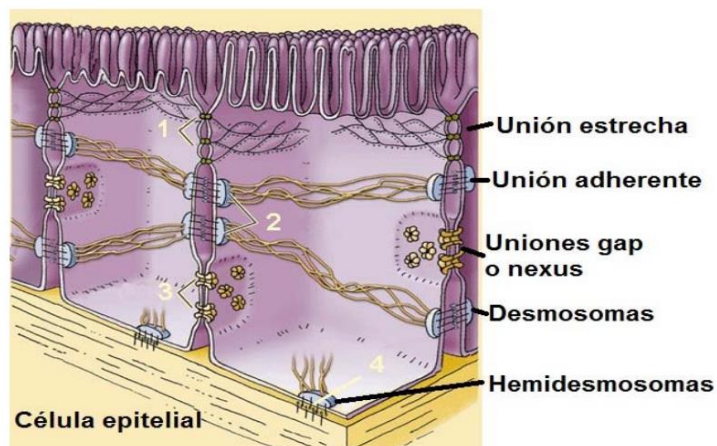


Figura 2 Tipos de uniones celulares presentes en el epitelio intestinal. (Fuente: Fromm y Schulzke, 2009)

La alteración de la estructura y función de las uniones estrechas conduce a un aumento de la permeabilidad, alterando de este modo la homeostasis intestinal. Factores como las citocinas inflamatorias, toxinas o bacterias pueden influir negativamente en el estado de las uniones estrechas. Los probióticos pueden actuar sobre el epitelio incrementando la resistencia de la barrera o iniciando su reparación después de una lesión (Michail y Sherman, 2009). Por ejemplo, Yang *et al.* (2015) encontraron, que la administración de *Lactobacillus reuteri* aumentó significativamente la abundancia de proteínas epiteliales intestinales Claudina-1, ocludina y zonula occluden-1 (ZO-1) en lechones recién nacidos.

In vitro, el tratamiento con *L. reuteri* en una línea de células epiteliales porcinas (IPEC-J2) mantuvo la resistencia transepitelial eléctrica (TEER); técnica altamente aceptada para determinar lo ajustado de la capa de células epiteliales. Cuando estas células fueron pretratadas con LPS, se observó un aumento en la expresión de TNF- α e IL-6 así como una disminución de las proteínas de uniones estrechas que fueron revertidas por el tratamiento previo de *L. reuteri* o por sus sobrenadantes del cultivo.

Chen-Yu *et al.* (2015) realizaron un experimento en donde la especie de *Bifidobacterium bifidum*, mejoró la integridad de la barrera epitelial utilizando una monocapa de células

Caco-2. El aumento en la resistencia eléctrica transepitelial (TER) fue observado al administrar acetato proveniente de los sobrenadantes del cultivo bacteriano, sugiriendo que la especie de *Bifidobacterium* mejora la función de la barrera epitelial a través de metabolitos, tales como el acetato.

1.2.2.3. Producción de defensinas

Las defensinas son pequeños péptidos de 20 a 40 aminoácidos englobadas en la inmunidad innata en todas las especies, las cuales poseen actividad antimicrobiana contra una amplia variedad de bacterias, hongos y virus. Estas son clasificadas en α -defensinas, sintetizadas principalmente por las células de Paneth del intestino delgado y β -defensinas, expresadas por las células epiteliales intestinales. La baja producción de defensinas ha sido asociada con el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal y a una mayor susceptibilidad de infecciones bacterianas (Möndel *et al.*, 2009; Ohland y Mac Naughton, 2010).

Estudios clínicos muestran la eficacia terapéutica de algunas cepas probióticas. Por ejemplo, Möndel *et al.* (2009) administraron el probiótico *E. coli* Nissle a individuos humanos sanos, encontrando un incremento del 78% de la β -defensina HBD-2 en heces. Gunaranjan *et al.* (2014) estudiaron el efecto de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* HN001 en la alimentación de ratas, obteniendo un incremento de β -defensinas en colon.

Estudios *in vitro* en cultivos de células Caco-2 sugieren que el aumento de la expresión del mRNA HBD-2 y la secreción de β -defensinas por ciertos *Lactobacillus* es regulada a través de la inducción de vías proinflamatorias incluyendo la vía MAP cinasas ERK (Mitogen-Activated Protein Kinases) por sus siglas en inglés. El factor nuclear (NF) κ B y la proteína activadora-1 (AP-1) son factores de transcripción también implicados (Schlee *et al.*, 2008; Ohland y Mac Naughton, 2010).

1.2.3. Modulación del sistema inmunológico

La evidencia sugiere que las bacterias probióticas en el lumen intestinal son reconocidas para su procesamiento por el sistema inmune a través de varias rutas. La adhesión de estos microorganismos a las células epiteliales a través de receptores TLR-2 induce la liberación de IL-6 de las células epiteliales intestinales. Los probióticos también pueden ser reconocidos e internalizados por las células dendríticas (DC) y células M de la placa de Peyer a través de receptores TLR-2 y/o TLR-4, incrementando el número de citocinas anti y proinflamatorias, así como los niveles de anticuerpos IgA (Mozzi *et al.*, 2010; Granier *et al.*, 2013).

1.2.3.1. Producción de citocinas

La interacción de algunos probióticos con el sistema inmunológico, ocasionan diferentes patrones de secreción de citocinas en el intestino, principalmente incrementos en el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), en el interferón gamma (IFN- γ), IL-12 e interleucina reguladora IL-10 (Mortaz *et al.*, 2013).

Koizumi *et al.* (2008) mostraron que el tratamiento con *Lactobacillus pentosus* a ratones, aumentó la actividad de las células NK a producir IFN- γ en el bazo, observando que este aumento fue dependiente de la IL-12 producida por DCs. Más tarde, Moreno *et al.* (2013) evaluaron la capacidad inmunomoduladora de la cepa *Lactobacillus paracasei* y *L. rhamnosus* en ratones, encontrando incrementos significativos en las concentraciones de IFN- γ e IL-10 en los fluidos intestinales. Estas observaciones sugieren que la administración de probióticos al inducir la producción de IFN- γ mejora la capacidad fagocítica de los macrófagos y la eficiente actividad por parte de las células NK ayuda a prevenir el desarrollo de enfermedades infecciosas y neoplásicas.

Adicionalmente, los probióticos tienen la capacidad de estimular a las células dendríticas y dirigir su maduración a la producción de IL-10, esta citosina promueve la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia la clasificación Th1 o T reguladoras activando el establecimiento del balance y tolerancia inmunológica (Granier *et al.*, 2013). Por ejemplo, en un estudio se determinó que algunas BL esféricas administradas en la dieta tienen diversos efectos

inmunomoduladores en la activación de células dendríticas plasmocitoides (pDC), producción de IFN- α , activación de células Th1 y NK (Jounai *et al.*, 2012).

1.2.3.2. Producción de IgA

Se ha propuesto que los probióticos ejercen un efecto benéfico al modular positivamente la respuesta a antígenos vía linfocitos B, promoviendo su maduración hacia células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, principalmente de tipo A.

Se ha reportado que el número de IgA secretora en la lámina propia del intestino delgado incrementa después de la administración de diferentes probióticos, tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* probablemente por la producción de IL-5 e IL-6 encontradas en dichos estudios (Maldonado y Perdigón, 2006).

Los probióticos también pueden incrementar el número de IgA en sitios distantes del intestino. Las células productoras de IgA migran de las placas de Peyer a los nódulos linfáticos mesentéricos y a la circulación general (Mozzi *et al.*, 2010). Por ejemplo, Martins *et al.* (2007) administraron un cultivo conteniendo *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* y *Bifidobacterium bifidum* a lechones recién nacidos durante 30 días, encontrando un aumento de IgA en suero y un mayor número de células que expresan IgA tanto en intestino delgado como en los ganglios linfáticos mesentéricos comparados con el grupo control.

1.2.4. Efectos Nutricionales

Los probióticos tienen la capacidad de intervenir en la digestión de algunos componentes de la dieta, mejorando su disponibilidad en la luz intestinal y asimilación en el hospedero, creando así, un efecto simbiótico entre ambos.

Gracias al aporte enzimático, las cepas probióticas contribuyen a mejorar la digestión de las proteínas transformándolas en polipéptidos y aminoácidos. Por otra parte, los azúcares de la dieta no absorbidos, son fermentados por las disacaridasas bacterianas, obteniendo como producto ácidos volátiles, principalmente acetato, propionato y butirato, los cuales son una fuente de energía para los enterocitos. Además, los ácidos volátiles promueven el crecimiento de las células epiteliales intestinales y controlan su proliferación y diferenciación (Eamonn, 2010).

Es reconocido que algunas cepas probióticas tienen la capacidad de hidrolizar la lactosa (Min-Tze, 2011). Por ejemplo, Casuccio *et al.* (2013) demostraron que la administración de *L. casei* Shirota y *Bifidobacterium breve* durante cuatro semanas mejoraron los síntomas en pacientes intolerantes y disminuyeron la producción de hidrógeno en el aliento (prueba actualmente usada para el diagnóstico de intolerancia a la lactosa en humanos).

También las grasas sufren una transformación por la enzima lipasa de los probióticos que las transforman en ácidos grasos y glicerol. La administración de bacterias lácticas a ratones y conejos tiene el efecto de disminuir los valores de colesterol plasmático, evidenciando la influencia sobre la absorción intestinal del colesterol endógeno o que deriva de la dieta (Cabrera y Fadragas, 2005).

Finalmente, el efecto sobre nutrientes también ocurre sobre las vitaminas, algunos cultivos de bacterias probióticas sintetizan vitaminas (K, B₂, B₅, B₉, B₁₂ y H), cuya actividad es útil para la función fisiológica del aparato gastrointestinal (Parra, 2010).

1.3. Uso de Probióticos en la producción animal

Los probióticos son útiles en las **producciones pecuarias** porque mejoran el bienestar de los animales, disminuyen los problemas de salud y, por ende, pueden aumentar la productividad; además de ser una alternativa biosegura para el consumidor y el medio ambiente (Sorrondogui *et al.*, 2012; Giraldo *et al.*, 2015).

En la **producción avícola**, Ramírez *et al.* (2005) estudiaron el efecto de la cepa *Lactobacillus* spp. con pollitas de remplazo hasta los 42 días de edad. Se comprobó que en el grupo donde se administró el probiótico, se produjo un aumento significativo de peso vivo promedio del 7,77%, una mejora del 14% en la conversión alimenticia, así como la reducción de la mortalidad en un 2,1%.

En otro experimento se utilizaron 308 pollos para engorda de un día de edad, las aves control y tratadas con la cepa *Bacillus cereus* var. Toyoi fueron desafiadas con un inóculo de 10^6 UFC de *Salmonella enterica* var. Enteritidis, encontrando un aumento en la ganancia diaria de peso (por 3.4 g), peso corporal (por 141 g) y conversión alimenticia (por -0.06 kg/kg) a los 42 días, así como una ausencia de *Salmonella enteritidis* en las aves suplementadas con el probiótico (Vilá *et al.*, 2009).

Los aditivos microbianos también constituyen una alternativa viable en la **alimentación del ganado vacuno**. Timmerman *et al.*, 2005 evaluaron el efecto de la suplementación de terneras con seis especies de *Lactobacillus* en la dieta, el uso de probióticos indujo incrementos en el peso final de (78.2 kg) frente al control (76.5 kg) y mejor conversión alimenticia a las ocho semanas después del tratamiento de (537 g/d) comparado con el control (507 g/d), también redujo la incidencia de diarreas, así como la necesidad de tratamientos terapéuticos contra enfermedades digestivas y respiratorias.

Lara y Cardona (2012) utilizaron una levadura nativa aislada del tracto gastrointestinal de bovinos con características probióticas, sobre los parámetros de ganancia de peso y producción de leche en ganado bovino de doble propósito, los resultados demostraron que no hubo diferencias en la ganancia de peso, mientras que para la producción de leche, se observó que ambos lotes experimentaron una disminución en la producción, sin embargo, el descenso en el grupo control fue mayor (1,74/L/día/animal) en comparación con el lote de prueba (0,56/L/día/animal) demostrando que el uso de levaduras influye positivamente en la producción de leche.

El uso de probióticos como **promotores de crecimiento en cerdos**, ha sido estudiado a través de los años. Por ejemplo, Di Giancamillo *et al.* (2008) encontraron que la administración de *Pediococcus acidilactici* en lechones influyó positivamente en el peso *post*-destete (22.03 Kg) frente al control (19.35 Kg) y en la ganancia de peso diario 425g en el grupo tratado y 406 g en el grupo control. Observándose en los estudios histológicos un aumento en la altura de microvellosidades, profundidad de criptas y una mayor proliferación de enterocitos en animales tratados. La presencia de Linfocitos T CD8 + intraepiteliales eran escasos en lechones con probióticos, llegando a la conclusión, de que la administración estudiada es capaz de proteger la mucosa del intestino delgado de lechones y la mejora de la resistencia local a las infecciones en períodos de estrés debido al destete. Otro ejemplo es el uso de la cepas *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* y *Saccharomyces cerevisiae* en cerdas gestantes durante tres semanas antes del parto y durante el periodo de lactancia. Los resultados obtenidos muestran que los probióticos administrados en la dieta de las cerdas, afectaron el peso de los lechones al nacimiento (1.49 kg) frente al control (1.37 kg), además se encontraron diferencias en la mortalidad de lechones relacionados con problemas gastrointestinales de 2.55% cuando se administraron probióticos y 7.41% en el grupo control, así como una disminución de la mortalidad de (2.48%) grupo testigo y (3.57%) grupo control (De la Torre y Aquiles, 2013).

1.4. Uso de probióticos a nivel de salud animal

En la salud animal los probióticos han sido utilizados en la prevención y el tratamiento de algunas patologías como la gastroenteritis y alergias. Actualmente la investigación se enfoca en el estudio de nuevos retos incluyendo el mantenimiento de las enfermedades cardiovasculares, obesidad y cáncer, que a pesar de su enfoque en humanos, parecen estar entre las nuevas herramientas prometedoras para el mantenimiento de la salud de las mascotas (Grzeskowiak *et al.*, 2015).

1.4.1. Gastroenteritis

La gastroenteritis es un trastorno frecuente en la práctica de pequeñas especies. Dentro de las causas se encuentran las prácticas de alimentación inadecuadas, microorganismos patógenos, sensibilidad a nutrientes específicos y algunos factores desconocidos. De acuerdo a los reportes, los probióticos parecen ser prometedores en el alivio de enfermedades gastrointestinales en animales de compañía. Herstad *et al.* (2010) realizaron un estudio con las cepas *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, las cuales fueron administradas a 36 perros con gastroenteritis aguda, reportando una disminución significativa en el tiempo de convalecencia de 2.2 días en el grupo control a 1.3 días en el grupo probiótico.

En otro estudio se examinó el efecto y la seguridad de los probióticos en equinos. Fueron utilizados 54 potrillos neonatos a los cuales se les administró una mezcla de cinco *Lactobacillus* aislados de caballos sanos (*L. salivarius* YIT 0479, *L. reuteri* YIT 0480, *L. crispatus* YIT 0481, *L. johnsonii* YIT 0482 y *L. equi* Yit 0483) a 27 potrillos (1 a 7 días de edad). El tratamiento con probióticos no causó efectos secundarios cénicos, ocasionando un aumento significativo ($P < 0.01$) en el peso corporal al mes de edad de los potrillos tratados (97.4 kg) y control (91.4 kg) y una insidencia significativa menor ($P < 0.05$) de diarrea (14.8%) en animales tratados y (51.99%) en el control durante las primeras tres semanas de edad (Yuyama *et al.*, 2004).

1.4.2. Alergias

La tolerancia oral es un fenómeno en el cual el sistema inmune logra diferenciar entre aquellos antígenos hacia los que debe generar una respuesta activa, como en el caso de microorganismos invasores, o bien una respuesta de tolerancia frente a antígenos alimentarios solubles, donde en esta última, no hay una respuesta inmunológica tanto a nivel de mucosas como de forma sistémica.

Se ha demostrado que la composición de la microbiota intestinal juega un rol importante en la modulación (ausencia o presencia) de la tolerancia oral, ya que se observó que la administración de varios antígenos alimentarios induce tolerancia en ratones convencionales, mas no así en ratones axénicos (libres de gérmenes). De tal forma que los probióticos pueden ayudar a reducir y aliviar los síntomas de alergias mediante la modulación del sistema inmune a través de la modificación de la microbiota intestinal. Kirjavainen *et al.* (2003) reportaron que la suplementación con *Lactobacillus rhamnosus* cepa GG (LGG) viables a 35 niños con edades alrededor de 5.5 meses con eczema atópico y alergia a la leche, encontrando que el tratamiento con probióticos aliviaron significativamente los síntomas como prurito, eczema atópico y síntomas gastrointestinales.

Tal como en humanos, los animales de compañía sufren una gran variedad de enfermedades alérgicas. Más tarde, en un estudio utilizando la misma cepa (LGG), donde el objetivo fue tratar o prevenir los signos clínicos causados por dermatitis atópica en perros con predisposición genética. El estudio reportó que la administración de LGG a cachorros disminuyeron significativamente el nivel de IgE en los primeros 6 meses de vida (Marsella, 2009; Marsella, 2012).

1.4.3. Obesidad

La homeostasis del colesterol celular es muy importante para la prevención de enfermedades cardiovasculares. Se ha observado que el consumo de lácteos fermentados tiene relación con la reducción de los niveles de colesterol en sangre en un 20 a 30% y 22 a 35% de triglicéridos, considerando que el consumo de probióticos puede disminuir la presentación de patologías tales como obesidad, aterosclerosis e infartos al miocardio (Bordoni, 2013). Basándose en los resultados de diferentes estudios, este fenómeno se explica por la unión del colesterol a las cepas probióticas y su posterior asimilación y la desconjugación de sales biliares mediante la producción de hidrolasas (Malago, 2011).

Stenman *et al.* (2015) realizaron un estudio utilizando la cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* 420, la cual fue administrada a un modelo de ratón obeso (C57BI/6J) durante 12 semanas, encontrando que la masa grasa corporal se incrementó (10.7 g) en los ratones obesos comparado con ratones control sanos (1.86 g), mientras que en el grupo probiótico se encontró una disminución (P=0.007) de la masa grasa de ratones obesos (7.83g), concluyendo que *B. animalis* podría tener potencial para prevenir el sobrepeso en animales con predisposición genética a la obesidad.

1.4.4. Cáncer

Hay un nuevo número de avances científicos que describen la habilidad de la microbiota del colon para generar una gran variedad de mutágenos, carcinógenos y promotores tumorales a partir de precursores endógenos y dietéticos. Uno de ellos, la enzima β -glucuronidasa cuya liberación en el colon es a partir de un gran número de carcinógenos de la dieta, incluyendo los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Se ha encontrado que las especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, tienen baja actividad de esta enzima implicada en la formación y metabolismo de carcinógenos hasta en un 50% menos, en comparación de otros anaerobios importantes en el intestino, tales como, *Streptococcus*, *Bacteroides*, y *Clostridium*, los cuales no solo tienen alta actividad de β -glucuronidasa, sino también están implicados en la patogénesis ocasionando necrosis de células epiteliales en pacientes con cáncer. Estos hallazgos sugieren que el aumento de la proporción de BL en el intestino podría modificar, de forma benéfica, los niveles de enzimas xenobióticas (Min-Tze, 2011; Mohammadi, 2013).

