



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
MICROENCAPSULACIÓN DE AGENTES PROBIÓTICOS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ARTURO RUIZ TELLEZ

Tutora de Tesis:

Viridiana Gisela Llera Rojas



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2022



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor:	MAJLUF TREJO ANDREA SAORI
VOCAL:	Profesor:	LLERA ROJAS VIRIDIANA GISELA
SECRETARIO:	Profesor:	VILLANUEVA MARTINEZ NORMA ANGELICA
1er. SUPLENTE:	Profesor:	LEYVA GOMEZ GERARDO
2° SUPLENTE:	Profesor:	ZAMORA SALAZAR VERONICA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

SISTEMA BIBLIOHEMEROGRÁFICO DE LA UNAM

ASESOR DEL TEMA:

VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

SUSTENTANTE:

ARTURO RUIZ TELLEZ

CONTENIDO

RESUMEN	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Justificación	3
1.2 Objetivos	4
1.3 Metodología de la investigación	5
CAPÍTULO 2. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS	7
2.1 Una breve historia de los probióticos	7
2.2 Definición de probiótico	12
2.3 Características de los probióticos	13
2.4 Clasificación	17
CAPÍTULO 3. MICROENCAPSULACIÓN	20
3.1 ¿Qué es la microencapsulación?	20
3.2 Microcápsulas	21
3.3 Técnicas de microencapsulación	25
3.4 Aplicaciones de la microencapsulación	25
CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE LA MICROENCAPSULACIÓN EN MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS	28
4.1 Razones para microencapsular probióticos	28
4.2 Materiales utilizados en la microencapsulación de probióticos	29
4.3 Métodos de microencapsulación más utilizados para probióticos	31
CAPÍTULO 5. PRUEBAS DE CALIDAD	41
5.1 Análisis granulométrico y morfológico	41
5.2 Evaluación de la viabilidad de los probióticos	44
5.3 Análisis de propiedades fisicoquímicas	47
5.4 Evaluación de la eficiencia de encapsulación (EE)	51
5.5 Modelos <i>in vivo</i>	52
CAPÍTULO 6. PANORAMA ACTUAL	55
6.1 El mercado de la microencapsulación	55
6.2 Aspectos legislativos	56
6.3 Productos en el mercado	57

6.4 Conclusiones	65
REFERENCIAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características que debe cumplir un microorganismo para ser considerado un probiótico de acuerdo con la Guía Mundial de la Organización Mundial de Gastroenterología (Probióticos y prebióticos) y la Guía para la evaluación de probióticos en alimentos	16
Figura 2. Ejemplo de microcápsulas contenidas en una cápsula. Comparación de tamaños de una cápsula convencional y una microcápsula y las partes que la conforman	22
Figura 3. Diferentes tipos de morfología de las microcápsulas	23
Figura 4. Diferentes materiales de cobertura utilizados en microcápsulas clasificados según las propiedades hidrofílicas del material del núcleo	24
Figura 5. Diagrama del proceso de extrusión para la microencapsulación de probióticos	33
Figura 6. Diagrama del proceso para llevar a cabo la microencapsulación de probióticos mediante coacervación simple	35
Figura 7. Esquema del proceso de coacervación compleja utilizando un polímero aniónico y un polímero catiónico	35
Figura 8. Esquema de un equipo empleado para el método de secado por aspersión	37
Figura 9. Diagrama del proceso para realizar la microencapsulación de probióticos mediante el método de emulsificación	39
Figura 10. Esquema de un equipo granulométrico por difracción láser	43