En otro estudio reciente se ha reportado la habilidad de cepas probióticas y sus compuestos solubles de interactuar directamente con las células tumorales e inhibir su crecimiento. Se ha demostrado que la administración de leche fermentada por *Lactobacillus casei* CRL 431 no solo disminuyó significativamente el crecimiento de cáncer de mama en ratones, sino también redujo la vascularización del mismo, la extravasación de células tumorales y la metástasis de pulmón (Aragón *et al.*, 2015).

1.5. Criterios para la evaluación de probióticos

En 2002, el grupo de trabajo FAO/OMS publicó un informe sobre los principios para la evaluación de los probióticos en los alimentos, cuya guía incluye los siguientes aspectos.

1.5.1. Identificación del género, especie y cepa

Es necesario conocer el género, la especie y cepa probiótica, ya que es importante vincular la cepa a un efecto de salud específico, así como, para permitir la vigilancia precisa y estudios epidemiológicos. Esta identificación se debe establecer utilizando una combinación de pruebas fenotípicas y genéticas.

1.5.2. Pruebas *in vitro* para detectar los probióticos potenciales

Dentro de estas pruebas se incluyen: a) la resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares, que constituyen condiciones limitantes para la sobrevivencia a través del tracto gastrointestinal, de lo contrario, los microorganismos probióticos no llegarían viables al intestino para ejercer su acción benéfica para la salud, b) la adherencia a la mucosa intestinal y a las células epiteliales, ya que se consideran propiedades que deben de poseer para ejercer sus mecanismos de acción, tales como efectos inmunomoduladores, reducción de la adhesión de la microbiota competitiva y actividad microbiana que favorezca el desplazamiento de microorganismos patógenos.

1.5.3. Seguridad de los probióticos

Los probióticos pueden ser teóricamente responsables de algunos efectos secundarios, los cuales abarcan infecciones sistémicas, actividad de deterioros metabólicos, exceso de estimulación inmunológica en individuos susceptibles y transferencia génica. Siendo estos, microorganismos vivos, se requieren pruebas para garantizar que la cepa probiótica es segura y sin contaminación en la forma de entrega (Marteau *et al.*, 2002).

Se recomienda que las cepas probióticas sean caracterizadas con las siguientes pruebas: Resistencia a los antibióticos, evaluación de actividades metabólicas perjudiciales, determinación de la producción de toxinas, capacidad hemolítica y ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos (FAO/OMS, 2002).

1.6. Bacterias Lácticas (BL)

Las bacterias lácticas son los microorganismos principalmente utilizados como probióticos. Este grupo de bacterias comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. En general, son cocos o bacilos gram-positivos, no esporulados, no móviles, microaerofílicos, ácido-tolerantes, oxidasa y catalasa negativos, las cuales generan ácido láctico como producto mayoritario final de la fermentación de carbohidratos. Las BL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas, así como también del tracto digestivo y vagina de mamíferos (Ramírez *et al.*, 2011).

Las BL comprenden dos familias, *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae*. La primera comprende los géneros *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*; mientras que la segunda, a los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. (Schleifer *et al.*, 1995; Ramírez *et al.*, 2011).

Se han descrito otros nuevos géneros relacionados filogenética y fisiológicamente con las especies de BL: *Atopobium*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Lactosphaera* y *Paralactobacillus* (Figura 3) (Schleifer *et al.*, 1995; Euzéby, 2002).

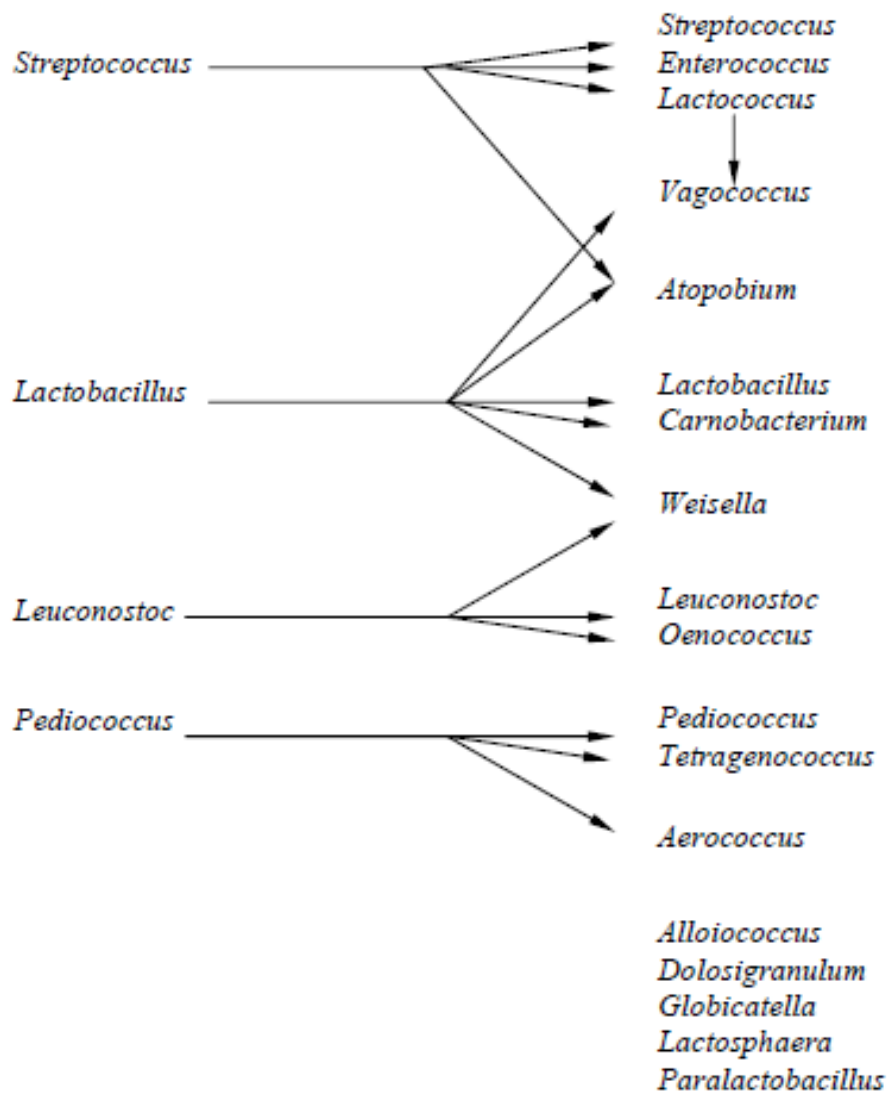


Figura 3 Cambios que se han producido en la clasificación de las bacterias lácticas. Fuente: Schleifer *et al.*, 1995; Euzéby, 2002.

1.6.1. Género *Pediococcus*

El género *Pediococcus* incluye las especies: *P. acidilactici*, *P. cellicola*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, y *P. stilesii*.

Este grupo de bacterias son gram positivas en forma de cocos. Su particularidad reside en la formación de tétradas debido al tipo de división celular observado, en dos direcciones de la misma (Charalampopoulos y Rastall, 2009).

1.6.1.1. *Pediococcus acidilactici*

El nombre de esta especie primero descrita del género *Pediococcus* indica claramente su capacidad para producir ácido láctico. Las cepas de esta especie, son en su mayoría aisladas de material vegetal (forraje, cereales, purés de papas, cebada y malta), pero algunas cepas se han aislado también de los productos cárnicos. Produce los dos isómeros: D (-) y L (+) del ácido láctico a partir de glucosa y otros hidratos de carbono (Llorente, 1998). Aunque algunas cepas no presentan el gen que codifica para la *pediocina*, se sabe que son capaces de producir bioconservación. Se ha reconocido que la cepa ATCC 8042 produce enzimas proteolíticas y peptidoglicano hidrolasas con actividad inhibitoria sobre otros microorganismos (Llorente, 2008).

1.6.2. Género *Lactobacillus*

Los lactobacilos son bacterias gram-positivas que forman parte de la microbiota bacteriana humana y animal. Son bacterias no móviles, incapaces de esporular, morfológicamente son bacilos de longitud variable de largo a corto y tienden a crecer en formación de cadenas.

Algunos cultivos de *Lactobacillus* se han utilizado como probióticos incluyendo las especies de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* (Slover y Danzinger, 2008).

1.6.2.1. *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum es la especie más importante y versátil del grupo, se puede encontrar como parte de la microbiota de los alimentos ricos en almidón, cereales, carnes, productos lácteos, verduras, frutas y bebidas. Las cepas aisladas de estos alimentos han demostrado ser capaces de sobrevivir a través del tracto gástrico y colonizar el intestino de los seres humanos y animales. *L. plantarum* se ha utilizado tradicionalmente en cultivos iniciadores en fermentaciones de alimentos y también como un ingrediente para alimentos probióticos (Sabo *et al.*, 2014).

1.7. Condiciones de tracto gastrointestinal en animales no rumiantes

La principal función del tubo digestivo de los animales es garantizar la digestión y absorción de nutrientes, para esto los alimentos sufren una serie de transformaciones físicas y químicas. En este apartado se mencionarán las condiciones químicas presentes en el tracto gástrico e intestinal.

1.7.1. Condiciones gástricas

El jugo gástrico representa la secreción total de las células epiteliales superficiales y de las glándulas cardiales, peptídicas y pilóricas del estómago. Es un fluido constituido por dos componentes: una secreción ácida de las células parietales y una secreción alcalina, de las células principales que contiene pepsinógeno, mucina y electrolitos. El jugo gástrico puro puede tener un pH de 1.0 que al mezclarse con mucinas y bicarbonato se obtiene un valor cercano a 2.5.

La pepsina es la principal enzima proteolítica secretada por el estómago como un precursor inactivo, el pepsinógeno. El ácido clorhídrico causa la conversión autocatalítica del pepsinógeno a pepsina (enzima activa) a valores del pH entre 5.0 y 6.0 (Shimada y Reiteria 2010; Karasov y Douglas 2013).

1.7.2. Condiciones intestinales

Una de las funciones del intestino es producir cantidades significativas de secreciones para ayudar a neutralizar el contenido gástrico (quimo) a medida que va entrando en el duodeno otra función es la lubricación del quimo conforme este se mueve a las partes posteriores del intestino. La secreción producida por las glándulas de Brunner de los enterocitos localizadas en la pared intestinal, es un fluido mucoso con un pH entre 7.0 y 8.0 con propiedades enzimáticas y presencia de electrolitos como el sodio, cloruro y bicarbonato.

El jugo pancreático liberado en el duodeno es un fluido alcalino constituido por una fase acuosa que en muchos animales contiene una alta concentración de bicarbonato, y una fase orgánica en las que se encuentran las enzimas pancreáticas: proteasas, lipasas, nucleasas y α -amilasa.

La bilis secretada por los conductos hepáticos es un líquido verdoso, sus constituyentes principales son las sales de los ácidos biliares y los pigmentos biliares, trazas de colesterol, lecitinas, electrolitos y proteínas. La principal acción de las sales biliares se ejerce a través de su efecto hidrotópico, combinándose con los lípidos para formar micelas, complejos hidrosolubles donde los lípidos pueden ser absorbidos más fácilmente (Shimada 2010; Karasov y Douglas 2013).

1.8. Mantenimiento y protección de probióticos

Los efectos benéficos de las bacterias probióticas dependen de la viabilidad de las células en el intestino. Las células tienden a perder su viabilidad con el tiempo durante el almacenamiento y a través del tracto gastrointestinal, siendo incapaces de adherirse al colon y ejercer sus efectos beneficiosos, es por esto que se debe conferir algún grado de protección. Como una solución a este problema, los probióticos se han desarrollado en formas sólidas liofilizadas que tienen una vida útil más larga sin necesidad de refrigeración, así como también es altamente utilizada la microencapsulación de cepas, lo que los hace más convenientes para su administración (Min-Tze, 2011).

1.8.1. Liofilización de bacterias probióticas

La liofilización es el proceso que consiste en la deshidratación por congelación y sublimación, en donde el contenido líquido natural de los sistemas biológicos se congela y se elimina en forma de vapor, bajo condiciones controladas de presión y temperatura. La descripción del proceso incluye la preparación y congelación de la muestra, secado primario, secado secundario y sellado de la muestra seca (Day *et al.*, 2007).

La liofilización es la técnica frecuentemente utilizada para la preservación de microorganismos a largo plazo (Carvalho *et al.*, 2003), sin embargo, ésta técnica puede conducir a daño celular y la disminución de la viabilidad debido a los cambios de temperatura y deshidratación, lo que podría dañar la pared celular, membranas celulares, ribosomas y el ADN de las cepas probióticas. Para prevenir estos efectos adversos, se han utilizado diversas sustancias crioprotectoras comúnmente adicionadas a las muestras antes de la liofilización (Min-Tze, 2011; Khoramnia *et al.*, 2011).

Se ha reportado que la leche descremada, sucrosa y lactosa son crioprotectores efectivos (Hubalek, 2003). Por ejemplo Khoramnia (2011) estudió el efecto de diferentes crioprotectores sobre la viabilidad de la cepa probiótica *Lactobacillus reuteri* para su utilización en pollos, la combinación de leche descremada al 19.5%, 1% de sucrosa y 9% de lactosa optimizó la sobrevivencia de la cepa liofilizada y almacenada a 4° y 30° por seis meses, con una viabilidad del 96.4% y 73.8%, respectivamente.

1.8.2. Microencapsulación de probióticos

La encapsulación, es definida como la tecnología de empaquetamiento de sólidos, líquidos y gases con materiales de recubrimiento de distinta naturaleza, para dar lugar a cápsulas que pueden liberar su contenido de manera controlada bajo la influencia de condiciones específicas. Dado el tamaño de los microorganismos probióticos (1-5 μm), la técnica aplicada es la microencapsulación (Rokka y Rantamäki, 2010). Las microcápsulas se producen utilizando diversos materiales y métodos que son descritos a continuación.

1.8.2.1. Materiales utilizados en la microencapsulación

Los materiales de protección son utilizados durante la microencapsulación, para aumentar la viabilidad y la supervivencia de las bacterias en la liofilización, almacenamiento y subsecuentemente en el tracto gastrointestinal. Los materiales comúnmente usados incluyen a los biopolímeros y prebióticos (Charalampopoulos y Rastall, 2009).

1.8.2.1.1. Biopolímeros

Los biopolímeros aplicados deben ser biocompatibles y no tóxicos para las células. Los más utilizados incluyen el alginato de sodio, chitosan, gelatinas, proteínas de suero de leche, derivados de celulosa y maltodextrinas (Pérez *et al.*, 2013).

El alginato de sodio es un polisacárido aniónico obtenido de las algas marinas (Avendaño *et al.*, 2013). En cuanto a su composición química, es un polímero lineal formado por dos unidades monoméricas, el ácido β -D-manurónico (**M**) y el ácido α -L-gulurónico (**G**).

Una de las habilidades del alginato es la formación de geles a partir de una serie de reacciones químicas de intercambio iónico debido a la formación de enlaces entre las cadenas del polímero; particularmente se realiza un intercambio de iones sodio por iones de calcio dando lugar al modelo de gelificación llamado “caja de huevo”, siendo esta característica ideal para la formación de capsulas. (Figura 4) (Ayaviri y Bustamante, 2013).

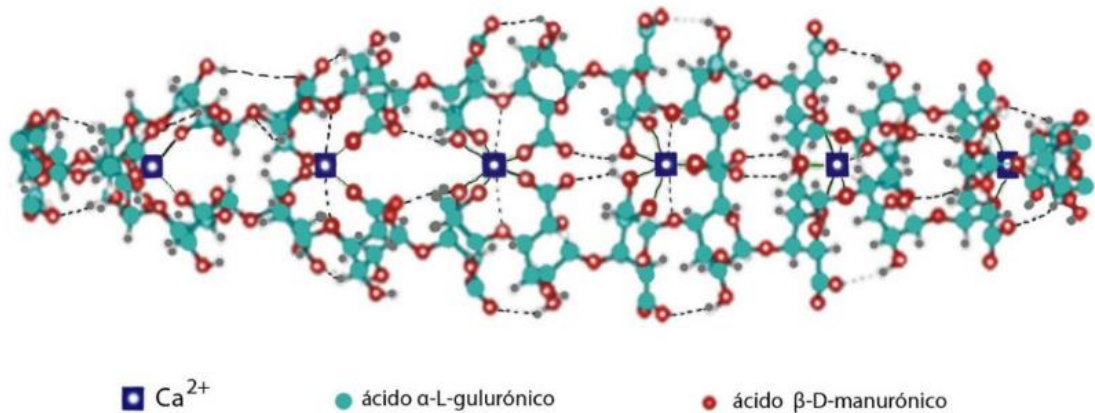


Figura 4 Modelo de gelificación “caja de huevo” que describe la estructura del alginato.
Fuente: Adaptado de Reddy y Reddy 2010.

1.8.2.1.2. Prebióticos

Los prebióticos se definen como “ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o metabolismo de las bacterias benéficas en el intestino” (Maldonado, 2014). Los prebióticos comúnmente utilizados incluyen la inulina, fructo-oligosacáridos (FOS) y galacto-oligosacáridos (GOS), sin embargo, algunos otros ingredientes han mostrado eficacia prebiótica como soya-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, pirodextrinas, lactulosa, goma arábiga y almidones (Charalampopoulos y Rastall, 2009; Calame *et al.*, 2008).

La adición de prebióticos en la encapsulación de microorganismos probióticos, puede favorecer la viabilidad y acción de estos microorganismos benéficos en el tracto gastrointestinal. Algunos autores han reportado, que la encapsulación con prebióticos puede mejorar la funcionalidad del microorganismo inmovilizado, generando mayores recuentos comparado con la encapsulación sin prebióticos (Iyer y Kailasapathy, 2006).

1.8.2.2. Métodos utilizados para la microencapsulación

Entre las metodologías empleadas con éxito en la microencapsulación de probióticos se encuentran la emulsión y extrusión, ya que estas técnicas, permiten que las bacterias se encuentren protegidas al ambiente del alimento, así como a las condiciones de tracto gástrico e intestinal.

La técnica de emulsión, se define como un proceso de dispersión de un líquido en un segundo líquido inmiscible. Esta metodología aplicada a los microorganismos probióticos se desarrolla de la siguiente manera: un pequeño volumen de una solución con células microbianas en suspensión (fase discontinua) es añadido a un volumen mayor de aceite vegetal (fase continua) y la mezcla es homogenizada hasta formar una emulsión de agua en aceite. Una vez que la emulsión se ha formado, el polímero hidrosoluble es insolubilizado para formar las cápsulas dentro de la fase oleosa (Figura 5). El tamaño de las cápsulas resultantes puede variar de 20 μm a 2 mm (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

La extrusión es una técnica ampliamente utilizada en la encapsulación de probióticos, debido a su simplicidad, bajo costo, no emplea disolventes perjudiciales para las bacterias y se puede producir a gran escala. La técnica consiste en, producir pequeñas gotas de material encapsulado forzando el paso de una solución a través de una aguja de jeringa o de una boquilla en los dispositivos generadores de goteo. En ésta técnica los microorganismos son adicionados a una solución hidrocoloide y esta suspensión se hace gotear sobre una solución de endurecimiento, la cual va a variar dependiendo del material empleado (Figura 5). El tamaño obtenido de las cápsulas suele abarcar de 2-4 mm (De Vos *et al.*, 2010).