Figura 11. Esquema de un equipo automático de granulometría por microscopía óptica	44
Figura 12. Esquema del Simulador del Ecosistema Microbiano del Intestino Humano (SHIME)	46
Figura 13. Modelo de la doble capa para partículas coloidales	49
Figura 14. Esquema de la instrumentación utilizada para determinar el potencial zeta mediante dispersión de luz electroforética	49
Figura 15. Comparación de los 2 tipos de DSC según su mecanismo de operación	51
Figura 16. Ejemplo de la metodología de un modelo in vivo, utilizada para el análisis de supervivencia de células de <i>L. casei</i> resistentes a eritromicina (<i>L. c^{Eri}</i>), microencapsuladas y libres, cuando son expuestas al sistema gastrointestinal de ratones SPF, con n=5 para ambos tratamientos	54
Figura 17. Comparación de los porcentajes de sistemas de liberación sí mencionados en suplementos probióticos contra los no mencionados. Estudio de mercado realizado por Lumina Intelligence	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación por género y especie de los microorganismos probióticos más utilizados	18
Tabla 2. Algunas de las aplicaciones de la microencapsulación utilizadas en la industria	27
Tabla 3. Materiales más empleados para microencapsular probióticos	30
Tabla 4. Diferencias reportadas entre las propiedades de las microcápsulas obtenidas por los métodos de extrusión, coacervación, secado por aspersión y emulsificación	40
Tabla 5. Rango de diversos métodos de cálculo de tamaño de partícula ..	41
Tabla 6. Descripción de los diferentes vasos del sistema SHIME y sus parámetros de operación	46
Tabla 7. Ejemplos de productos probióticos en el mercado con tecnología de microencapsulación y sus ventajas declaradas por el fabricante	59

RESUMEN

Los probióticos son un grupo de microorganismos vivos que aportan beneficios a la salud del hospedero, siendo su principal efecto benéfico la restauración de la microbiota intestinal. Estos microorganismos se encuentran agregados principalmente en suplementos alimenticios o se administran en formas farmacéuticas como tabletas, cápsulas o suspensiones. Sin embargo, al tratarse de células vivas, es indispensable asegurar su viabilidad a lo largo de todo el tiempo de vida del producto, desde que se manufactura y hasta llegar al consumidor.

Muchos de los productos que se encuentran en el mercado actual no aseguran que los probióticos sobrevivan en cantidades suficientes para poder ejercer su beneficio a la salud, es por ello por lo que en los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas para asegurar la viabilidad de los probióticos en los productos, entre los que destacan las microcápsulas.

El presente Trabajo Monográfico de Actualización desarrolla, en los capítulos 2, 3 y 4, la información más reciente que se tiene sobre probióticos y la tecnología de microencapsulación como, por ejemplo, los principales materiales y técnicas que se emplean, y cómo se han aplicado en los productos probióticos.

Además de conocer el fundamento de la tecnología de microencapsulación, es igualmente importante conocer las pruebas de calidad que deben cumplir las microcápsulas de probióticos para asegurar que los pacientes recibirán un producto seguro y eficaz. La revisión de las pruebas de calidad se encuentra en el capítulo 5.

Finalmente, en el capítulo 6 se estudia la situación actual en la que se encuentra la aplicación de la tecnología de microencapsulación en los principales productos probióticos comercializados.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación

Los probióticos son un grupo de microorganismos que, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se definen como “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, aportan un beneficio a la salud del hospedero” (Guarner, 2010). Debido a los beneficios que confieren estos microorganismos probióticos, similares a los que se encuentran habitualmente dentro de la microbiota humana, han sido objeto de estudio para tratar enfermedades gastrointestinales. Las formas farmacéuticas más comunes utilizadas para la administración de probióticos son las cápsulas y las tabletas recubiertas, sin embargo, las condiciones extremas a las que se enfrentan dentro del tracto digestivo como, por ejemplo, los ácidos gástricos, la presencia de peróxido de hidrógeno, sales biliares y enzimas digestivas (Sarao, 2017), resultan en una disminución considerable de la cantidad de microorganismos probióticos viables que llegan realmente a colonizar el tracto digestivo del paciente.

En la última década, para aumentar la supervivencia de los microorganismos probióticos en el ambiente gastrointestinal, se ha propuesto utilizar el método de microencapsulación ya que ha demostrado que los probióticos sobreviven más a las condiciones del tracto digestivo en comparación de los probióticos que se administran de forma libre. (Pech-Canul, 2020; Sarao, 2017).

Por lo anterior, se plantea hacer una revisión de la literatura reciente, de los últimos 10 años, sobre el uso de la tecnología de microencapsulación como propuesta de una forma farmacéutica más eficiente para emplearse en la administración de

probióticos, haciendo énfasis en las ventajas que brinda en comparación a los métodos convencionales, así como en los diferentes métodos, materiales y pruebas de calidad que se emplean en este proceso.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Realizar una revisión bibliográfica detallada sobre la tecnología de microencapsulación aplicada en los microorganismos probióticos.

1.2.2 Objetivos particulares

Objetivo 1. Definir y describir brevemente a los microorganismos empleados como probióticos y las características que requieren cumplir para ser considerados probióticos.

Objetivo 2. Explicar qué son las microcápsulas, cómo están constituidas, las técnicas de microencapsulación y sus aplicaciones.

Objetivo 3. Describir la aplicación de los principales materiales y técnicas de microencapsulación empleadas para microorganismos probióticos.

Objetivo 4. Indicar cuáles son las principales pruebas que se le realizan a las microcápsulas de probióticos para su evaluación de calidad.

Objetivo 5. Comprender cuál es el panorama actual de la aplicación de la tecnología de microencapsulación en probióticos.

1.3 Metodología de la investigación

Para realizar el presente Trabajo Monográfico de Actualización, se llevó a cabo una investigación desde un enfoque cualitativo, mediante una revisión bibliográfica exhaustiva de literatura existente y reciente, con una antigüedad no mayor a 10 años, principalmente de artículos científicos, artículos de revisión y libros especializados en los temas, para presentar de forma resumida y consistente la información más relevante.

La investigación se desarrolló en las siguientes etapas:

1. Elección y delimitación del tema del Trabajo Monográfico de Actualización.
2. Establecimiento de la estructura y capítulos del Trabajo Monográfico de Actualización.
3. Planteamiento de la justificación y los objetivos.
4. Búsqueda exhaustiva, en revistas nacionales e internacionales y libros especializados en materia de biología celular, microbiología y tecnología farmacéutica, limitando la búsqueda de bibliografía con una antigüedad no mayor a 10 años.
5. Redacción de cada capítulo con el siguiente contenido:

Capítulo 1: Introduce el tema de investigación presentando la justificación, el objetivo general, los objetivos particulares y la metodología de investigación empleada.

Capítulo 2: Aborda los antecedentes históricos de los probióticos, así como su definición, su clasificación y las características que deben cumplir para poder ser considerados microorganismos probióticos.

Capítulo 3: Desarrolla aspectos fundamentales para comprender qué son las microcápsulas y en qué consiste la tecnología de microencapsulación, abordando puntos como los principales métodos y materiales empleados y algunas de sus aplicaciones más relevantes en diferentes sectores de la industria.

Capítulo 4: Detalla la aplicación de la tecnología de microencapsulación en los microorganismos probióticos, como una propuesta de un sistema más eficiente para conservar la viabilidad de los microorganismos. Explica las metodologías de microencapsulación más utilizadas para probióticos y algunas diferencias que existen entre las microcápsulas obtenidas mediante cada método.

Capítulo 5: Describe las principales pruebas de calidad a las que deben someterse las microcápsulas de probióticos, con su respectivo fundamento, para asegurar la calidad del producto.

Capítulo 6: Plantea el panorama en el que se encuentra actualmente la aplicación de la tecnología de microencapsulación en probióticos, para conocer si ya existen productos probióticos en el mercado con esta tecnología. Finalmente se establecen las conclusiones de la investigación realizada.

CAPÍTULO 2. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

2.1 Una breve historia de los probióticos

Los microorganismos, desde su descubrimiento, han sido asociados con cosas dañinas para la salud del ser humano principalmente por ser responsables de algunas enfermedades o también por su evidente crecimiento en los alimentos cuando se encuentran en estado de descomposición. Sin embargo, este concepto es muy superficial y un tanto engañoso que prevalece aún hoy en día en la sociedad; los beneficios que aportan los microorganismos al ser humano resultan ser mayores que sus contribuciones desfavorables a la salud y un claro ejemplo de esto es la relación simbiótica que mantienen miles de millones de microorganismos todos los días en el cuerpo humano.