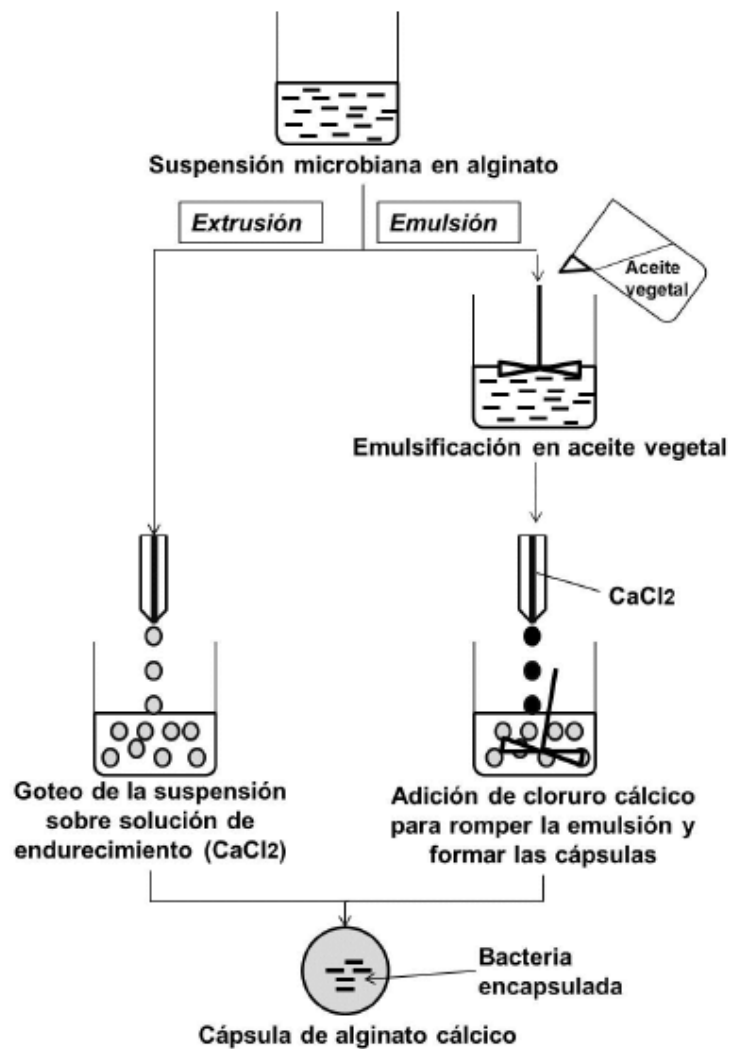


Figura 5 Diagrama de flujo de la microencapsulación de bacterias mediante las técnicas de extrusión y emulsión con el uso de alginato (adaptado de Krasaekoopt *et al.*, 2002).

CAPÍTULO 2

1 **Desarrollo y caracterización de un sistema de microcápsulas con alginato y goma**
2 **arábiga para su utilización como soportes de probióticos**

3
4 I. Sandoval Mosqueda, J.F. Montiel Sosa, L. Corona Gochi, Z. Guadarrama Álvarez, A.
5 Llorente Bousquets.

6 Laboratorio de Bioconservación, Unidad de Investigación Multidisciplinaria. Facultad de
7 Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. km 2.5
8 carretera Cuautitlán-Teoloyucan. San Sebastián Xhala s/n, Cuautitlán Izcalli, México.
9 llorente@unam.mx

10

11 Artículo elaborado de acuerdo a la guía de autores de la Revista Journal of
12 microencapsulation JCR Factor de impacto 1.585

13

14 **Resumen**

15 Los polímeros naturales utilizados como materiales de soportes en la tecnología de
16 microencapsulación han mostrado las ventajas de ser biocompatibles, biodegradables y no
17 tóxicos para las células. El objetivo de este trabajo fue desarrollar la formación de un sistema
18 de microcápsulas con el uso de alginato y goma arábica. Se evaluaron los parámetros de
19 perfil de textura (TPA), así como sus características microscópicas del sistema mediante
20 extrusión. El desarrollo de dispersiones coloidales de alginato y goma arábica al 1 y 2%
21 respectivamente, en la formación de los extruidos, presentaron una alta interacción entre sus
22 componentes, verificado mediante evaluación reológica, donde la dureza en el TPA de los
23 extruidos fue mayor con el uso de alginato solo (6.95 ± 0.98) y en combinación con goma
24 arábica al 2% (7.12 ± 0.71). Los extruidos formados con alginato 2% solo y en combinación
25 de arábica al 1 y 2% mantuvieron su integridad al final del proceso de liofilización. La
26 observación mediante microscopía electrónica de barrido demostró que la concentración de
27 alginato 2%/arábiga 2% permitieron la formación de extruidos liofilizados más estables
28 (esféricos) y con menor irregularidad en su superficie.

29

30 **Palabras clave:** Alginato de Sodio, Goma arábica, Liofilización, Extrusión

31 **1. Introducción**

32 El alginato de sodio y la goma arábica son polisacáridos aniónicos que debido a sus
33 características y su biocompatibilidad, han tenido numerosas aplicaciones en la industria de
34 alimentos y en la elaboración de productos farmacéuticos (Rinaudo, 2008; Laurienzo, *et al.*,
35 2015).

36 El alginato de sodio es un polisacárido lineal compuesto por monómeros de ácido β -D-
37 manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G), los cuales pueden encontrarse agrupados en
38 cadenas de bloques M o G (homopolímeros) y MG (heteropolímeros). Este polímero tiene la
39 capacidad de formar geles insolubles en presencia de iones divalentes de calcio, donde el ion
40 cálcico forma puentes entre los grupos carboxilos de las cadenas del ácido gulurónico,
41 favoreciendo la formación de redes, denominando a esta reacción, gelificación iónica (Young
42 Lee y Mooney, 2012).

43

44 La goma arábica es un polisacárido ramificado obtenido como un exudado natural de los
45 árboles de Acacia. Químicamente está compuesto por unidades de D-galactosa, L-arabinosa,
46 L-ramnosa, ácido-D-gulurónico y como parte integral a su estructura contiene fracciones
47 variables de proteínas, que debido a su carácter anfifílico le permite actuar como agente
48 emulsificante y estabilizador de alimentos. Otra característica conocida es su capacidad de
49 asociación con otros polisacáridos en dispersiones acuosas, las más importantes son
50 asociaciones mediadas por iones, formación de puentes de hidrógeno e interacciones
51 electrostáticas (Montenegro *et al.*, 2012).

52

53 La microencapsulación es la tecnología de empaquetamiento de diferentes materiales para
54 protegerlos de situaciones adversas y su posterior liberación bajo condiciones controladas
55 (Rokka y Rantamäki, 2010). La técnica de extrusión ha sido ampliamente utilizada en la
56 microencapsulación de alimentos. Esta técnica consiste en la formación de gotas de la
57 dispersión de alginato de sodio y el componente a encapsular, al forzar su paso a través de
58 una aguja de jeringa o una boquilla en los dispositivos generadores de goteo, sobre una
59 solución de calcio (Lupo, 2012).

60 Para esta investigación, la combinación de los polímeros alginato de sodio y la goma arábica
61 fue utilizada para desarrollar la formación de microcápsulas, así como determinar las mejores
62 concentraciones de biopolímeros en la formación del sistema para su futura aplicación en
63 cepas probióticas.

64

65 **2. Materiales y métodos**

66 **2.1. Elaboración del sistema extruido con alginato de sodio**

67 La formación del sistema extruido fue realizada de acuerdo con la metodología descrita por
68 Krasaekoopt (2004). Para determinar la concentración de alginato a utilizar en este trabajo,
69 se prepararon tres dispersiones de alginato al 1, 2 y 3%. Un mL de cada solución fue extruido
70 a través de una aguja con un diámetro de 0.5 mm en 10 mL de una solución de CaCl₂ al 0.05
71 M durante 30 minutos para permitir su completa gelificación, posteriormente las perlas
72 fueron recuperadas por decantación, para determinar el número de perlas por mL, así como
73 el tamaño y la forma bajo observación en microscopio óptico.

74 **2.2. Liofilización de extruidos**

75 Los extruidos formados con alginato en diferentes concentraciones fueron congelados
76 (REVCO Ultima II, Thermo electron Co.) (USA) a -50°C durante 24 h y posteriormente
77 liofilizados en una liofilizadora LABCONCO, Freezone 4.5 (KC, USA) con una temperatura
78 del condensador de -50°C y una presión de 0.07 mBar durante 24 h. La morfología de las
79 perlas fue evaluada bajo microscopio óptico y el tamaño de las perlas con ayuda de un
80 vernier.

81 **2.3. Reconstitución de las microcápsulas**

82 La disolución de los extruidos liofilizados de alginato, se realizó de acuerdo con la
83 metodología descrita por Sheu y Marshall (1991) con algunas modificaciones, ya que en
84 lugar de disolver en 10 ml de PBS (solución buffer fosfatos) pH 7.4, las microcápsulas
85 obtenidas de cada muestra de 1 mL de extruido, se resuspendieron en 50 mL y se colocaron
86 en agitación orbital (IKA KS 260 basic) durante dos ciclos de 45 min a 100rpm, a temperatura
87 ambiente, hasta permitir la completa desintegración.

88 **2.4. Uso de la goma arábica en la formación del sistema**

89 Se hicieron dispersiones coloidales de alginato al 2% como control y adicionadas con goma
90 arábica (1, 2, 3 y 4%) para obtener cinco formulaciones diferentes. Para formar los extruidos,
91 10 mL de cada formulación fueron extruidos y recibidos en 50 mL de CaCl₂ por 30 min, para
92 permitir su gelificación. Los extruidos fueron recuperados por decantación y colocados en
93 cajas Petri para su evaluación de análisis de perfil de textura, así como la determinación del
94 número, tamaño de perlas por mL y su morfología y en microscopio óptico.

95 **2.5. Análisis de perfil de textura (TPA) de los extruidos**

96 Como criterio para la elección de los tratamientos utilizados en este experimento fueron
97 evaluadas los parámetros de perfil de textura de las diferentes formulaciones utilizando un
98 texturómetro (Shimadzu EZ-S 200N) con una velocidad de 50 mm/min y 2 mm de
99 compresión. Se determinaron las características mecánicas de dureza (fuerza máxima en el
100 primer ciclo de compresión), cohesividad (relación entre el área positiva durante la segunda
101 compresión, entre la primera) y elasticidad (recuperación de la muestra a su tamaño original
102 en el periodo de tiempo entre la primera y la segunda compresión).

103 Tomando en cuenta que los valores mayores de dureza de las microcápsulas se obtuvieron
104 de la formulación de alginato al 2% y que al adicionar goma arábica, los valores disminuyen,
105 se utilizó la formulación que permitió valores similares de dureza, la cual correspondió a la
106 formulación de alginato 2% y goma arábica 2%.

107 **2.6. Observación de las microcápsulas por microscopía electrónica de barrido**
108 **(MEB)**

109 Las microcápsulas de alginato 2% y de alginato-goma arábica 2% liofilizadas, fueron
110 examinadas por MEB, previamente fijadas y cubiertas con oro durante 300s a 7 mAmp
111 utilizando una ionizadora de oro (Desk V, Denton Vacuum, USA). Las características
112 morfológicas fueron evaluadas a diferentes aumentos (45x y 250x) y se establecieron
113 mediciones de sus ejes con un microscopio electrónico de barrido (Modelo JSM-6010LA,
114 JEOL USA) a 10 kV.

115

116 **3. Análisis estadístico**

117 Las perlas de cada tratamiento fueron evaluadas por triplicado para cada uno de los
118 parámetros y se obtuvieron las medias y desviaciones estándar de los resultados. Fue
119 utilizado un análisis de varianza (ANOVA) de acuerdo con un diseño completamente al azar.
120 Adicionalmente se aplicó prueba de Tukey con un nivel de significancia de ($P < 0.05$) usando
121 el paquete estadístico Minitab 16.

122 **4. Resultados y discusión**

123 **4.1. Elaboración del sistema mediante extrusión de alginato de sodio**

124 La concentración de alginato de sodio al 2% permitió tras su extrusión, un mayor número de
125 perlas (98 ± 4.1) comparado con la de alginato al 1% (88 ± 3.21) con un tiempo de extrusión
126 entre 1.3 y 1.4 minutos respectivamente. El tamaño de los extruidos fue 2 ± 0.1 mm utilizando
127 alginato al 2% y 2.2 ± 0.13 mm con alginato al 1% (Cuadro 1). Al utilizar alginato al 3% se
128 formó un gel altamente viscoso, dificultando la extrusión y resultando en extruidos con forma
129 irregular.

130 **Cuadro 1** Elaboración del sistema de extrusión con alginato de sodio

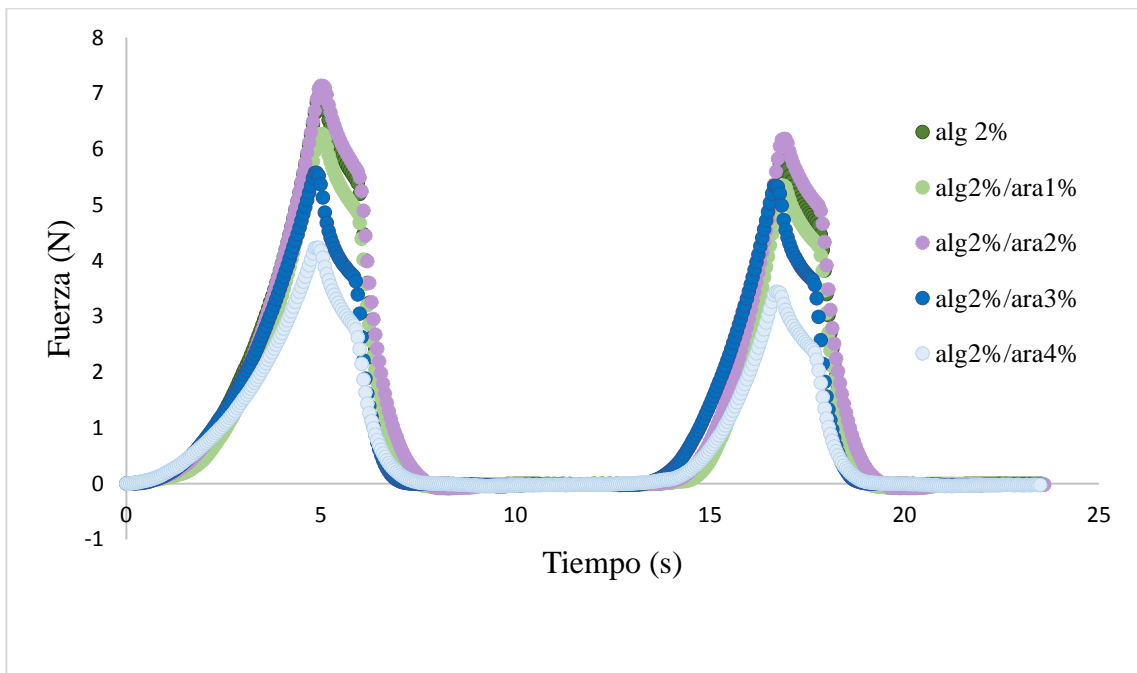
Alginato Na	Número perlas (mL)	Tamaño perla (mm)	Tiempo extrusión (mL /min)	Tamaño de perlas liofilizadas (mm)
1 %	88 ± 3.21	2.2 ± 0.13	1.3 ± 0.03	$1.2 \pm 0,05$
2 %	98 ± 4.1	2 ± 0.1	1.4 ± 0.02	$1.1 \pm 0,03$
3 %	Muy viscosa	-	-	-

131

132 **4.2. Análisis de Perfil de Textura de perlas extruidas**

133 Los perfiles de textura obtenidos para cada uno de los niveles se observan en la gráfica de
134 fuerza contra tiempo (Figura 6) la cual describe la respuesta de cada nivel a la doble
135 compresión durante la prueba. En general, se observa que el sistema en sus diferentes niveles
136 presenta alta cohesividad y elasticidad, debido a la semejanza del valor del área bajo la curva
137 de los dos ciclos de compresión.

138 En el cuadro 2, se observa que la dureza (fuerza máxima en el primer ciclo de compresión)
139 fue mayor para los extruidos con el uso de alginato solo (6.95 ± 0.98) y en combinación con
140 goma arábica al 2% (7.12 ± 0.71). Por otra parte, el uso de alginato2%/arábica4% presentó la
141 menor dureza (3.96 ± 1.20), la cual fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Resultados
142 similares fueron reportados por Zamora *et al.* (2012), donde la dureza de geles formados con
143 alginato de sodio fue mayor (9.2 N) y con la adición de otros hidrocoloides, la fuerza tiende
144 a disminuir (6.17 N), formando geles blandos debido a que no existe una fuerte interacción
145 molecular entre sus constituyentes.



146

147 **Figura 6** Análisis de perfil de textura de los extruidos con alginato al 2% y goma arábica a
148 diferentes niveles

149

150

151

152

153

Cuadro 2 Parámetros texturales de los extruidos

Niveles	Dureza (N)	Cohesividad (-)	Elasticidad
Alg2%	6.95±0.98 ^a	0.83±0.03 ^a	0.99±0.00 ^a
Alg2%/ara1%	6.56±0.49 ^{ab}	0.82±0.01 ^a	0.99±0.00 ^a
Alg2%/ara2%	7.12±0.71 ^a	0.81±0.02 ^a	0.99±0.00 ^a
Alg2%/ara3%	4.52±1.60 ^{ab}	0.88±0.01 ^a	1.00±0.00 ^a
Alg2%/ara4%	3.96±1.20 ^b	0.89±0.02 ^a	1.00±0.00 ^a

155

156 Se estudió la cohesividad como otro parámetro de textura, la cual representa el límite hasta
 157 el cual se puede deformar la muestra antes de romperse. Se pudo observar a través del análisis
 158 estadístico que al preparar extruidos de alginato 2% solo y en combinación de goma arábica
 159 con diferentes concentraciones, sus valores medios de cohesividad no mostraron diferencia
 160 ($P<0.05$).

161 En cuanto a la elasticidad, se puede observar que no existe diferencia ($P<0.05$) a pesar del
 162 aumento en la concentración de la goma arábica y que esta elasticidad es alta (0.99-1.00), lo
 163 que significa que las muestras regresan a su forma original después de que la fuerza que actúa
 164 sobre ellas ha sido eliminada. Tomando en cuenta que los valores de referencia para la
 165 elasticidad se encuentran entre 0 y 1, en este sentido, cuando una muestra posee una alta
 166 elasticidad, parece describir una textura gomosa, mientras que cuando los valores de
 167 elasticidad son bajos corresponde a una textura de tipo quebradiza.

168 **4.3. Evaluación de las perlas de alginato/goma arábica antes y después de la** 169 **liofilización**

170 Las dispersiones de alginato/goma arábica, tras la extrusión, evidenciaron que al aumentar la
 171 concentración de esta última, disminuye el número de perlas por mL de extruido (Cuadro 3).

172 El tamaño de las microcápsulas (perlas) fueron menores ($P<0.05$) para alginato 2% (1.9 ± 0.1
 173 mm) respecto a alginato 2%/goma arábica 4% (2.2 ± 0.1 mm).

174 Esta misma técnica de extrusión fue utilizada por Krasaekoopt *et al.* (2003), Ross y Gusils
 175 (2008) y Lee y Heo (2010) obteniendo resultados similares en cuanto al tamaño de los

176 extruidos con el uso de alginato (1.03 a 2.62 mm), reportando que el diámetro de la aguja y
 177 la concentración del alginato son los factores que afectan su tamaño.

178

179 **Cuadro 3** Sistema extruido con alginato y goma arábica en diferentes concentraciones

Tratamiento	Número perlas (mL)	Tamaño perla (mm)	Tamaño perlas Liofilizadas (mm)
Alginato 2%	103 ± 7.2 ^a	1.9 ± 0.1 ^b	1.1 ± 0.10 ^a
Alg 2%/arábica 1%	100 ± 10.5 ^a	2.2 ± 0.1 ^{ab}	1.3 ± 0.07 ^b
Alg 2%/arábica 2%	96 ± 5.7 ^a	2.2 ± 0.2 ^{ab}	1.7 ± 0.21 ^b
Alg 2%/arábica 3%	91 ± 2.2 ^{ab}	2 ± 0.5 ^{ab}	-
Alg 2%/arábica 4%	80 ± 3.9 ^b	2.2 ± 0.1 ^a	-

180 ^{abc} letras diferentes en la misma columna muestran diferencia significativa (P<0.05)

181

182 Por otra parte, las medias de los diámetros de los extruidos liofilizados fueron menores
 183 (P<0.5) para alginato al 2% (1.1±0.10mm) en comparación con alginato2%/goma arábica1%
 184 (1.3±0.07mm) y alginato 2%/goma arábica 2% (1.7±0.21mm). Al final del proceso de
 185 liofilización los extruidos de alginato 2%-goma arábica 3 y 4%, perdieron su integridad,
 186 demostrando una inestabilidad en el sistema, por lo que se decidió no trabajar con estas
 187 formulaciones.

188

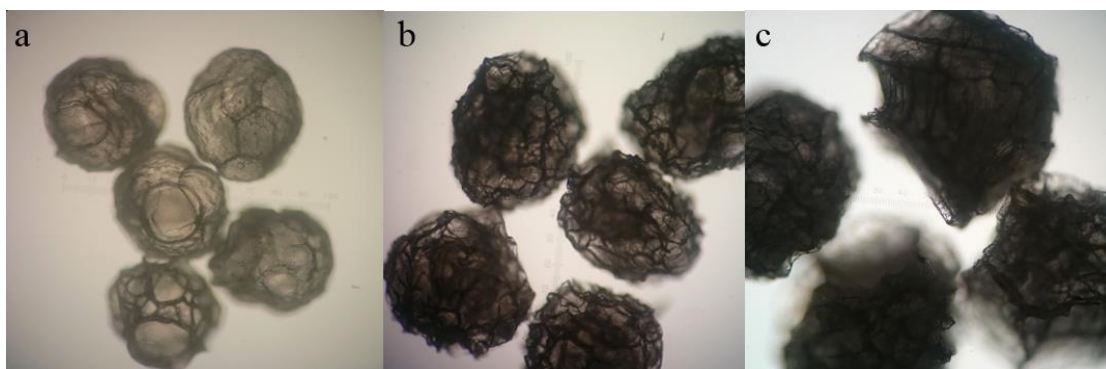
189 Finalmente, la observación de los extruidos en microscopio óptico muestra una morfología
 190 esférica con superficies irregulares en todos los tratamientos (Figura 7). Se pudo observar
 191 que las microcápsulas formadas con alginato 2% presentaron vacuolas de mayor tamaño en
 192 su estructura (Figura 7a), mientras que con la adición de goma arábica estas vacuolas fueron
 193 de menor tamaño y mayor cantidad (Figuras 7b y 7c). Está reportado que la formación de
 194 vacuolas, abolladuras y depresiones en microcápsulas, puede deberse a la composición

195 química y estructural de los materiales utilizados y a las condiciones de secado durante la
196 formación de las cápsulas (Sheu y Rosenberg, 1998).

197

198 El tamaño uniforme y la alta esfericidad de las microcápsulas obtenidas fue posible mediante
199 el control de las variables del proceso de gelificación iónica: concentración de hidrocoloides,
200 tamaño de orificio de goteo, tiempo y distancia de caída de la gota, así como del tiempo de
201 permanencia en la solución de CaCl_2 , lo que coincide con Pujiang *et al.* (2011), quienes
202 resaltan que la obtención de un sistema similar a este, con forma y tamaño homogéneo,
203 guarda importancia para facilitar su manipulación y aplicación en alimentos.

204



205

Figura 7 Morfología de extruidos liofilizados en microscopio óptico

206

207 a) alginato2%, b) alginato2%/goma arábica1%, c) alginato2%/goma arábica2%

208

209 **4.4. Morfología de los extruidos liofilizados por microscopía electrónica de barrido** 210 **(MEB)**

211 La liofilización de las microcápsulas facilitó la preparación de las muestras para su
212 observación al MEB, en donde fue posible observar la microestructura y superficie de cada
213 una de ellas. Las de alginato 2%, se mostraron colapsadas con forma elíptica y ejes de
214 $1.18 \pm 0.15 \text{mm}$ y $1.62 \pm 0.24 \text{mm}$ (Figura 8a), mientras que las de alginato 2%/goma arábica
215 2%, fueron compactas y esféricas con ejes de $1.75 \pm 0.12 \text{mm}$ y $1.73 \pm 0.13 \text{mm}$ (Figura 8b). Los
216 aumentos utilizados para la observación permitieron la medición de los ejes de las formas
217 elípticas y esféricas obtenidas con cada formulación.

218

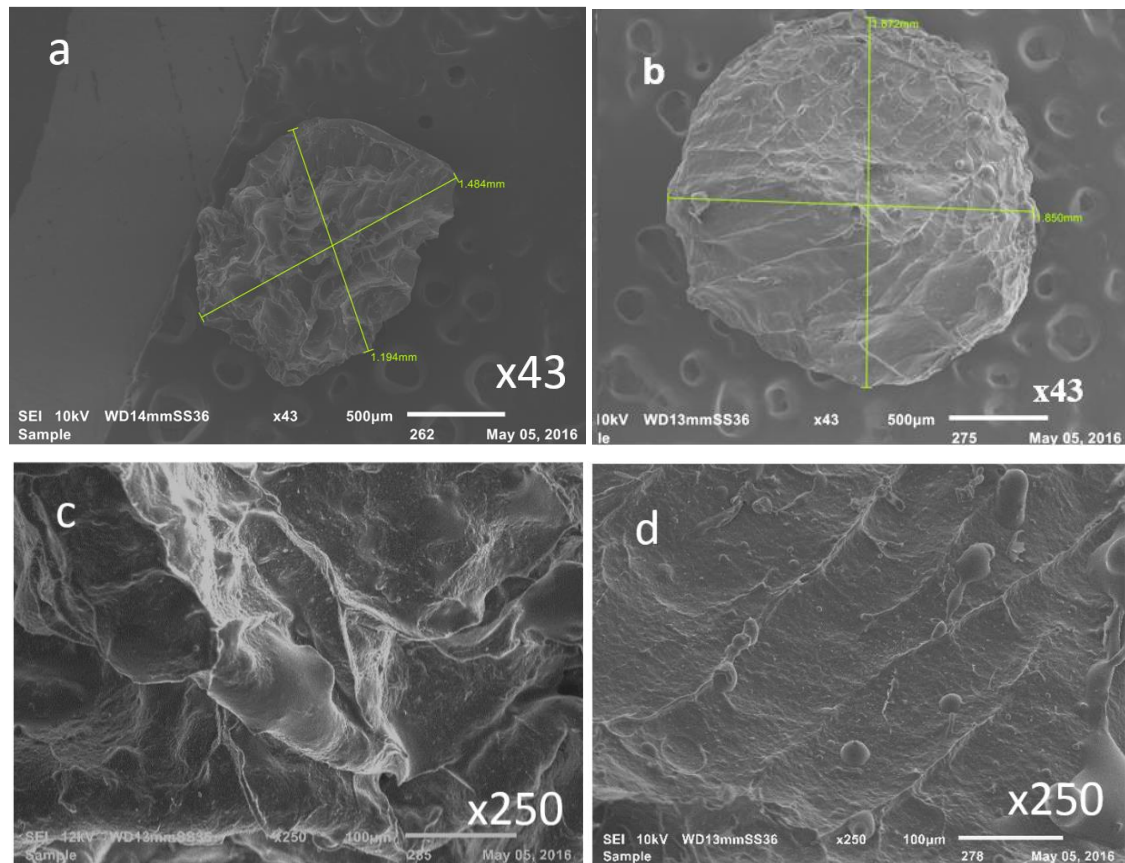
219 Adicionalmente se midieron estos ejes con el mismo equipo y se evaluaron los resultados
220 mediante ANOVA y Tukey, demostrando que la combinación alginato/goma arábica (2/2%)
221 desarrollaron estructuras más estables (esféricas), cuyas superficies presentaron menos
222 irregularidades y oquedades (Figura 8d) respecto de aquellos de alginato solo (Figura 8c).

223

224 La presencia de arrugas y grietas en la superficie de las microcápsulas formadas con alginato
225 solo, pueden ser causadas por el colapso de la red tridimensional del gel polimérico durante
226 el proceso de secado (Pasparakis y Bouropoulos, 2005). Donthidi (2010) obtuvo resultados
227 similares al utilizar alginato, sin embargo las dispersiones extruidos de diferentes polímeros,
228 le permitieron sistemas más estables, concluyendo que la morfología depende del tipo de
229 componentes así como de su concentración.

230

231 La homogeneidad mostrada en las microcápsulas de alginato/goma arábica puede ser
232 explicada por una interacción entre estos dos polímeros, ya que durante el proceso de
233 gelificación de los extruidos, los polisacáridos expuestos a los cationes divalentes de la
234 solución de CaCl_2 , favorecieron una interacción iónica electrostática entre los cationes de
235 calcio cargados positivamente y los grupos carboxilos de los polímeros aniónicos, alginato y
236 goma arábica, cargados negativamente, demostrado por Nayak *et al.* (2012).



238 **Figura 8** Imágenes de MEB de microcápsulas liofilizadas. a) alginato sodio 2%, b) alginato
 239 2%/goma arábica 2%, c) superficie de microcápsula con alginato 2%, d) superficie de
 240 microcápsula alginato 2%/goma arábica 2%

241 5. Conclusiones

242 La concentración de alginato al 2% permitió la formación de extruidos esféricos, mejor
 243 homogeneidad en su evaluación y mayor rendimiento. El uso de alginato solo y en
 244 combinación de goma arábica al 1 y 2% mostró mayor dureza durante su evaluación
 245 reológica, así como su integridad morfológica en el proceso de liofilización. Los extruidos
 246 con alginato y goma arábica presentaron las mejores características de morfología y
 247 superficie en la evaluación de microscopía electrónica.

248 6. Resultados Sobresalientes

249 Desarrollo de las condiciones para obtener microcápsulas homogéneas y estables.

251 **7. Agradecimientos**

252 Proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM IT202312, Beca de CONACYT 339105,
253 M. en C. Sofía González Gallardo por su apoyo en la preparación de las muestras y
254 observación al MEB.

255 **8. Referencias**

- 256 Dontthidi AR, Tester RF, Aidoo KE. 2010. Effect of lecithin and Starch on Alginate-
257 encapsulated probiotic bacteria. *Journal of Microencapsulation*, **27** (1), 67-77.
- 258 Krasaekoopt W, Brandari Bhesh, Deeth Hilton. 2003. Evaluation of Encapsulation
259 techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, **13** (1), 3-13.
- 260 Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H, 2004. The influence of coating materials on some
261 properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria.
262 *International Dairy Journal*, **14**, 737-743.
- 263 Laurienzo P, Fernandes JC, Fitton H. 2015. The use of natural polysaccharides as
264 biomaterials. *BioMed Res*, 1-2.
- 265 Lee KY, Heo TR 2010. Survival of Bifidobacterium longum immobilized in calcium alginate
266 beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Appl Environ Microbiol*, **66**,
267 869-873.
- 268 Lupo PB, Gonzalez AC, Maestro GA. 2012. Microencapsulation in alginate for Food.
269 Technologies and applications. *RVCTA*, **3**(1), 130-151.
- 270 Montenegro MA, Boiero ML, Valle I, Borsarelli CD. 2012. Gum Arabic: More Than an
271 Edible Emulsifier. *Products and applications of Biopolymers*. Edited by Casparus
272 Johannes Reinhard Verbeek, ISBN.
- 273 Nayak AK, Das B, Maji R. 2012. Calcium alginate/gum arabic beads containing
274 glibenclamide development and *in vitro* characterization. *Int Biol Macromol*, **51** (5),
275 1070-1078.
- 276 Pasparakis G y Bouropoulos N. 2005. Swelling Studies and *in vitro* release of verapamil from
277 calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. *International Journal of*
278 *Pharmaceutics*, **323**, 34-42.

- 279 Pujiang Shi, Pengfei He, Ten TKH, Morsi YS, Gho JCH. 2011. Parametric analysis of shape
280 changes of alginate beads. Powder technology, **210**(1), 60-66.
- 281 Rinaudo M. 2008. Main properties and current applications of some polysaccharides as
282 biomaterials. Pplymer International, **57**(3), 397-430.
- 283 Rokka S, Rantamäki. 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: Changes
284 for industrial applications. Eur Food Res Technol **231**, 1-12.
- 285 Ross CR, Gusils C 2008. Microencapsulation of probiotic strains for swine feeding. Biol
286 Pharm Bull, **31**, 2121-2125.
- 287 Sheu T and Rosenberg M. 1998. Microstructure of microcapsules containing of whey
288 proteins and carbohydrates. Journal of Food Science, **63**(3), 491-494.
- 289 Sheu TY, Marshall RT. (1991). Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels.
290 Journal of Food Science, **54**(3), 557-561.
- 291 Young lee K, Mooney DJ. 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. Progrees
292 in polymer Science, **31**(1), 106-126.
- 293 Zamora VR, Montañez SJL, Martínez FH, Flores Magallón R, Muños Ruiz CV, Venegas GJ,
294 Ariza OT. 2012. Effect of incorporating prebiotics in coating materials for the
295 microencapsulation of *Sacharomyces boulardii*. International Journal of Food
296 Sciences and Nutrition, **63**(8).

CAPÍTULO 3

1 **Efecto de la microencapsulación de las cepas probióticas *Pediococcus acidilactici* y**
2 ***Lactobacillus plantarum* en alginato-goma arábica y su evaluación bajo condiciones**
3 **simuladas de tracto gastrointestinal *in vitro*.**

4
5 I. Sandoval Mosqueda, A. Llorente Bousquets, J.F. Montiel Sosa, L. Corona Gochi.

6
7 Laboratorio de Bioconservación, Unidad de Investigación Multidisciplinaria. Facultad de
8 Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. km 2.5
9 carretera Cuautitlán-Teoloyucan. San Sebastián Xhala s/n, Cuautitlán Izcalli, México.

10 llorente@unam.mx

11
12 **Resumen**

13 La microencapsulación de cepas probióticas es una tecnología ampliamente utilizada para
14 mejorar la viabilidad de las cepas frente a condiciones adversas. El objetivo de este trabajo
15 fue investigar la viabilidad de *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus plantarum* en un
16 sistemas de microcápsulas elaborado con alginato de sodio y goma arábica, para su posterior
17 aplicación como probióticos en animales domésticos no rumiantes. Se siguieron los criterios
18 de evaluación de probióticos (FAO/OMS), de identidad de las cepas (PCR) y se estableció la
19 viabilidad de las células microencapsuladas antes y después del proceso de liofilización con
20 y sin el uso de un crioprotector, así como su evaluación *in vitro* bajo condiciones de tracto
21 gastrointestinal. Los mayores valores de viabilidad se obtuvieron en la microencapsulación
22 con el sistema alginato/goma arábica. El uso de leche descremada al 10%, tuvo un efecto
23 crioprotector en la liofilización de ambas cepas microencapsuladas. Durante la incubación
24 en condiciones de medio gástrico se observó una disminución ($P<0.05$) en la viabilidad para
25 *P. acidilactici* microencapsulada con alginato2%/arábica2% (7.14%), en el medio intestinal
26 aislado, la viabilidad se mantuvo para *L. plantarum* (100%), para *P. acidilactici* se presentó
27 un incremento ($P<0.05$) con el uso de alginato2%/arábica2% (5.16%). En el desafío de medio
28 gástrico seguido de medio intestinal los mejores resultados de viabilidad para *P. acidilactici*
29 microencapsulada fueron con el uso de alginato2%/arábica2% con 90.32%, y con el uso de
30 alginato2% para *L. plantarum* con un 83.58% de viabilidad. Estos resultados demuestran que

31 la microencapsulación con alginato/goma arábica permiten el desarrollo de un sistema de
32 microencapsulación que favorece una mayor viabilidad de las cepas utilizadas en este
33 estudio.

34 **Palabras clave:** Microencapsulación, Probióticos, Alginato de Sodio, Goma arábica,
35 Liofilización.

36 **1. Introducción**

37 Los probióticos son definidos por el comité mixto FAO/OMS (2002) como microorganismos
38 vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto benéfico a la salud del
39 huésped. Dentro de los efectos estudiados, se incluyen el control sobre microorganismos
40 patógenos en el tracto gastrointestinal, mejora de la función de la barrera intestinal, efectos
41 inmunomoduladores y nutricionales (Malago *et al.*, 2011 y Min-Tze 2011). Los aditivos
42 probióticos son útiles en las producciones pecuarias, ya que mejoran los mecanismos
43 naturales de defensa de los animales, disminuyendo los problemas de salud, y por ende,
44 pueden aumentar la productividad, además de ser una alternativa biosegura para los animales
45 y humanos (Gaggía *et al.*, 2010; Sorrondegui *et al.*, 2012; Giraldo *et al.*, 2015).

46

47 En 2002 FAO/OMS estableció los criterios para la evaluación de microorganismos
48 empleados como probióticos, en 2014, Ceron tomó de referencia estos criterios para la
49 caracterización de la cepa *P. acidilactici* ATCC 8042 como probiótico potencial y *L.*
50 *plantarum* ATCC 8014 como referente, mediante pruebas de hemólisis, sobrevivencia al
51 tracto gastrointestinal, capacidad de adherencia a *mucus* intestinal y prueba de sensibilidad a
52 antibióticos. A pesar de que los resultados concluyeron que *P. acidilactici* posee potencial
53 probiótico, se observó que ambas cepas disminuyeron significativamente su viabilidad al ser
54 sometidas a condiciones de tracto gastrointestinal.

55

56 Se sabe que los efectos benéficos de las bacterias probióticas dependen de la viabilidad de
57 las células en el intestino. Las células tienden a perder su viabilidad durante su manejo y
58 almacenamiento, asimismo a través del tracto gastrointestinal, por lo que es importante
59 conferir algún grado de protección. Como una solución a este problema, se ha utilizado la

60 tecnología de microencapsulación, en donde distintas técnicas y materiales han sido
61 propuestas para investigar su rol de protección frente a condiciones ambientales adversas
62 (Capela *et al.*, 2006; Khoraminia *et al.*, 2011).