Se le conoce como microbiota intestinal humana, anteriormente denominada flora intestinal, al ecosistema microbiano que habita naturalmente el tubo digestivo (Icaza, 2013), del cual no se tenía conocimiento hasta hace unos años, y que cumple con funciones vitales para el ser humano como el suministro y la absorción de nutrientes, el desarrollo del sistema inmune e impedir que microorganismos potencialmente patógenos colonicen las mucosas (Suárez, 2013).

En las últimas décadas, se han encontrado microorganismos que comparten ciertas características con los microorganismos benéficos que se encuentran de forma natural en la microbiota intestinal, denominados probióticos. Sus propiedades han sido aprovechadas en beneficio de la salud, principalmente para tratar enfermedades gastrointestinales como: diarrea aguda, diarrea asociada a

antibióticos, infecciones por *Helicobacter pylori*, enterocolitis necrosante, entre otras (Wilkins, 2017). A pesar de ser reciente su descubrimiento, el ser humano ha tenido conocimiento de las propiedades benéficas de los probióticos desde hace muchos años sin saberlo. Se estima que la primera vez que el humano utilizó probióticos fue alrededor de los años 3500 y 2000 a.C., cuando aprendió a conservar la leche por más tiempo fermentándola con ayuda de bacterias y hongos, a pesar de ignorar la existencia de los microorganismos (Ozen, 2015). Una de las referencias más antiguas que se tiene en la literatura acerca de los probióticos está en el Génesis del Antiguo Testamento Persa, donde se le atribuía la larga longevidad de Abraham a su dieta que incluía leche agria (Olveira, 2016), que hoy en día se sabe que esta leche se obtiene por fermentación de bacterias. Incluso el uso de probióticos para tratar enfermedades fue sugerido por un antiguo historiador Romano llamado Plinio en el año 76 d.C., utilizando lácteos fermentados para el tratamiento de gastroenteritis. (Olveira, 2016).

El humano comenzó a incluir alimentos fermentados, especialmente lácteos, aproximadamente hace 10 000 años, con los cuales fue aumentando el consumo de bacterias ácido-lácticas vivas y adaptando poco a poco su tracto gastrointestinal para consumir estos microorganismos. Sin embargo, el consumo de muchos de los alimentos que incorporaban estas bacterias a la dieta diaria fue disminuyendo considerablemente durante el siglo XX en los países industrializados, lo cual posiblemente causó un aumento en las enfermedades gastrointestinales. (Olveira, 2016), de ahí el interés de los científicos en el último siglo para estudiar a los

probióticos como una posible solución a muchos de los problemas gastrointestinales de la población.

Con la invención y mejora del microscopio óptico de Anton Van Leeuwenhoek y Robert Hook, se abrieron las puertas al mundo microscópico, indispensable para el estudio de los probióticos. En el Instituto Pasteur, se llevaron a cabo grandes avances microbiológicos de los probióticos, por ejemplo, el descubrimiento de las bacterias ácido-lácticas en 1875 por Pasteur y que posteriormente fue reportado su asilamiento de la leche agria en 1878 por Lister (Ozen, 2015). Henry Tissier, un médico pediátrico del Instituto Pasteur aisló a *Bifidobacterium spp* en 1889 de un lactante alimentado a pecho con el objetivo de utilizar esta bacteria para tratar otros lactantes con diarrea (Guarner, 2017). En 1908, el premio Nobel Elie Metchnikoff, tras haber estudiado las bacterias ácido lácticas, propuso que la “autointoxicación intestinal” con estas bacterias era buena para la salud y que la modificación de la microbiota intestinal, podría otorgar una mayor longevidad, diseñando así una dieta con leche fermentada obtenida con una bacteria que nombró como “Bacilo Búlgaro” y por ello es considerado por muchos autores como el padre de la idea de que los probióticos son buenos para la salud (Guarner, 2017). Sin embargo, otros científicos también reconocen al físico Búlgaro, Stamen Grigorov, como el verdadero autor del trabajo de Metchnikoff ya que reportó antes que el científico ruso, en 1905, en una prestigiosa revista francesa, un bacilo ácido láctico aislado del yogurth búlgaro y fue el propio Grigorov quien compartió su trabajo con Metchnikoff pero, por cuestiones personales, no pudo continuar con su trabajo realizado y Metchnikoff fue encomendado por el Instituto Pasteur para enfocarse en trabajar con la bacteria

reportada por el Búlgaro, que posteriormente sería conocida como *Lactobacillus bulgaricum*, en reconocimiento al trabajo de Grigorov (Ozen,2015).