63 La extrusión es una técnica comúnmente utilizada para la microencapsulación de probióticos,
64 estudios realizados describen el uso de diversos materiales poliméricos en la formación de
65 extruidos como el alginato de sodio solo o en combinación con otros biopolímeros, tales
66 como el quitosan, poly-L-lysina (Krasaekoopt *et al.*, 2004), proteínas de suero de leche
67 (Komenan *et al.*, 2009) y almidones (Donthidi *et al.*, 2010; Sultana *et al.*, 2000), en donde
68 los resultados demostraron una mejora en la viabilidad de diversas cepas probióticas al ser
69 sometidas a condiciones de almacenamiento y de tracto gastrointestinal.

70

71 Por otra parte, la adición de prebióticos en la microencapsulación puede favorecer la
72 viabilidad y acción de los microorganismos benéficos en el tracto gastrointestinal. Los
73 prebióticos son ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al
74 huésped estimulando selectivamente el crecimiento y metabolismo de las bacterias benéficas
75 en el intestino. Algunos autores han concluido que el uso de prebióticos como inulina, fructo-
76 oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), almidones y goma arábica pueden
77 mejorar la funcionalidad de algunos microorganismos probióticos, generando mayores
78 recuentos de viabilidad (Iyer y Kailasapathy, 2006; Kanmani *et al.*, 2011).

79

80 Por lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo, una vez corroborada la identidad
81 de las cepas *P. acidilactici* y *L. plantarum* mediante PCR, fue investigar su viabilidad en un
82 sistema de microcápsulas con alginato/goma arábica, así como su evaluación frente a la
83 liofilización y bajo condiciones simuladas de tracto gastrointestinal *in vitro* (FAO/OMS).

84 **2. Materiales y métodos**

85 **2.1. Cepas bacterianas y manejo de cultivos**

86 Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las cepas liofilizadas de *Pediococcus*
87 *acidilactici* de la colección ATCC 8042 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. El medio
88 de cultivo utilizado para el crecimiento de la cepa *L. plantarum* fue caldo de Man Rogosa

89 Sharpe (MRS) (Becton, Dickinson and Company, USA) y para la cepa *P. acidilactici* fue
90 medio MRS formulado modificado (Llorente, 1998) por la adición de 10% de sacarosa y
91 0.1% de ácido ascórbico. Los pellets comerciales fueron cultivados dos veces en 30 mL de
92 caldo MRS estéril, durante 24h a 30±2°C. Se utilizaron las células del segundo pase del 2%
93 (v/v) de cada cultivo reactivado y se incubaron 12h a 30±2°C. La pureza de los cultivos se
94 verificó mediante siembra en placa y tinción de Gram, en las cuales se observaron las
95 características macroscópicas y microscópicas de las colonias.

96 **2.2. Verificación de la Identificación de las cepas mediante PCR**

97 **2.2.1. Extracción de ADN**

98 Cada cepa bacteriana fue cultivada en 30 mL de caldo MRS durante 12h a 30±2°C. El paquete
99 celular se obtuvo de una alícuota de 1.5 mL del cultivo, centrifugado a 5000 rpm 10 min a
100 4°C en tubos Eppendorf de 2 mL.

101 La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el protocolo de fenol cloroformo utilizando
102 de Burbano *et al.*, (2006). El paquete celular se resuspendió en 0.5 mL de TE [Tris Cl 10
103 mM, EDTA 1mM] y se agregaron 5µl de lisozima (2mg/mL) incubado a 37±2°C durante 2
104 h. Se adicionó 1 µl de SDS (10 µg/ mL) y 1.25 µl de proteinasa K (20 µg/µl) incubado a
105 37±2°C durante 1h. Se adicionaron 17 µl de NaCl y 12 µl de CTAB incubado a 65°C durante
106 20 minutos. Fue adicionado 0.5 mL de fenol-cloroformo y centrifugó 3500 rpm por 10min a
107 4°C. Se colectó la fase acuosa en un tubo nuevo al que se adicionó 1 µl de RNAsa (5µg/mL)
108 incubado toda la noche a 4°C. Se agregaron 500 µl de fenol-cloroformo y centrifugado bajo
109 las mismas condiciones, se tomó la fase acuosa y agregó 1 mL de etanol, incubado a -20°C
110 durante 2h. La muestra fue centrifugada a 10,000rpm durante 10min a 4°C, se eliminó el
111 sobrenadante y el ADN se secó a temperatura ambiente durante toda la noche. El ADN se
112 resuspendió en 25 µl de amortiguador TE y se almacenó a 4°C hasta su uso.

113 **2.2.2. PCR de la cepa *P. acidilactici* ATCC 8042**

114 La estrategia de identificación de la cepa se basó en el protocolo de Mora *et al.* (1997). En
115 donde se utilizaron primers para regiones variables del gen 16S ARNr PacF (5'-CGA ACT
116 TCC GTT AAT TGA TTA T-3') y PuR (5'-ACC TTG CGG TCG TAC TCC-3') específicos

117 del género *Pediococcus* y los primers del gen *ldh* fueron *ldhDF* (5'-GGA CTT GAT AAC
118 GTA CCC GC-3') y *ldhDR* (5'-GTT CCG TCT TGC ATT TGA CC-3') específicos de la
119 especie *acidilactici* los cuales fueron sintetizados por la empresa (Integrated DNA
120 Technologies, Coralville, Iowa, USA).

121 Las condiciones empleadas en el proceso de amplificación fueron las siguientes:
122 desnaturalización inicial a 94°C por 5min, seguido de 36 ciclos consistentes en:
123 desnaturalización a 94°C por 45s, alineación a 67°C por 30s, extensión a 72°C por 30s y una
124 extensión final a 72°C por 10 min en termociclador (Axigen® MaxyGene™ II).

125 **2.2.3. PCR de la cepa de *L. plantarum* ATCC 8014**

126 La metodología se basó en el protocolo de Dubernet *et al.* (2002) para el género *Lactobacillus*
127 y Terriani *et al.* (2001) para la especie *plantarum* con modificaciones en tiempos y
128 temperaturas en la amplificación. Los primers utilizados fueron R16-1F (5'- CTT GTA CAC
129 ACC GCC CGT CA-3') y LbLMA1-rev (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3') para
130 el género *Lactobacillus* que corresponden a la secuencia terminal del gen 16S ARNr,
131 mientras que los primers Pent F (5'-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-3'), PlanF (5'-
132 CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3') y pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-
133 3') fueron utilizados para la especie *plantarum* correspondientes a la secuencia del gen *RecA*.
134 Las condiciones empleadas en el proceso de amplificación para *L. plantarum*, fueron una
135 desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos consistentes en replicación
136 a 94°C durante 45s, alineación a 55°C por 30s, extensión a 72°C por 30s y una extensión final
137 a 72°C por 10 min en termociclador (Axigen® MaxyGene™ II).

138 **2.2.4. Electroforesis de los productos amplificados**

139 Se prepararon 100 mL de agarosa al 1.5% en TAE buffer 0.05x teñidos con 4 µL de colorante
140 Midory Green. Las muestras sometidas a electroforesis se constituyeron de la siguiente
141 forma: se tomaron 5 µL de cada uno de los amplificados y se mezclaron con 1 µL de marcador
142 de carga (6x DNA loading Dye). Para identificar el peso molecular de las bandas
143 amplificadas se utilizaron 5 µL de marcador de pares de bases 10000pb Mass Ruler DNA
144 Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Scientific).

145 La electroforesis se desarrolló en una cámara de electroforesis horizontal (Horizon 11.14,
146 Life Technologies, USA) en buffer TAE, a 80 Volts durante 1 h. Los geles fueron
147 visualizados y fotografiados bajo luz ultravioleta en transiluminador (Gel Logic 1500,
148 Imaging Sistem).

149 **2.3. Manejo de las células**

150 **2.3.1. Construcción de las cinéticas de crecimiento de las cepas**

151 Se construyeron cinéticas de crecimiento de 24h de cada una de las cepas, en caldo MRS
152 estéril, tras cultivos al 2% (v/v) de cultivo previamente reactivado, incubados a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se
153 determinaron UFC/mL por el método de diluciones seriadas y sembrado en placa a las 0, 4,
154 8, 12, 16, 20 y 24h de incubación, utilizando la técnica de diluciones decimales (10^{-1} a 10^{-6})
155 en agua peptonada al 0.1% y siembra en placa, colocando una alícuota de 20 μL de cada
156 dilución por triplicado en cajas de agar MRS, incubando durante 24h a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$. En paralelo
157 fue medida la densidad óptica (D.O.) en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf)
158 y $A_{600\text{nm}}$ utilizando como blanco el medio MRS solo. Para cada cepa se realizaron tres réplicas
159 y cada réplica conto con dos repeticiones.

160 **2.3.2. Preparación de las células para la microencapsulación**

161 Se cultivaron ambas cepas de *Pediococcus acidilactici* y de *Lactobacillus plantarum* en
162 500mL de MRS estéril durante 12h a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se cosecharon las células por centrifugación
163 a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C en centrífuga (Centurium Scientific, K3 Series mod.
164 K2015), se lavaron los paquetes de células, con agua peptonada al 0.1% (p/v) seguido de
165 centrifugación bajo las mismas condiciones. Las células lavadas fueron resuspendidas en 30
166 mL de agua peptonada, se determinaron las UFC/mL y se almacenadas a 4°C hasta su
167 preparación en microcápsulas. Este procedimiento se realizó para cada experimento con la
168 intención de utilizar células frescas, obtenidas el mismo día del ensayo.

169 **2.4. Microencapsulación y liofilización de las cepas en el sistema de alginato-goma** 170 **arábica**

171 Para la elaboración del sistema, se prepararon tres dispersiones coloidales al 2% de alginato
172 en de agua destilada, en agitación magnética a temperatura ambiente hasta su dispersión

173 completa, en seguida la goma arábica se incorporó en concentraciones de 1 y 2%
174 respectivamente y se dejó una de alginato solo. Las tres dispersiones (alginato 2%, alginato
175 2%/arábica 1% y alginato 2%/arábica 2%) fueron esterilizadas (121°C 15 min). Un mL de
176 cada dispersión fue mezclada con 1×10^9 UFC/mL de las células preparadas para la
177 microencapsulación, la mezcla fue extruida en 10 mL de una solución de CaCl_2 al 0.05 M
178 estéril (121° C 15 min) durante 30 minutos para permitir su completa gelificación, al finalizar,
179 las microcápsulas se obtuvieron por decantación y almacenadas a -50°C durante 24h para
180 su posterior liofilización (liofilizadora Labconco Free-Zone 4.5, USA) a -50°C por 24 h con
181 una presión de 0.07 mbar. Como control en el experimento fue utilizado el paquete celular
182 liofilizado de cada cepa sin encapsular.

183 **2.4.1. Determinación de viabilidad de *P. acidilactici* y *L. plantarum* en los** 184 **tratamientos microencapsulados liofilizados**

185 Para lograr la liberación de las células microencapsuladas y determinar las cuentas viables
186 se utilizó la metodología de Capela (2006), donde las microcápsulas de cada tratamiento
187 (equivalentes a 1 mL de extruido) fueron colocadas en 40 mL de solución Buffer de Fosfatos
188 (pH 7.4) estéril, en agitación hasta su completa disolución, una vez liberadas las células, se
189 determinaron las UFC/mL antes y después del proceso de liofilización y se determinó el
190 porcentaje de viabilidad por quintuplicado para cada uno de los tratamientos utilizando la
191 siguiente fórmula:

192

$$193 \quad \% \text{ viabilidad} = \frac{\text{UFC/mL después de la liofilización}}{\text{UFC/mL antes de la liofilización}} \times 100$$

194 **2.5. Microencapsulación y liofilización de las cepas con el uso de un crioprotector** 195 **(leche descremada al 10%)**

196 Paquetes de células de ambas cepas de *Pediococcus acidilactici* y de *Lactobacillus plantarum*
197 preparadas para su microencapsulación, fueron mezcladas con leche descremada estéril al
198 10% y se tomaron alícuotas de 1 mL y se colocaron en tubos Eppendorf, seguidas de
199 congelación a -50°C durante 24h para su posterior liofilización a -50°C durante 24h con una
200 presión de 0.07 mbar y almacenadas a -20°C hasta su uso.

201 Posteriormente, el paquete celular liofilizado con leche descremada al 10% se mezcló con 1
202 mL de las diferentes dispersiones (alginato 2%, alginato 2%/arábica 1% y alginato
203 2%/arábica 2%), las muestras fueron extruidas bajo las mismas condiciones antes descritas,
204 las microcápsulas de cada tratamiento fueron recolectadas por decantación y congeladas a -
205 50°C por 24h para su posterior liofilización.

206 En este experimento la viabilidad fue determinada por microcápsula, Las UFC/mL se
207 determinaron antes y después del proceso de liofilización. Para lograr la liberación de las
208 células, cada microcápsula se colocó en 1 mL de caldo MRS estéril durante 30 min. Las
209 células liofilizadas con leche descremada sin encapsular fueron utilizadas como control.

210 **2.6. Desafío de las cepas microencapsuladas bajo condiciones de medio gástrico** 211 **simulado**

212 La tolerancia al medio gástrico se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por
213 Musikasang *et al.* (2009) en donde una microcápsula de cada tratamiento fue colocada en un
214 tubo Eppendorf adicionando 1 mL de jugo gástrico formulado (solución de Pepsina a
215 3mg·mL⁻¹ en solución salina al 0.5% con pH ajustado a 2.5 con HCL 1.0 M) esterilizado con
216 membrana (0.22 μm). La suspensión fue homogeneizada en vórtex durante 5s e incubada a
217 38±2°C. Los conteos de UFC/mL se realizaron a los tiempos 0, 2 y 4h de la incubación.

218 **2.7. Desafío de las cepas microencapsuladas bajo condiciones de medio intestinal**

219 La preparación del jugo intestinal se realizó de acuerdo a Vidhyasagar y Jeevaratnam (2012).
220 Para el desafío de tolerancia al medio intestinal cada microcápsula fue colocada en tubos
221 Eppendorf con 1 mL de jugo intestinal simulado (ácidos biliares 3mg·mL⁻¹ y pancreatina
222 1mg·mL⁻¹ en solución salina al 0.5% ajustando el pH a 8.0) esterilizada con membrana (0.22
223 μm). La suspensión se agitó en vórtex por 5s y se incubó a 38±2°C. El conteo de UFC/mL
224 de cada tratamiento se realizó a los tiempos 0, 2.5 y 5h de incubación.

225 **2.8. Tolerancia de las cepas microencapsuladas en medio gástrico seguido de** 226 **medio intestinal**

227 Cada uno de los tratamientos microencapsulados y liofilizados fueron sometidos al desafío
228 de tolerancia gástrica incubando durante 4h a 38±2°C, concluido el tiempo, las muestras

229 fueron centrifugadas a 5000 rpm, se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 mL de medio
230 intestinal, antes descrito, incubado a $38\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5h. Durante todo el experimento, para
231 el grupo control se utilizaron las células sin encapsular liofilizadas con leche descremada al
232 10%. El conteo de UFC/mL de cada microcápsula fue determinada a los tiempos 0, 4 y 9h
233 de incubación. Para determinar las UFC/mL de cada tratamiento y sus quintuplicados, la
234 muestra centrifugada se disolvió en 1 mL de caldo MRS estéril mediante agitación, se
235 prepararon diluciones decimales en agua peptonada 0.1% y se tomaron 20 μl de cada dilución
236 para su cuenta en placa de agar MRS e incubación a $30\pm 2^{\circ}$ por 24h. Las colonias contadas
237 se expresaron en log (UFC/mL).

238 **3. Análisis estadístico**

239 Se obtuvieron las medias y desviaciones estándar de los resultados. Fue utilizado un análisis
240 de varianza multifactorial de acuerdo con un diseño completamente al azar. Tras la
241 comparación de las medias de los tratamientos, se realizó prueba de Tukey con un nivel de
242 significancia de ($P < 0.05$) usando el paquete estadístico Minitab 16.

243 **4. Resultados y discusión**

244 **4.1. Identidad de las cepas mediante PCR**

245 La correcta identificación de las cepas con potencial probiótico es el primer requisito
246 establecido por la guía para la evaluación de probióticos (FAO/OMS, 2002) ya que los
247 efectos beneficiosos no pueden ser atribuidos de forma generalizada a un género ni especie.

248 Una vez reactivadas las cepas de *P. acidilactici* y *L. plantarum* en caldo MRS, fue realizada
249 la inspección microbiológica verificando la morfología y pureza a nivel macroscópico y
250 microscópico, así como la verificación a nivel molecular empleando la técnica de PCR para
251 identificación a nivel género y especie.

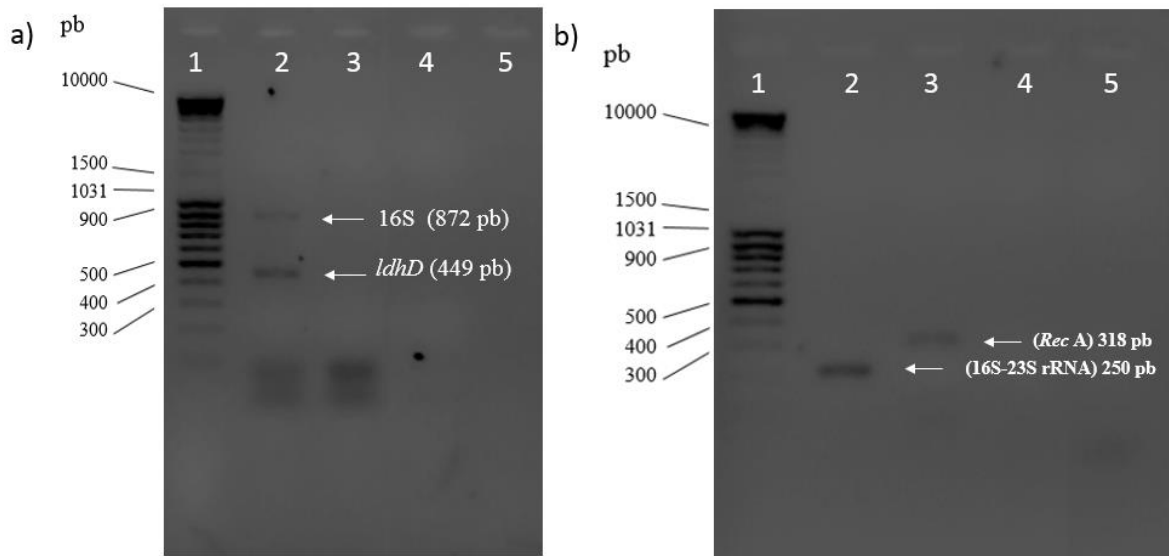
252 La identificación molecular de las cepas se muestra en la Figura 9^a, en el gel de agarosa de
253 los productos de PCR obtenidos. En el carril 2 que contenía la muestra con ADN de la cepa
254 *P. acidilactici*, se logró la amplificación de dos segmentos, el primero de aproximadamente
255 449 pb correspondiente a la subunidad 16S de ARN ribosomal específico del género
256 *Pediococcus* y el segundo, con una dimensión cercana a 870 pb esperada para la

257 amplificación de la secuencia de ADN del gen codificante para la enzima D-lactato
258 deshidrogenasa, presente en la especie *acidilactici*. Por otra parte, se observó que el control
259 positivo con ADN de *L. plantarum* (carril 3) y el control negativo sin ADN (carril 4) no
260 mostró ninguna banda de amplificación. Los hallazgos obtenidos corresponden a lo esperado
261 y concuerdan con lo establecido por Mora *et al.* (1997).

262

263 En el caso de la cepa *L. plantarum*, (Figura 9^b). Se obtuvieron dos amplificados, el primero
264 aproximadamente de 250 pb (carril 2) en la identificación del género *Lactobacillus* igual a lo
265 reportado por Dubernet *et al.* (2002), y el segundo amplificado alrededor de 318 pb (carril
266 3), concuerda con lo establecido por Torriani *et al.* (2001) para la identificación de la especie
267 *plantarum*. Por otra parte en el control positivo con ADN de *P. acidilactici* (carril 4) y el
268 control negativo sin ADN (carril 5) no mostraron visualización de bandas.

269



270

271 **Figura 9** Patrón electroforético de los productos de PCR en la identificación de *P.acidilactici*
272 y *L.plantarum*. **a)** Carril 1 (Master Ruler DNA Ladder Mix), carril 2 (ADN *P. acidilactici*),
273 carril 3 control positivo (ADN *L. plantarum*), carril 4 control negativo (sin ADN). **b)** Carril
274 1 (Master Ruler DNA Ladder Mix), carril 2 Identificación de género (ADN *L. plantarum*),
275 carril 3 Identificación de especie (ADN *L. plantarum*), carril 4 control positivo (ADN *P.*
276 *acidilactici*), carril 5 control negativo (sin ADN).

277 **4.2. Cinéticas de crecimiento bacteriano**

278 Las cinéticas de las cepas de estudio se obtuvieron determinando UFC/mL y D.O. cada 4 h
279 durante 24 h, con el objetivo de identificar las fases de crecimiento. Se puede observar que
280 el crecimiento de la cepa *P. acidilactici* describe dos fases (Figura 10). La fase logarítmica o
281 exponencial de 4 a 8 h, seguida de fase estacionaria a partir de las 8h con una absorbancia
282 promedio de 1.16 ± 0.05 y 8.67 ± 0.13 Log (UFC/mL), la cual se mantiene hasta las 24 h en
283 donde no se observa un aumento en la densidad celular.

284

285 **Figura 10** Cinética de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042

286

287 La curva de crecimiento de la cepa *L. plantarum* (Figura 11) muestra la fase logarítmica
288 abarcando de las cero a las ocho horas, seguida de la fase estacionaria que se mantiene hasta
289 las 24h. La fase estacionaria temprana se observa de las 8 a las 12h correspondientes a
290 9.7 ± 0.09 Log (UFC/mL) y D.O. de 11.6 ± 0.7 . Se utilizaron cultivos de 8h para la
291 microencapsulación, inicio de la fase estacionaria.

292

293

Figura 11 Cinética de crecimiento de *L. plantarum* ATCC 8014

294

4.3. Porcentaje de encapsulación de las cepas en el sistema elaborado con alginato/goma arábica

295

296 En el Cuadro 4 se muestra que *P. acidilactici* presenta porcentajes de viabilidad elevados
297 (97%) en donde el uso de alginato y goma arábica (1 y 2%) no mostraron diferencia
298 ($P < 0.05$).

299 Por otra parte, *L. plantarum* tuvo mayores valores de cuentas viables con el uso de alginato
300 solo, al 2% (95.94%), con respecto al uso de goma arábica 1% (89.95 ± 3.17) y 2%
301 (90.62 ± 0.56) y cuyas diferencias fueron estadísticamente significativa ($P < 0.05$). El efecto
302 negativo de la goma arábica durante la microencapsulación de *L. plantarum*, puede ser
303 explicado con los resultados de Goy y Assis (2009), quienes encontraron que la goma arábica
304 ha mostrado ligera habilidad inhibitoria sobre algunos microorganismos, tales como,
305 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella* Typhimurium en
306 ensayos de inhibición en placa, al concluir que la goma arábica, puede actuar como una
307 barrera que rodea la pared celular bacteriana afectando la permeabilidad de las membranas,
308 y la falta de equilibrio osmótico en ambos lados de la pared celular puede conducir a la
309 filtración de agua y paso de los componentes de la célula hacia el exterior. Por otra parte, es

310 importante considerar que este efecto inhibitorio no fue observado por Mohamed *et al.*
 311 (2014) en el crecimiento de las cepas de *L. plantarum* y *L. acidophilus* cuando se incubaron
 312 con goma arábica al 0.5 y 1%.

313

314 **Cuadro 4** Viabilidad (%) de cepas encapsuladas por mL de extruido

Tratamiento	% viabilidad	
	<i>P. acidilactici</i>	<i>L. plantarum</i>
Control	99.31±1.17 ^a	99.5 ± 2.3 ^a
Alginato 2%	97.76±0.89 ^{ab}	95.94±1.42 ^a
Alginato2%/arab 1%	97.07±1.88 ^{ab}	89.95±3.17 ^b
Alginato2%/arab2%	97.84±0.39 ^b	90.62±0.56 ^b

315 ^{abc} letras diferentes en la misma columna muestran diferencia (P<0.05)

316 **4.4. Viabilidad de las cepas microencapsuladas frente a la liofilización**

317 El efecto de la liofilización en la viabilidad de ambas cepas se muestra en Cuadro 5, donde
 318 *P. acidilactici* mostró mayor viabilidad con el uso de alginato2%/arábica2% (93.16±0.88) y
 319 esta viabilidad fue mayor (P<0.05) comparada con los otros tratamientos. También, se pudo
 320 observar que el uso de alginato2%/goma arábica2% no presentó diferencia (P<0.05) respecto
 321 del control (células sin microencapsular).

322

323 *L. plantarum* mostró una disminución (P<0.05) en los valores de viabilidad de la cepa
 324 microencapsulada con respecto al control, donde los mayores resultados de viabilidad se
 325 obtuvieron en las células control (81.12 ± 7.68) mientras que el uso de alginato 2%/goma
 326 arábica 2% tuvo menores valores (73.25 ± 6.74).

327

328

329

330

331 **Cuadro 5** Efecto de la liofilización en la viabilidad de cepas microencapsuladas en el
 332 sistema de alginato-goma arábica

Tratamiento	% viabilidad	
	<i>P. acidilactici</i>	<i>L. plantarum</i>
Control	91.90±2.32 ^{ab}	81.12 ± 7.68 ^a
Alginato 2%	89.89±1.09 ^b	66.57 ± 5.18 ^{ab}
Alginato2%/arab 1%	89.29±1.67 ^b	70.81 ± 7.44 ^{ab}
Alginato2%/arab2%	93.16±0.88 ^a	73.25 ± 6.74 ^b

333 ^{abc} letras diferentes en la misma columna muestran diferencia (P < 0.05)

334

335 Los resultados muestran que *P. acidilactici* obtuvo mayores valores de viabilidad que *L.*
 336 *plantarum* frente al proceso de liofilización. Se ha reportado que diversos géneros y especies
 337 de microorganismos probióticos pueden presentar diferentes comportamientos durante los
 338 procesos de congelación y secado. Carvalho *et al.* (2004) y Capela (2006) observaron los
 339 efectos del tamaño de las cepas en la sobrevivencia frente a la liofilización, donde pequeñas
 340 células esféricas, por ejemplo, *Enterococcus* son aparentemente más resistentes a la
 341 congelación y secado que los *Lactobacillus* (células en forma de bastón), atribuyendo estos
 342 efectos de viabilidad a diferencias en la pared celular y composición de membranas.
 343 Resultados similares fueron obtenidos por Capela (2006), en donde el uso de prebióticos
 344 (inulina y FOS) produjo menor viabilidad de diferentes cepas probióticas frente a la
 345 liofilización, concluyendo que el uso de crioprotectores durante la microencapsulación de
 346 cepas puede revertir este efecto negativo.

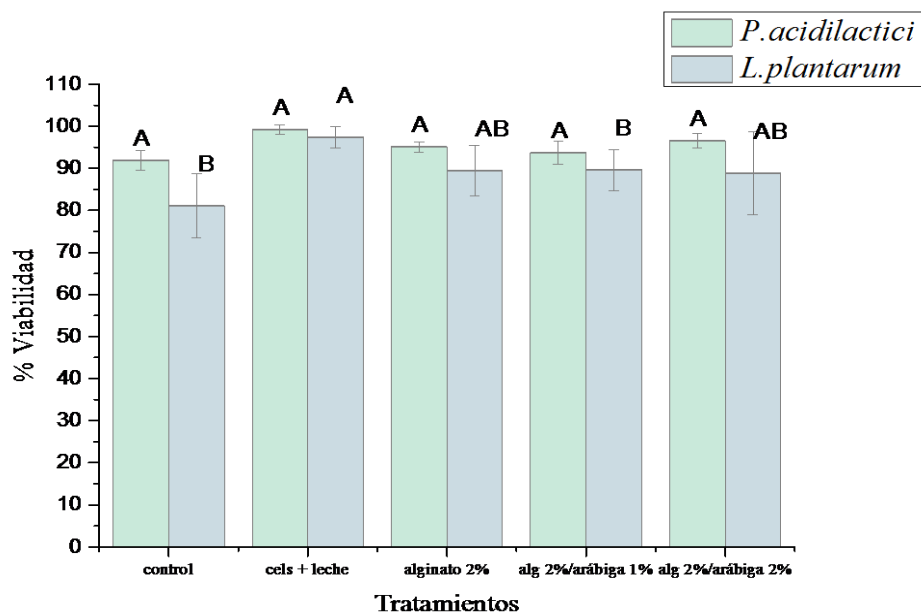
347 **4.5. Microencapsulación y liofilización de las cepas con el uso de leche descremada**
 348 **al 10%**

349 Los resultados de viabilidad obtenidos de los tratamientos se observan en la figura 12. Con
 350 el objetivo de mejorar la viabilidad de las cepas microencapsuladas en el proceso de
 351 liofilización se adicionó leche descremada al 10% como crioprotector.

352 *P. acidilactici* mostró los mayores valores de viabilidad (93 al 96%) comparado con la cepa
353 *L. plantarum* (88 a 89%), en donde no se encontró diferencias ($P>0.05$) entre los tratamientos
354 de cepas microencapsuladas. Por otra parte, se observó una menor viabilidad ($P<0.05\%$) en
355 el grupo control (células solas) de *L. plantarum* ($81.13\pm 7.69\%$) respecto a las células con el
356 uso de leche descremada al 10% ($97.40\pm 2.47\%$), encontrando un efecto positivo en la
357 liofilización de *L. plantarum*.

358

359 Está reportado que la presencia de crioprotectores es necesaria para disminuir las pérdidas en
360 viabilidad durante el proceso de liofilización, ya que la formación de hielo intracelular
361 ocasiona la ruptura de membranas y la deshidratación afecta las propiedades de algunas
362 macromoléculas hidrofílicas en las células, siendo estas las principales causas de muerte
363 celular. La leche descremada es comúnmente utilizada como crioprotector porque previene
364 el daño celular estabilizando las biomoléculas constituyentes de la membrana celular, crea
365 una estructura porosa en el producto liofilizado y contiene proteínas que proporcionan una
366 cubierta protectora (Abadias *et al.*, 2001; Blajman *et al.*, 2014).



367

368 **Figura 12** Efecto de soportes en la liofilización de cepas microencapsuladas de cepas
 369 microencapsuladas

370

371 **4.6. Viabilidad de células microencapsuladas desafiadas en jugo gástrico simulado**

372 El ambiente gástrico actúa como una barrera fisiológica al paso de microorganismos, la
 373 presencia del pH ácido y pepsina tienden a disminuir el porcentaje de células bacterianas
 374 viables que lograrán alcanzar el intestino. Con el objetivo de mejorar la sobrevivencia de
 375 estas cepas en el pH del estómago, se probó la hipótesis de que al aislar a los microorganismos
 376 del medio ácido con la microencapsulación, estas células mantendrían su viabilidad.

377

378 Para la cepa *P. acidilactici* en la prueba de tolerancia al medio gástrico, se observó una
 379 interacción entre tiempo y tratamiento, donde se encontró diferencia ($P < 0.05$) para la cepa
 380 microencapsulada con el uso de alginato 2%/goma arábica 2% (Cuadro 6) observando que al
 381 incrementar el tiempo de exposición al medio gástrico disminuyó el porcentaje de viabilidad.

382 **Cuadro 6** Desafío en jugo gástrico simulado de la cepa *P. acidilactici* microencapsulada
 383 liofilizada

Tratamiento	% viabilidad		
	0 h	2 h	4h
Células: leche d.	98.98±2.96 ^a	97.90±2.96 ^a	94.90±2.76 ^{abc}
Alginato 2%	98.97±1.09 ^a	98.68±2.78 ^a	95.37±1.88 ^{ab}
Alginato2%/arab2%	97.46±1.60 ^{ab}	92.84±3.13 ^{bc}	90.32±3.18 ^c

384 ^{abc} letras diferentes por hilera y columna muestran diferencia (P<0.05)

385

386 La mayor viabilidad se encontró cuando *P. acidilactici* fue encapsulada con el uso de
 387 alginato de sodio 2% (95.37±1.88%), así como en el control (células liofilizadas con leche)
 388 (94.90±2.76%) a las 4 h del desafío.

389

390 El análisis para la cepa *L. plantarum* (Cuadro 7) la viabilidad fue similar (P<0.05) entre
 391 tratamientos, por otra parte, se observa que a través del tiempo, la viabilidad fue menor
 392 (P<0.05) con alginato al 2% a las 4 h de incubación con (81.10±14.74%).

393

394 Los resultados obtenidos en este experimento concuerdan con Annan *et al.* (2008), quienes
 395 evaluaron la sobrevivencia de la cepa *Bifidobacterium adolescentes* 15703T
 396 microencapsulada con gelatina y alginato de sodio, al ser sometida a condiciones ácidas
 397 durante 60 min, reportando una disminución tanto en la viabilidad de células libres como
 398 encapsuladas estadísticamente no significativa.

399

400 El mantenimiento de la viabilidad en las células control (libres liofilizadas con leche
 401 descremada al 10%), puede ser explicado debido a que las proteínas de la leche poseen
 402 capacidad amortiguadora. Komenan (2009) reportó resultados similares donde la adición de
 403 proteínas de la leche, mejoraron la viabilidad de la cepa *L. plantarum* al someterla en
 404 condiciones acidas (pH 1.8) durante 60 min de incubación.

405 **Cuadro 7** Desafío en jugo gástrico simulado de la cepa *L. plantarum* microencapsulada
 406 liofilizada

Tratamiento	% viabilidad		
	0 h	2 h	4h
Células: leche d.	96.92±5.23 ^{ab}	96.40±4.00 ^{ab}	94.13±5.16 ^{ab}
Alginato 2%	98.78±3.61 ^{ab}	93.34±5.05 ^{ab}	81.10±14.74 ^b
Alginato2%/arab2%	100±9.17 ^a	90.76±13.4 ^{ab}	85.13±8.79 ^{ab}

407 ^{abc} letras diferentes por hilera y columna muestran diferencia (P<0.05)

408 **4.7. Viabilidad de células encapsuladas en medio intestinal aislado**

409 El medio gástrico no es la única barrera para los microorganismos que se intenta lleguen
 410 viables al intestino, el pH alcalino y la presencia de sales biliares son una segunda barrera
 411 fisiológica para los probióticos, por lo cual se realizó la evaluación de estas cepas libres y
 412 microencapsuladas, al someterlas a condiciones simuladas de medio intestinal *in vitro*. El
 413 análisis de varianza de los resultados de viabilidad de *P. acidilactici* en la prueba de
 414 tolerancia al medio intestinal muestra diferencia (P<0.05) entre el factor tiempo (cuadro 8).
 415 La microencapsulación con alginato2%/arábica2% presentó un aumento en la viabilidad al
 416 aumentar el tiempo de incubación del 98.19±2.0 a 103.35±1.89%. El incremento de la
 417 viabilidad puede ser explicado debido al uso de goma arábica como prebiótico. Estos
 418 resultados concuerdan con Mohamed *et al.* (2014) quien reportó que la adición de goma
 419 arábica promueve el crecimiento de algunas bacterias lácticas (*L. plantarum* y *L. acidophilus*)
 420 en condiciones de cultivo.

421

422 Por otra parte, las células sin encapsular (liofilizadas con leche descremada) mostraron este
 423 mismo efecto con un incremento de viabilidad del 96.73% a 103.6% después de cinco horas
 424 de incubación, este incremento celular, puede ser explicado debido a una recuperación del
 425 estrés ocasionado por la liofilización o por la capacidad de las células de utilizar la leche
 426 descremada como sustrato (Annan, 2008).

427 **Cuadro 8** Efecto de la encapsulación de la cepa *P. acidilactici* en prueba de tolerancia
 428 intestinal

Tratamiento	% viabilidad		
	0 h	2.5 h	5h
Células:leche d.	96.73±1.32 ^c	98.12±1.51 ^c	103.6±1.72 ^a
Alginato 2%	98.72±1.57 ^{bc}	99.98±3.73 ^{abc}	102.8±2.58 ^{ab}
Alginato2%/arab2%	98.19±2.00 ^c	99.17±2.24 ^{abc}	103.35±1.89 ^a

429 ^{abc} letras diferentes por hilera y columna muestran diferencia (P<0.05)

430

431 Para la cepa *L. plantarum* en la prueba de tolerancia al medio intestinal aislado, no se observó
 432 interacción (P>0.05) entre los factores tratamiento y tiempo. El análisis muestra que el uso
 433 de soportes en la microencapsulación y en las células libres mantuvo la viabilidad de la cepa
 434 (Cuadro 9).

435 **Cuadro 9** Efecto de la encapsulación de la cepa *L. plantarum* en prueba de tolerancia
 436 intestinal

Tratamiento	% viabilidad		
	0 h	2.5 h	5h
Células:leche d.	99.14±5.18 ^a	98.97±4.59 ^a	99.72±4.99 ^a
Alginato 2%	98.78±4.18 ^a	99.62±11.5 ^a	100.9±5.99 ^a
Alginato2%/arab2%	101.6±10.0 ^a	99.95±8.94 ^a	98.79±10.1 ^a

437 ^{abc} letras diferentes por hilera y columna muestran diferencia (P<0.05)

438 **4.8. Desafío de células encapsuladas en medio gástrico seguido de medio intestinal**

439 Para la cepa de *P. acidilactici* en la prueba de desafío a condiciones de tracto gastrointestinal
 440 se encontró interacción (P<0.05) entre los factores tiempo y tratamiento (Cuadro 10). El

441 análisis indicó que al incrementarse el tiempo de exposición disminuyó el porcentaje de
 442 viabilidad para la cepa microencapsulada.

443

444 El uso de alginato2%/arábica2% mostró porcentajes de viabilidad (90.32 ± 3.5) al final del
 445 ensayo, sin presentar diferencias ($P<0.05$) con el uso de alginato 2% (87.68 ± 4.5) y con el
 446 control (95.70 ± 2.65).