Alfred Nissle aisló el primer probiótico que no pertenecía al grupo de las bacterias ácido-lácticas, una cepa de *Escherichia coli* no patogénica obtenida de las heces de un soldado en la Primera Guerra Mundial, denominada “*Escherichia coli* cepa Nissle 1917”, resultando ser uno de los pocos probióticos no ácido-lácticos en la actualidad (Guarner, 2017). Uno de los probióticos más conocidos hoy en día, la cepa de *Lactobacillus casei* Shirota, fue aislada por el Dr. Minoru Shirota en 1930, y en 1953, se comercializó el primer producto probiótico utilizando esta cepa para fermentar una bebida que contiene leche descremada, sacarosa y dextrosa, mejor conocida como Yakult® (Argueta, 2014).

La palabra “probiótico” no fue acuñada sino hasta 1965 por Lilley y Stillwell para referirse a las sustancias que eran secretadas por los mismos microorganismos y que estimulaban el crecimiento de otros (Pizzorno, 2017). Posteriormente en 1974, este término fue redefinido por Parker como “*organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal*” (Parker, 1974).

En un contexto más reciente, los probióticos han sido muy importantes comercialmente para la industria farmacéutica y alimenticia debido al aumento en la demanda de estos productos, lo que sugiere que las personas cada vez son más conscientes sobre los beneficios que brinda la incorporación de los probióticos a su dieta (Rodríguez, 2015). Asimismo, los estudios científicos y clínicos han sido de suma importancia para el desarrollo tecnológico de los probióticos ya que, al ser organismos vivos, requieren de ciertos cuidados como mantener las condiciones

óptimas para desarrollarse y al mismo tiempo, deben estar protegidas para sobrevivir al proceso de manufactura y a las condiciones extremas a las que serán expuestas en el sistema digestivo (Rathore, 2013).

Desafortunadamente, debido a la falta de un consenso internacional que establezca las características que debe cumplir un producto probiótico para asegurar sus beneficios, algunas empresas se beneficiaron del gran auge de los probióticos, promocionando y vendiendo productos que no tenían ningún sustento científico. No fue hasta el año 2001 que se establecieron las bases para evaluar la seguridad y eficacia de los probióticos, gracias al trabajo en conjunto de una comisión de expertos convocados por la Organización Mundial de la Salud para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), que tenían como objetivo solucionar un litigio de comercio internacional sobre una leche en polvo que contenía bacterias ácido-lácticas y que definían como “probiótico” (Morelli, 2012). Dando seguimiento al trabajo realizado por la comisión, en el 2002 la FAO y la OMS, en conjunto con un grupo de expertos, establecieron los requerimientos mínimos para que un producto pueda ser denominado como probiótico. Dichos documentos, complementados con las actualizaciones de los consensos de la ISAPP, Internacional Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (Guarner, 2014) y de la SEPyP, Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (Hill, 2014), representan hoy en día la principal referencia internacional para definir a un probiótico (Rodríguez, 2015).

2.2 Definición de probiótico

La palabra probiótico proviene de una mezcla del latín (pro= en favor de) y del griego (bios=vida) (Morelli, 2012) y fue utilizada por primera vez en 1965 por Lilley y Stillwell para referirse a un tipo de sustancias que eran secretadas por los microorganismos y que a su vez estimulaban el crecimiento de otros como un efecto contrario al de los antibióticos. (Pizzorno, 2017). Este concepto fue redefinido por Parker en 1974 como *“organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal”* (Parker, 1974). La definición fue cambiando constantemente teniendo diversos enfoques; en 1989, Fuller centró esta definición para microorganismos refiriéndose a los probióticos como *“un alimento microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su balance intestinal”*, sin embargo, esta definición se limitaba únicamente a su uso en animales y no en humanos. (Fuller, 1989), lo cual se modificó gracias a la definición de Havenaar. *“un cultivo viable de una o varias bacterias que, cuando se aplican en animales o humanos, afectan beneficiosamente al huésped mejorando su flora autóctona”* (Havenaar, 1992).