447 **Cuadro 10** Efecto de la microencapsulación de *P. acidilactici* en medio gástrico seguido
 448 de medio intestinal

Tratamiento	% viabilidad		
	Tiempo de incubación		
	0 h	Medio gástrico (4 h)	Medio intestinal (5h)
Células:leche d.	100 ± 1.36^a	86.76 ± 3.21^c	95.70 ± 2.65^{ab}
Alginato 2%	100 ± 1.59^a	95.80 ± 3.88^{ab}	87.68 ± 4.51^c
Alginato2%/arab2%	100 ± 2.04^a	92.25 ± 5.23^{bc}	90.32 ± 3.54^{bc}

449 ^{abc} letras diferentes por hilera y columna muestran diferencia ($P<0.05$)

450 Para la cepa *L. plantarum* microencapsulada sometida al desafío de tracto gastrointestinal, se
 451 encontraron interacciones ($P<0.05$) entre los factores tiempo y tratamiento (Cuadro 11),
 452 donde se observó que existe una pérdida de viabilidad al ser incubada en medio gástrico
 453 simulado y al incubar los tratamientos en medio intestinal, el porcentaje de viabilidad se
 454 mantuvo. Al final del ensayo, la microencapsulación con alginato 2% mostró mayor
 455 viabilidad con un valor del $83.58\pm18.16\%$ en comparación con alginato2%/arábica2% con
 456 $71.04\pm12.73\%$.

457

458 Anteriormente en el grupo de trabajo fue realizada la evaluación de tolerancia gastrointestinal
 459 de *P. acidilactici* y *L. plantarum* sin el uso de soportes, las cepas fueron sometidas cuatro
 460 horas a medio gástrico seguidas de cinco horas de incubación en medio intestinal bajo las
 461 mismas condiciones, encontrando una viabilidad final del 48% para *P. acidilactici* y 50.9%

462 para *L. plantarum*. Los resultados de viabilidad de casi el doble obtenidos en este trabajo,
 463 sugieren que el uso de soportes en las células libres y encapsuladas mejoró la sobrevivencia
 464 de las células al someterlas en condiciones adversas del tracto gastrointestinal.

465

466 **Cuadro 11** Efecto de la microencapsulación de *L. plantarum* en medio gástrico e
 467 intestinal simulados

Tratamiento	% viabilidad		
	Tiempo de incubación		
	0 h	Medio gástrico (4 h)	Medio intestinal (5h)
Células leche d.	100±5.22 ^a	98.12±6.60 ^a	96.86±7.86 ^a
Alginato 2%	100±5.05 ^a	76.12±8.17 ^b	83.58±18.16 ^{ab}
Alginato2%/arab2%	100±9.74 ^a	72.17±6.83 ^b	71.04±12.73 ^b

468 ^{abc} letras diferentes por hilera y columna muestran diferencia (P<0.05)

469

470 Finalmente, en este ensayo pudo ser observada la estabilidad de las microcápsulas. En
 471 condiciones gástricas (pH 2.5) la integridad de las perlas se mantuvo, mientras que en el
 472 desafío de medio intestinal, donde las condiciones de pH son alcalinas (8.0) se observó la
 473 desintegración de las microcápsulas de alginato al 2% a los 120 min de iniciada la prueba y
 474 aquellas formadas con alginato2%/arábica2% la desintegración se observó a los 40 min. Esta
 475 característica es atribuida a los geles de alginato, los cuales son estables en pH ácido (3.0 a
 476 4.0) y que en pH por encima de 6.0 pierden su integridad rápidamente (McNeely *et al.*, 1973).

477 **5. Conclusiones**

478 *P. acidilactici* y *L. plantarum* obtuvieron altos porcentajes en la eficacia de
 479 microencapsulación con el uso de alginato y goma arábica. Las cepas microencapsuladas con
 480 la adición de un crioprotector (leche descremada al 10%) mejoraron la viabilidad durante las
 481 evaluaciones en la liofilización. En el desafío de medio gástrico aislado hubo una
 482 disminución de la viabilidad para la cepa *P. acidilactici* con el uso de alginato2%/goma

483 arábica2%, mientras que *L. plantarum* no mostró disminuciones ($P < 0.05$) en ninguno de los
484 tratamientos. Durante la incubación de las cepas microencapsuladas en el desafío de medio
485 intestinal no se presentaron pérdidas de viabilidad. Finalmente, la incubación de las cepas en
486 medio gástrico seguida de medio intestinal, donde la microencapsulación con
487 alginato2%arábica 2% tuvieron mejores valores de viabilidad para la cepa *P. acidilactici*,
488 mientras que, el uso de alginato solo al 2% presentaron los mejores resultados para la cepa
489 *L. plantarum*. Los resultados obtenidos en este estudio plantean que la microencapsulación
490 con alginato/goma arábica mantiene la viabilidad de las cepas *P.acidilactici* y *L. plantarum*
491 para su uso como probióticos.

492 **6. Referencias**

- 493 Abadias M, Benabarre A, teixidò N, Ursal J, vinas I. 2001. Effect of freeze dryin and
494 protectants on viability on the biocontrol yeast candida sake. Int J Food Microbiol,
495 **65**, 173-82.
- 496 Annan NT, Borza AD, Truelstrup Hansen L. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin
497 microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis*
498 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food research
499 international, **41**, 184-193.
- 500 Blajman JE, Fusari ML, Astesana DM, Berisvil AP, Rossler E, Zimmermann JA, Zbrun
501 MVR, Rosmini MR, Frizzo LS. 2014. Conservación de *Lactobacillus salivarius*
502 DSPV 001P de origen aviar mediante liofilización. XV Jornadas de divulgación
503 técnico científicas.
- 504 Burbano E, Sierra S, Torres K, Mercado M, Carrascal A, Poutou R. 2006. Rapid DNA
505 extraction and PCR validation for direct detection of *Listeria Monocitogenes* in raw
506 milk, **11** (1), 715-724.
- 507 Capela P. Hay TKC, Shah NP. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and
508 microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried
509 yoghurt. Food Research international, **39**, 203-211.

- 510 Carvalho AS, Silva J, ho P, Teixeira P. 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-
511 dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **14** (10), 835-847.
- 512 Ceron RR. 2014. Caracterización de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como probiótico
513 potencial mediante pruebas *in vitro* y su evaluación comparativa con *Lactobacillus*
514 *plantarum* ATCC 8014. UNAM.
- 515 Dontthidi A. R., Tester R. F., Aidoo K. E. 2010. Effect of lecithin and Starch on Alginate-
516 encapsulated probiotic bacteria. *Journal of microencapsulation*, **27** (1), 67-77.
- 517 Dubernet S, Desmasures N, Gueguén M. 2002. A PCR-based method for identification of
518 *lactobacilli* at genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 271-275.
- 519 FAO/OMS. 2002. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for
520 the Evaluation of Probiotics in Food London Ontario, Canada.
- 521 Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for Food
522 production. *International Journal of Food Microbiology*, **141**, 15-28.
- 523 Giraldo CJ, Narváez SW, Díaz LE. 2015. Probióticos en cerdos: resultados contradictorios.
524 *Biosalud*, **14** (1), 81-90.
- 525 Goy RCDD y Assis OBG. 2009. A Review of the antimicrobial activity of Chitosan.
526 *Polymers*, **19** (3).
- 527 Iyer C, Kailasapathy K. 2006. Effect of Co-encapsulation of probiotics with Prebiotics on
528 increasing the viability of encapsulated Bacteria under *in vitro* acidic and bile salt.
529 *Journal of Food Science*, **70** (1), 18-23.
- 530 Kanmani P, Kumar SR, Yuvaraj NKA, Pattukumar VP, Arul V. 2011. Effect of
531 cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus*
532 *faecium* MC13 for long term storage. *Biochemical Engineering Journal*, **58** (59), 140–
533 147.
- 534 Khoramnia A, Abdullah N, Liew SL, Sieo CC, Ramasamy K and Ho YW. 2011.
535 Enhancement of viability of a probiotic lactobacillus strain for poultry during freeze-

536 drying and storage using the response surface methodology. *Animal Science Journal*,
537 **82**, 127-135.

538 Komenan GG, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E. 2009. Microencapsulation of
539 *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins.
540 *International Journal of Food Microbiology*, **129**, 103-105.

541 Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2004. The influence of coating materials on some
542 properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria.
543 *International Dairy Journal*, **14**, 737-743.

544 Llorente BA. 1998. Evaluación de la producción de bacteriocinas de *Pediococcus acidilactici*
545 bajo diferentes condiciones de cultivo. UNAM.

546 Malago JJ, Koninkx JFJG, Marinsek Logar. 2011. Probiotic Bacteria and Enteric Infections.
547 Cytoprotection by Probiotic Bacteria. Springer Dordrecht Heidelberg. London New
548 York: 221-250.

549 McNeely WH, Pettitt DJ. 1973. Algin. En industrial gums. Edited by RL Whistler. NY,
550 Academic Press. 49-3.

551 MinTze L. 2011. Probiotics Biology, Genetics and Health Aspects. Springer Verlag. Berlin
552 Heidelberg: 140-160.

553 Mohamed RS, Abedalrahman A, Chechan RA. 2014. The Effect of adding Arabig gum in
554 differents ratios on some probiotics fermented milk and studying the inhibitory ability
555 against some pathogenic bacteria. *Journal of kerbala University*, **12** (4), 261-269.

556 Mora D. Grazia FM, Parini C, Luigi MP. 1997. Identification of *Pediococcus acidilactici* and
557 *Pediococcus pentosaceus* based on 16S rRNA and LdhD genetargeted multiplex PCR
558 analysis. *FEMS Microbiology Letters*, **151**, 231-236.

559 Musikasang H, Tani A, Kittikun AH. 2009. Probiotic potencial of lactic acid bacteria isolated
560 from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology and*
561 *Biotechnology*, **25** (8), 1337.

- 562 Sorrondegui MG, lopez DV, Carcassés VA. 2012. Empleo de probióticos en animales. Sitio
563 Argentino de Producción, 1-8.
- 564 Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K.
565 Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in
566 simulated gastrointestinal conditions⁴ and in yoghurt. International Journal Of Food
567 Microbiology, **62**(1-2), 47-55.
- 568 Torriani S, Felis GE, Dellaglio F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L.*
569 *pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex
570 PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. Applied and Environmental
571 Microbiology, **67**(8), 3450–3454.

DISCUSIÓN GENERAL

A lo largo de la presente tesis se han discutido de forma específica y con apoyo bibliográfico los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, sin embargo se ha considerado conveniente y de utilidad presentar una discusión general.

Los efectos beneficiosos sobre la salud humana asociados a los microorganismos probióticos han sido ampliamente reconocidos y demostrados mediante numerosos estudios desde la época de Metchnikoff hasta la actualidad (Saulnier, *et al.*, 2009; Vasiljevic y Shah, 2008).

En el campo de la producción animal, los probióticos fueron inicialmente utilizados como aditivos en los piensos para optimizar los resultados zootécnicos. Sin embargo, el interés en el uso de probióticos en la cría de animales aumentó recientemente para hacer nuevos retos; como la prohibición de los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento (2006, Union Europea), así como la reducción de los patógenos bacterianos en los productos de origen animal, dando resultados alentadores y que de acuerdo a la literatura ha demostrado mejorar significativamente los rendimientos globales de salud y producción animal.

Desde el punto de vista económico, el impacto es que al mantener o mejorar la microbiota, el animal logra una mayor absorción de nutrientes, manteniendo un equilibrio inmunológico y por lo tanto existiendo menor posibilidad de presentar enfermedades, traduciéndose en un mayor rendimiento en la producción. A pesar de ser un valor agregado en la dieta de los animales, su costo sería recuperado a largo plazo, ya que reducirían costos en medicamentos y tratamientos médicos en patologías digestivas y respiratorias. Por ejemplo, Hoyos *et al.* (2008) evaluaron la relación costo beneficio al utilizar microorganismos probióticos en la producción de pollos de engorde. De acuerdo con el análisis económico a través de los presupuestos totales, se encontró una relación de costo beneficio de 0.82 dólares en el grupo tratado y 0.81 dólares en el grupo control, concluyendo que por cada peso invertido se generan 30 centavos de dólar y 28 centavos de dólar respectivamente.

Por otra parte, en el campo de la salud animal, los probióticos están siendo estudiados y utilizados como bioterapias para la prevención o tratamiento de diversos trastornos (Michail, 2009; Chong, 2013; Bordoni *et al.*, 2013), y que gracias al desarrollo de herramientas de biología molecular y las nuevas tecnologías de secuenciación se está descubriendo el impacto de estas cepas sobre el estado de salud de los individuos y los mecanismos que regulan su interacción, que hasta el momento, han sido poco documentados y entendidos.

El conjunto de hallazgos científicos han demostrado resultados alentadores, ampliando cada vez, los campos de aplicación de estos microorganismos, esperando que en un futuro se pueda recurrir a la administración de probióticos para la prevención y/o tratamiento de enfermedades, mejorando la calidad de vida tanto de humanos como de animales.

En otro orden de ideas, es conocido que las cepas probióticas deben ser administradas en cantidades adecuadas para que puedan ejercer sus efectos benéficos (10^7 - 10^{12} UFC/día), sin embargo, al ser incorporadas a los alimentos pueden no llegar en cantidad suficiente al intestino grueso, normalmente su lugar de acción, debido a las condiciones desfavorables durante el almacenamiento y/o del tracto gastrointestinal. Es por ello que se están desarrollando con éxito técnicas como la microencapsulación, con el objetivo de ofrecer a las bacterias probióticas una protección física frente a condiciones desfavorables.

Por lo que, en el presente trabajo, el objetivo fue emplear la técnica de encapsulación para proteger las cepas probióticas *P. acidilactici* y *L. plantarum*. Para ello, el alginato de sodio fue elegido como material encapsulante y la goma arábiga fue incorporada por sus características prebióticas.

En el desarrollo del sistema, se obtuvieron con éxito microcápsulas con dispersiones de polímeros: alginato 2%/goma arábiga 1% y alginato 2%/goma arábiga 2%, una vez establecidos estos parámetros de encapsulación se estudió el efecto protector de los materiales de encapsulación en la viabilidad de las cepas en las microcápsulas, durante el proceso de liofilización y en condiciones simuladas *in vitro* de tracto gastrointestinal.

Los resultados obtenidos en diferentes estudios *in vitro* coinciden como hecho principal que la viabilidad resultante de la exposición a condiciones adversas va a estar ampliamente relacionada por el tipo de cepa empleada (Ding, 2007). Dicho esto, en nuestro estudio *L. plantarum* presentó los menores recuentos de viabilidad al encapsularse, que de acuerdo a la literatura podría estar relacionado con alguna interacción negativa con la goma arábica, pero cuya causa aún no ha sido elucidada.

Este mismo efecto se observó cuando *L. plantarum* microencapsulada fue sometida al proceso de liofilización, donde la pérdida considerable de viabilidad pudo deberse al daño celular debido a la previa congelación y a la deshidratación durante el proceso. (Carvalho *et al.*, 2003). Debido a que no se observó un efecto protector durante la liofilización, fue necesario la administración de leche descremada al 10% como crioprotector, encontrando un efecto positivo en la viabilidad de ambas cepas.

A pesar de que el objetivo de la liofilización fue conservar las cepas a largo plazo, de acuerdo a la literatura, es necesaria la evaluación futura de las cepas microencapsuladas y liofilizadas a través de diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.

En la evaluación *in vitro* de tracto gastrointestinal se observaron diferentes resultados en cada una de las cepas, en general, al final del ensayo, la microencapsulación con alginato al 2% mostró los mejores valores de viabilidad para la cepa *L. plantarum*, mientras que la microencapsulación con alginato 2%/arábica 2% tuvo mayores recuentos de viabilidad para *P. acidilactici*.

Es importante destacar que en el grupo control, la leche descremada al 10% adicionada durante la liofilización de las células libres, mostró un efecto protector durante la incubación en el medio gástrico, el cual puede ser explicado debido a que las proteínas de la leche poseen capacidad amortiguadora en pH ácidos y el incremento celular durante la incubación en medio intestinal puede deberse a una recuperación del estrés ocasionado por la liofilización o por la capacidad de las células de utilizar la leche descremada como sustrato al encontrarse libres en el medio (Annan, 2008; Komenan, 2009).

Tomando estos resultados en cuenta sería importante evaluar los cambios de viabilidad de las cepas microencapsuladas en condiciones de tracto gastrointestinal complementado en un medio rico en nutrientes que eviten subestimar su comportamiento bajo estas condiciones en los animales.

Durante este ensayo, pudo ser evaluada la estabilidad de las microcápsulas, encontrando su desintegración en el medio intestinal (pH 8.0), a los 40 min de incubación para las microcápsulas de alginato2%/arábigo2% y a los 120 min para aquellas formadas con alginato al 2%, corroborando así las características atribuidas a los geles de alginato, los cuales son estables en pH ácidos (3.0 a 4.0) y que en pH por encima de 6.0 pierden su integridad rápidamente (McNeely, 1973). A pesar de que estos resultados sugieren que los microorganismos probióticos serían liberados en el intestino para establecerse y ejercer sus efectos benéficos, es deseable complementar los estudios de estabilidad de las microcápsulas en condiciones *in vivo* para conocer el comportamiento de estas a través del tracto gastrointestinal.

Los resultados obtenidos y detallados en el presente trabajo, plantean que la elaboración del sistema de microcápsulas con alginato/goma arábigo muestran una alternativa para mantener la viabilidad de *P. acidilactici* y *L. plantarum* para su uso como probióticos.

REFERENCIAS

- Aragón F, Carino S, Perdigón G, De Moreno LA. 2015. Inhibition of growth and metástasis of breast Cancer in mice by Milk Fermented with *Lactobacillus casei* CRL 431. *Journal of Immunotherapy*, **38** (5): 185-196.
- Avendaño RGC, López MA, Palou E. 2013. Propiedades del alginato y sus aplicaciones. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, **7** (1): 87-96.
- Ayaviri PR, Bustamante CG. 2013. Alginato. *Rev. Act. Clin. Med.* **30**: 1493-1497.
- Bordoni A, Amaretti A, Leonardi A, Boschetti E, Danesi F, Matteuzzi D, Rossi M. 2013. Cholesterol-lowering probiotics: in vitro selection in vivo testing of bifidobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97** (18): 8273-8281.
- Cabrera CY, Fadrugas FA. 2005. Probióticos y salud: una reflexión necesaria. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, **21**: 3-4.
- Calame W, Weseler AR, Viebke C, Flynn C, Siemensma AD. 2008. Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. *British Journal of nutrition*, **100**: 1269-1275.
- Carro MD. 2014. Empleo de probióticos en la alimentación de rumiantes. *Alimentación animal. Journal of probiotics and Health*.
- Carvalho AS, Silva J, ho P, Teixeira P. 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **14** (10): 835-847.
- Casuccio AC, Silva LSL, Pavan CR, Imamura AHM, Meaquita MA. 2012. Beneficial Effects of Long-Term Consumption of a Probiotic Combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult May Persist After Suspension of Therapy in Lactose-Intolerant Patients. *Nutr Clin Pract*, **27**: 247-251.
- Ceron RR. 2014. Caracterización de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como probiótico potencial mediante pruebas *in vitro* y su evaluación comparativa con *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. UNAM.

- Charalampopoulos D, Rastall RA. 2009. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer.
- Chaucheyras DF, Durand H. 2010. Probiotics in animal nutrition and Health. *Benef Microbes*. **1** (1): 3-9.
- Chen-Yu H, Toshifumi O, Eri M, Yasuhiro D, Jun K, Satoshi T. 2015. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiological reports*, **3** (3): 12327.
- Chong ES. 2013. A potencial role of probiotics in colorectal cáncer prevention: Review of posible mechanisms of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**.
- Ciro GJA, López HA, Parra SJ. 2015. La adición de cepas probióticas modula la secreción de mucinas intestinales en íleon de cerdos en crecimiento. *CES Med Zootec*, **10** (2): 150-159.
- Day JG, Glyn NS. 2007. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Ed. Press, Humana.
- De la Torre L, Aquiles C. 2013. Efecto de la inclusión de probióticos en el alimento de marranas antes del parto y durante la lactación sobre los parámetros productivos de los lechones lactantes. Universidad Mayor de San Marcos. Perú.
- De Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkeman J. 2010. Encapsulation for preservation of funcionaliti and tarjeted delivery of bioactive Food components. *International Dairy Journal*, **20**: 292-302.
- Di Giancamillo A, Vitari F, Savoini G, Bontempo V, Bersani C, Dell'Orto V, Domeneghini C. 2008. Effect of orally administered probiotic *pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. A qualitative and quantitative micro-anatomical study. *Histol Histopatjol*. **23** (6): 651-664.
- Eamonn MMQ. 2010. Probiotics in Gastrointestinal Disorders. *Hospital practice*, **38** (4).
- Euzeby JP. 2002. List of bacterial names whit standing nomenclature. *Ins J. Syst. Bacteriol*, **47**: 590-592.
- FAO/OMS. 2002. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London Ontario, Canada.

- Fromm M, Schulzke JD. 2009. Molecular structure and function of the tight junction. From Basic Mechanisms to Clinical Manifestations. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1165
- Giraldo CJ, Narváez SW, Díaz LE. 2015. Probióticos en cerdos: resultados contradictorios. Biosalud, **14** (1): 81-90.
- Granier A, Goulet O, Hoarau C. 2013. Fermentation products: immunological Effects on human and animal models. Pediatric Research, **74** (2).
- Groschwitz KR, Hogan SP. 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. J Allergy Clin Immunol, **124** (1): 3-20.
- Grzeskowiak L, Endo A, Beasley S, Salminen S. 2015. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. Anaerobe, **34**: 14-23.
- Guarner F, Schaafsma GJ. 1998. Probiotics. Int J Food Microbiol, **39**: 237-238.
- Hernández OJ. 2013. Espectro antimicrobiano de *P. acidilactici* ATCC 8042. En tesis de Licenciatura. México, D. F. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Herstad HK, Nesheim BB, Lábee-Lund T, Larsen S, Skancke E. 2010. Effect of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis-a controlled Clinical trial. J small Animal. Pract. **51**: 34-38.
- Hoyos DA, Garcés BM, Perez D, Mattar VS. 2008. Utilidad de los microorganismos eficaces (EM) en una explotación avícola de Córdoba: parámetros productivos y control ambiental. Rev MVZ Córdoba, **13** (2): 1369-1379
- Hubalek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology, **46**: 205-229.
- Iyer C, Kailasapathy K. 2006. Effect of Co-encapsulation of probiotics with Prebiotics on increasing the viability of encapsulated Bacteria under in vitro acidic and bile salt. Journal of Food Science **70** (1), 18-23.
- Jeevaratman K, Jarnuna M, Bawa AS. 2005. Biological preservation of foods-bacteriocins of acid lactic bacteria. Indian Journal of Biotechnology, **4**, 446-454.

- Jounai k, Ikado K, Sugimura T, Ano Y, Braun J, Fujiwara D. 2012. Spherical lactic bacteria activate plasmacytoid dendritic cells immunomodulatory function via TLR9-dependent crosstalk with myeloid dendritic cells. *Plos One*. **7** (4).
- Karasov WH, Douglas AE. 2013. Comparative digestive physiology. *Compr physiol*, **3** (2), 741-783.
- Khoramnia A, Abdullah N, Liew SL, Sieo CC, Ramasamy K and Ho YW. 2011. Enhancement of viability of a probiotic lactobacillus strain for poultry during freeze-drying and storage using the response surface methodology. *Animal Science Journal*, **82**: 127-135.
- Koizumi S, Wakita D, Sato T, Mitamura R, Izumo T, Shibata H, Kiso Y, Chamoto K, Togashi Y, Kitamura H, nishimura T. 2008. Essential role of Toll-like receptors for dendritic cell and KK1.1 (+) cell-dependent activation of type 1 immunity by *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84. *Immunology Letters*, **120** (1-2): 14-19.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, **14**: 737-743.
- Lara MC, Cardona DJ. 2013. Effect of a probiotic biopreparation features on the production of bovine milk in Cordoba, Colombia. *Rev Bio Agro*, **11** (1): 75-80.
- Llorente BA. 1998. Evaluación de la producción de bacteriocinas de *Pediococcus acidilactici* bajo diferentes condiciones de cultivo. UNAM.
- Llorente BA. 2008. Caracterización de la actividad antibacteriana de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Facultad de Ciencias. México DF: UNAM.
- Malago JJ, Koninkx JFJG, Marinsek L. 2011. Probiotic Bacteria and Enteric Infections. Cytoprotection by Probiotic Bacteria. Springer Dordrecht Heidelberg. London New York, 221-250.
- Maldonado GC, Perdigón G. 2006. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces Activation of the Gut Mucosal Immune System . *CVI*, **13** (2): 219-226.
- Maldonado LJ. 2014. Nuevos ingredientes en las fórmulas para lactantes nacidos a término (I): Probióticos, prebióticos y simbióticos. *Acta Pediátrica Española*, **72** (3): 56-62.

- Marsella R. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG for the prevention of atopic dermatitis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **70**: 735-740.
- Marsella R, Santoro D, Arhrens K. Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term Clinical and immunological Effects. *Vet. Immunol.* **146**: 185-189.
- Marteau P, Seksik P, Jian R. 2002. Probiotics and Health: neu facts and ideas. *Curr. Op. Biotech.* **13**: 486-489.
- Martínez TMC. 2011. Evaluación *in vitro* de la actividad Antibacteriana del sobrenadante de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. En tesis de Maestría. Facultad de Estudios superiores Cuautitlán, UNAM.
- Martins R., De Oliveira SA, Taketomi EA, Hernandez BFJ. 2007. IgA production, coliforms analysis and intestinal mucosa morfology of piglets that received probiotics with viable or inactivated cells. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, **27**(6): 241-245.
- Mattar AF, Teitelbaum DH, Drongowski RA, Yongyi F, Harmon CM, Coran AG. (2002). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery*, **18**: 586-590.
- Metchnikoff E. 1907. Lactic acid inhibiting intestinal putrefaction. The prolongation of life: Optimistic Studies. Heinemann Press. United Kingdom, London, 161-183.
- Michail S, Sherman PM. 2009. Probiotics in pedriatic medicine. Humana Press USA, 56-58.
- Michail S. 2009. The role of probiotics in allergic diseases. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, **5** (5): 1-7
- MinTze L. 2011. Probiotics Biology, Genetics and Health Aspects. Springer Verlag. Berlin Heidelberg, 140-160.
- Mohammadi M. 2013. Probiotics and cáncer. *Journal of Biology and today's world*, **2** (4): 2002-209.
- Möndel M, Schroeder BO, Zimmermann K, Huber H, nuding S, Beisner J, Fellermann K, Stange EF, Wehkamp J. 2009. Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human β -defensin synthesis and fecal excretion in humans.

- Moreno BR, Salas OE, Pérez MC, Jiménez JM. 2013. Immunomodulating capacity of potentially probiotic *Lactobacillus* strains isolated from human breast milk and lactating children feces. *RSVM*, **33**: 24-27.
- Mortaz E, Adcock IM, Folkerts G, Barnes PJ, Voz PA, Garssen J. 2013. Probiotics in the Management of Lung Diseases. 1-10.
- Mozzi F, Raya RR & Vignolo GM. 2010. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel applications. WILEY Blackwell, 125-138.
- Mozzi F, Raya RR & Vignolo GM. 2016. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel applications. WILEY Blackwell, 144-146.
- Munguía VPM. 2015. Evaluación de la actividad antagónica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la expresión de algunos factores de virulencia de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027. UNAM.
- Nes IF, Yoon SS, Diep DB. 2007. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a Review. *Food Science Biotechnology*, **16**(5), 657-690.
- Ohland CL, MacNaughton WK. 2010. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **298**: 807-819.
- Parra HR. 2010. Review. Bacterias Acido Lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, **8** (1): 93-105.
- Pérez LH, Bueno GG, Brizuela HA, Tortoló CK, Gastón PC. 2013. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. **47** (1): 14-25.
- Ramírez B, Zambrano OS, Ramírez P, Rodríguez V, Morales M. 2005. Evaluación del efecto probiótico del bacillus spp. Origen aviat en pollitas de inicio de remplazo de la ponedora comercial en los primeros 42 días de edad. *REDVET*, **6** (9).
- Ramírez RJC, Rosas UP, Velázquez GMY, Ulloa JA, Arce RF. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista fuente*, **7** (2).
- Randolph D. 2013. Probiotics and human Health. *MediCiego*, **19** (2): 1-13.

- Rivera QJ. 2004. Evaluación del efecto de Bioconservación en salami al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como cultivo iniciador. En *Tesis de maestría en microbiología*. Cuautitlán Izcalli, Edo. México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- Rokka SR. 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: Changes for industrial applications. *Eur Food Res Technol*, **231**: 1-12.
- Sabo SS, Vitolo M, Gonzalez JD, Oliveira RS. 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, **64**: 527-536.
- Schlee M, Harder J, Köten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K. 2008. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte β -defensin 2. *Clinical and Experimental Immunology*, **151** (3): 528-535.
- Schleifer KH, Ehrmann M, Beimfohr C, Brockmann E, Ludwig W, Amann R. 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria, **5** (8): 1081-1094.
- Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yenng HP, Ngo PSC, Gonlet J, Tompkins TA. 2005. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun*, **73**: 5183–5188.
- Shimada MA, Rentería FA. 2010. Sección IX. Fisiología digestiva. UNAM. 515-563.
- Slover CM, Danzinger L. 2008. *Lactobacillus*: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter*. **30** (4): 23-27.
- Sorrondegui MG, López DV, Carcassés VA. 2012. Empleo de probióticos en animales. *Sitio Argentino de Producción*, 1-8.
- Stenman LK, Waget A, Garret C, Klopp P, Burcelin R, Lahtinene S. 2014. Potential probiotic *Bifidobacterium animalis* spp *lactis* 420 prevents weight and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Beneficial microbes*, **5** (4): 437-445

- Timmerman HM, Mulder L, Everts H, Van Espen DC, Van Der Wal E, Klaassen G, Rouwers SM, Hartemink R, Rombouts FM, Beynen AC. 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics, **88** (6): 54-65.
- Tissier H. 1906. Traitement des Infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. CR. Soc Biol, **60**: 359-361.
- Vilà B, Fontgibell A, Badiola I, Esteve Garcia E, jimenez G, Castillo M, Brufau J. 2009. Reduction of Salmonella entérica var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusión in poultry feeds. Poultry Science, **88** (5): 975-979.
- Yang fengjuan, Wang Aina, Zeng Xiangfang, HouChengli, Liu Hong and Qiao Shiyan. 2015. *Lactobacillus reuteri* 15007 modulates tight junction protein expression in IPPE-J2 cells with LPS stimulation and in newborn piglets under normal conditions. BMC, **15** (32).
- Yuyama T, Takai S, Tsubaki S, Kado Y, Morotomi M. 2004. Evaluation of a host-specific Lactobacillus Probiotic in training-hourses and neonal foals. Journal of intestinal Microbiology, **18** (2): 101-106.
- Zhang J, Liu G, Li P, Qu Y. 2010. Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat. Food Control, **21** (2), 198–202.

ANEXOS

Anexo 1

Cuadro 12 Medio MRS formulado modificado por Llorente (1998)

Ingrediente	g L⁻¹	Proveedor
Peptona proteosa	10.0	Becton, Dickinson and Company, USA
Extracto de carne	10.0	Becton Dickinson de México
Extracto de Levadura	5.0	Becton Dickinson de México
Sacarosa	10.0	Mallinkrodt
Monooleato de polisorbitán 80 (Tween)	1.0	J.T. Baker, México
Citrato de amonio	2.0	J.T. Baker, México
Acetato de sodio	5.0	Meyer, México
Sulfato de magnesio	0.1	J.T. Baker, México
Sulfato de manganeso	0.05	J.T. Baker, México
Fosfato dipotásico	2.0	J.T. Baker, México
Ácido ascórbico	1.0	J.T. Baker, México

Anexo 2

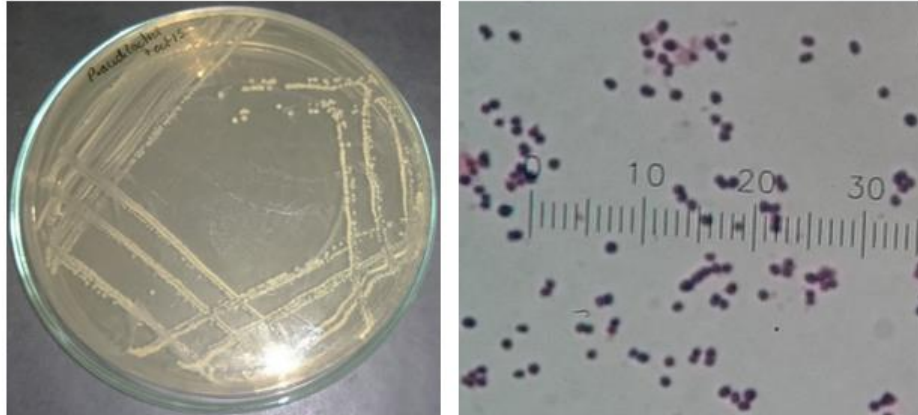


Figura 13 Características de *P. acidilactici*. En cuanto a la observación macroscópica del cultivo en agar se observan colonias color blanco con formas redondeadas, bordes lisos y convexas de aproximadamente 2 a 3 mm de diámetro. En la observación en microscopio se aprecian cocos Gram (+) dispuestos en tétradas o pares.

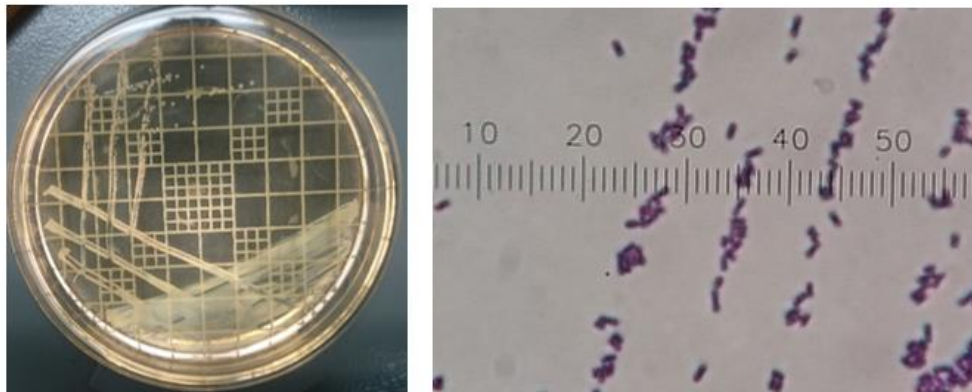


Figura 14 Características de *L. plantarum*. En el cultivo de agar se observaron colonias color blanco, con forma circular, convexas, bordes lisos y con un diámetro promedio de 1.5 mm. En la tinción de gram y observación bajo microscopio se hallaron bacilos Gram (+) con un tamaño promedio de 2-3 μm de largo.

Anexo 3

Cuadro 13 Secuencia de los primers utilizados para la identificación de *P. acidilactici* ATCC 8042

Primer	Nomenclatura	pb	Sequence (5' 3')
<i>Pac</i>	S-S-P.pent-67 <i>pentosaceus</i>)-a-S-22	(P.	CGAACTTCCGTTAATTGATTAT
<i>Ppe</i>	S-S-P.acid-69 (<i>P. acidilactici</i>)- a-S-22		CGAACTTCCGTTAATTGATCAG
<i>Pu</i>	S-*-Lab-940 (<i>P. acidilactici</i>)-a- A-18	872	ACCTTGCGGTCGTACTCC
<i>ldhDF</i>	ldh-S-P.acid-1192(<i>P. acidilactici</i>)-a-S-20		GGACTTGATAACGTACCCGC
<i>ldhDR</i>	ldh-S-P.acid-1640 <i>acidilactici</i>)-b-A-20	(P. 449	GTTCCGTCTTGCATTTGACC

Fuente: Mora et al., 1997

Cuadro 14 Secuencia de los primers utilizados para la identificación de *L. plantarum*

Primer	(pb)	Secuencia (5' → 3')
LbLMA1-rev	250	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC
R16-1		CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA
PentF	218	CAG TGG CGC GGT TGA TAT C
PlanF	318	CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA
PRev		TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC

Fuente: Dubernet et al., 2002; Terriani et al., 2001

Anexo 4

Cuadro 15 Cinética de crecimiento de la cepa *P. acidilactici*

Tiempo (h)	Log (UFC/mL)	D.O.
0	6.96 ± 0.23	0.035 ± 0.001
4	7.62 ± 0.18	0.451 ± 0.22
8	8.61 ± 0.12	1.077 ± 0.07
12	8.67 ± 0.13	1.160 ± 0.05
16	8.77 ± 0.05	1.129 ± 0.04
20	8.80 ± 0.04	1.123 ± 0.01
24	8.79 ± 0.07	1.100 ± 0.05

Cuadro 16 Cinética de crecimiento de la cepa *L. plantarum*

Tiempo (h)	Log (UFC/mL)	D.O.
0	7.93 ± 0.04	0.21 ± 0.01
4	8.76 ± 0.06	1.29 ± 0.11
8	9.59 ± 0.04	7.57 ± 0.30
12	9.70 ± 0.09	11.6 ± 0.70
16	9.75 ± 0.06	12.31 ± 0.74
20	9.77 ± 0.11	12.46 ± 1.05
24	9.77 ± 0.08	11.53 ± 1.08

Anexo 5

Cuadro 17 UFC/mL y viabilidad de las cepas microencapsuladas

Tratamientos	Cuentas viables (log ₁₀) UFC/perla		Viabilidad
	Antes	Después	%
	liofilización	liofilización	
<i>P. acidilactici</i>			
Control	6.88±0.10	6.22±0.20	91.90±2.32 ^a
Células + Leche 10%	6.47±0.13	6.56±0.17	99.17±1.15 ^a
Alginato 2%	6.44±0.10	6.13±0.11	95.10±1.23 ^a
Alginato 2%/arabiga1%	6.35±0.09	5.95±0.17	93.67±2.72 ^a
Alginato 2%/arábiga2%	6.31±0.06	6.09±0.07	96.51±1.71 ^a
<i>L. plantarum</i>			
Control	7.23±0.23	5.49±0.71	81.13±7.69 ^b
Células + Leche 10%	7.13±0.14	6.99±0.20	97.40±2.47 ^a
Alginato 2%	6.97±0.16	6.24±0.48	89.44±6.02 ^{ab}
Alginato 2%/arabiga1%	6.85±0.30	6.15±0.59	89.63±4,89 ^{ab}
Alginato 2%/arábiga2%	6.86±0.31	6.14±0.56	88.86±9.88 ^{ab}

^{abc} letras diferentes en la misma columna muestran diferencia (P<0.05)