La definición actual y más aceptada en la comunidad científica del término probiótico fue propuesta en el 2001 por un comité de expertos convocado por la FAO y la OMS, estableciendo que los probióticos son:

“Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped”.

2.3 Características de los probióticos

Si bien esta definición puede parecer muy general, no cualquier especie de microorganismo cumple con la definición de probiótico. Todos los años, miles de cepas son aisladas como presuntas candidatas de probióticos, pero son muy pocas las que pasan a la fase de desarrollo comercial y convertirse en productos comerciales (Rodríguez, 2015).

Para que un microorganismo sea denominado como probiótico, debe cumplir con ciertos requisitos para asegurar que son aptos para consumirse y consecuentemente otorgar el efecto beneficioso (**figura 1**).

2.3.1 Resistencia al tracto digestivo y capacidad colonizante.

La mayoría de los microorganismos probióticos son seleccionados por su resistencia a las condiciones gastrointestinales y su capacidad para colonizar al ser humano ya que todos los probióticos tiene que viajar a través del tracto digestivo superior y colonizar el intestino (Yao, 2019). Estos mecanismos provocan un cambio en el ecosistema intestinal del huésped, reflejado como una mejora del ambiente intestinal, a través del reforzamiento de la barrera intestinal, la regulación negativa de la inflamación y la regulación positiva de la respuesta inmunitaria a provocaciones antigénicas (Guarner, 2017).

Se han propuesto algunos mecanismos de acción para los probióticos mediante los cuales ejercen su efecto benéfico, por ejemplo, que los microorganismos compiten y reemplazan algunas células del intestino para colonizarlo y así evitan la unión de los patógenos que necesitan de las células epiteliales para adherirse. Otro

mecanismo implica la unión de los probióticos a las células del epitelio intestinal para impedir que los patógenos se adhieran a las mucosas. (Khalighi, 2016). Más recientemente se ha planteado la idea de que los beneficios que aportan los probióticos no reside en su habilidad para colonizar el intestino, si no en su capacidad de compartir genes y metabolitos que benefician a la microbiota, así como a las células epiteliales e inmunológicas (Wieërs, 2020).

Con base en los mecanismos de acción propuestos, se busca que los probióticos cumplan con características que les permitan sobrevivir y llegar al órgano diana, generalmente son ácido-bilis resistentes y cuentan con estructuras de adherencia que les permiten colonizar el epitelio intestinal (Sarao, 2017).

2.3.2 Seguridad

Es esencial que los microorganismos utilizados como probióticos no representen un riesgo a la salud de los pacientes, de otro modo no podrían ser utilizados en alimentos o medicamentos. Las cepas propuestas deben ser no patogénicas, es decir, no deben tener genes asociados a factores de virulencia y tampoco deben producir metabolitos secundarios indeseables. Todo microorganismo que sea seguro para los pacientes debe cumplir con el estatus GRAS (Generally, Recognized as Safe) de la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos y QPS (Qualified Presumption of Safety) de la EFSA (European Food Safety Authority) (Rodríguez, 2015; Sarao, 2017).

2.3.3 Beneficios a la salud asociados.

Como su definición lo establece, para ser considerado un probiótico este debe contar con la evidencia científica que respalde los beneficios a la salud del huésped, para ello se deben realizar ensayos *in vitro*, en animales y posteriormente estudios en humanos (Olveira, 2016). Si bien los ensayos *in vitro* y *ex vivo* nos brindan información sobre el potencial probiótico que puede tener un microorganismo, son los ensayos clínicos de fase 2 y 3 los que establecen si el probiótico ejerce su efecto benéfico sobre el huésped, además de que es en estos estudios donde se identifican los posibles efectos adversos o cuadros clínicos asociados al probiótico en prueba (Rodríguez, 2015; Suarez, 2013).

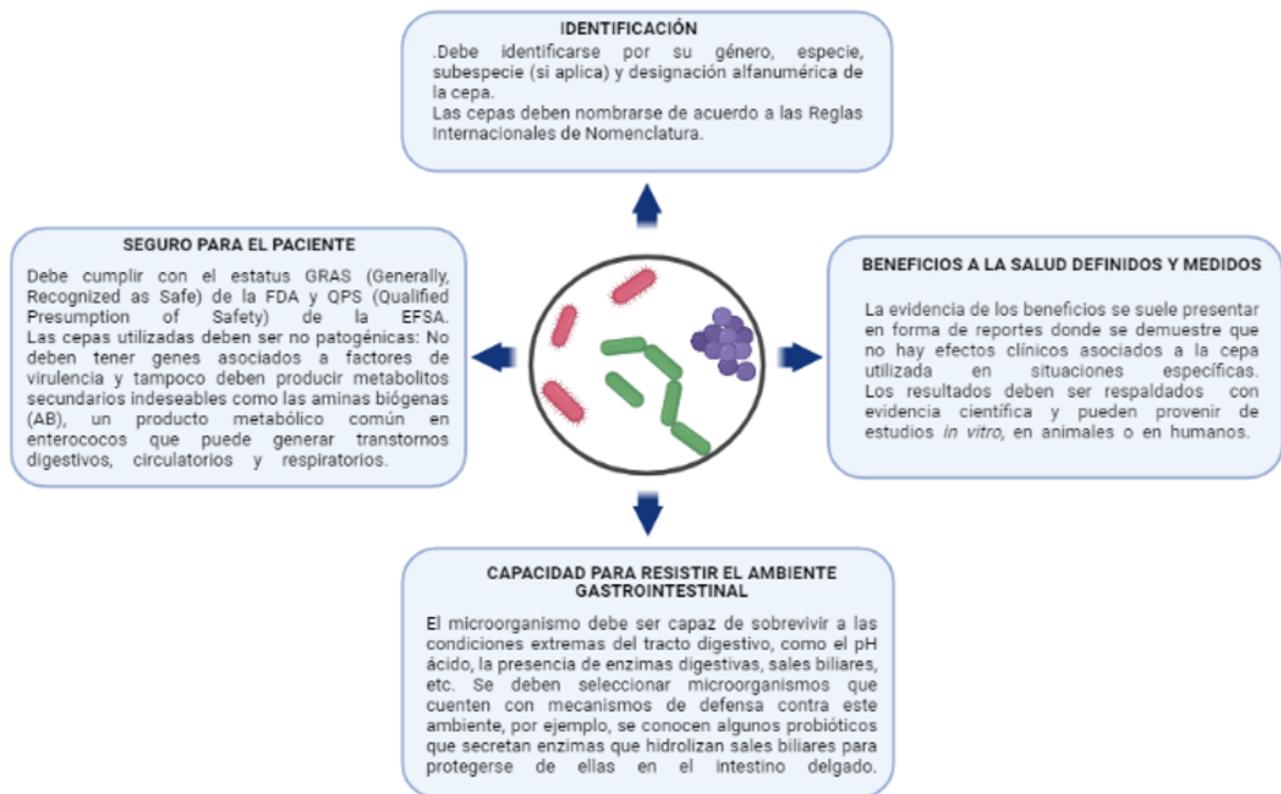
La mayoría de los estudios realizados en humanos han sido para el tratamiento de diferentes enfermedades gastrointestinales (Wilkins, 2017), sin embargo, hay evidencia de que los beneficios asociados a los probióticos tienen un gran potencial para tratar diversas complicaciones como enfermedades hepáticas, enfermedades metabólicas, obesidad, diabetes, deficiencia en la absorción de calcio, complicaciones en pacientes con cuidados intensivos y quirúrgicos, enfermedades inflamatorias e incluso en complicaciones psiquiátricas. (Olveira, 2016; Wieërs, 2020).

2.3.4 Identificación

Debe tener una correcta identificación a nivel de género, especie y cepa; la OMS/FAO establece que las cepas deben nombrarse de acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura y sugiere a los fabricantes de probióticos registrar

sus cepas en un depositario internacional donde se le otorgará una designación adicional a las cepas (Guarner, 2017). Incluir un microorganismo dentro de un depositario internacional les permite a otros científicos acceder a estas cepas para realizar sus investigaciones correspondientes y es importante que su identidad sea trazable, sobre todo cuando se requieren realizar estudios de seguridad y eficacia, ya que toda la información relacionada a identidad, seguridad, eficacia, pureza o secuencia genética debe ser clara, precisa y pública. (Swazon, 2020).

Figura 1. Características que debe cumplir un microorganismo para ser considerado un probiótico de acuerdo con la Guía Mundial de la Organización Mundial de Gastroenterología (Probióticos y prebióticos) y la Guía para la evaluación de probióticos en alimentos. Creación propia, referencia: (OMS/FAO, 2006).



2.4 Clasificación

Como resultado de los requisitos que debe cumplir un microorganismo para tener el estatus de probiótico, el grupo de estudio se ve considerablemente reducido a unos cuantos géneros, en comparación a la gran diversidad de microorganismos que se conocen, que cumplen con dichas características. Por definición, todo “microorganismo” puede ser considerado probiótico, sin embargo, hasta la fecha sólo se han identificado bacterias y levaduras que cumplen con este concepto, siendo en su mayoría bacterias ácido-lácticas del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que han demostrado ser muy seguras y que rara vez se ven involucradas en enfermedades, y unas cuantas levaduras del género *Saccharomyces* (Sarao, 2017; Suárez, 2013). Gracias a la exhaustiva caracterización de ciertas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que incluyen estudios genómicos, se han podido utilizar como modelo para la investigación de probióticos de nueva generación como *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii* (Wieërs, 2020, Hiipala, 2018).

Actualmente son varias las especies que han sido utilizadas como agentes probióticos, a continuación, en la **tabla 1** se presentan algunos de los probióticos más utilizados clasificados por su género y especie:

Tabla 1. Clasificación por género y especie de los microorganismos probióticos más utilizados. Creación propia.

Género	Especie	Características fisiológicas/metabólica	Aplicación terapéutica	Forma comercial	Referencia
<i>Lactobacillus</i>	<p><i>acidophilus</i> <i>casei</i> <i>paracasei</i> <i>thamnosus</i> <i>lactis</i> <i>paracasei</i> <i>fermentum</i> <i>reuteri</i></p>	<p>Bacilos Gram positivo. Fermentación de carbohidratos y producción de ácido láctico, anaerobias facultativas en el tracto gastrointestinal y urinario del humano. Alta adhesión a las células del huésped por interacciones mediadas por proteínas dependientes del sistema de sortasa., proteínas de unión a mucosas y ácido lipoteicoico. Síntesis de vitaminas esenciales como B2, B9 y B12.</p>	<p>-Enfermedades inflamatorias. -Diarreas: Causada por <i>Escherichia coli</i>, asociada a antibióticos, asociada a <i>Clostridium difficile</i>. -Enfermedades orales: Hemorragia al sondaje, halitosis, gingivitis.</p>	<p>-Productos lácteos (Actimel®), -Tabletas (Lacidofil®) -Óvulo (Lactinex®). -Fórmulas infantiles (Nestlé® NAN Optipro). -Suspensión (Protectis® BioGaia).</p>	<p>Zhang, Z., Lv, J., Pan, L., & Zhang, Y. (2018). Roles and applications of probiotic <i>Lactobacillus</i> strains. <i>Applied microbiology and biotechnology</i>, 102(19), 8135-8143.</p>
<i>Bifidobacterium</i>	<p><i>bifidum</i> <i>infantis</i> <i>breve</i> <i>longum</i> <i>adolescentes</i> <i>animalis</i> <i>lactis</i></p>	<p>Bacilos Gram negativo, pleomórficos (forma en Y o V), anaerobios y ácido resistentes. Característica producción de ácido láctico y ácido acético como principales productos de degradación de la glucosa. Cuenta con varias proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, incluyendo carbohidratos complejos que normalmente no son digeridos en el intestino delgado.</p>	<p>Enterocolitis necrosante y colitis ulcerativa. -Cólicos en infantes -Diarrea aguda y asociada a antibióticos. -Obesidad (Incrementar la tolerancia a la glucosa y disminuir citoquinas proinflamatorias). -Enfermedades neurológicas/psiquiátricas en infantes (ansiedad e hiperactividad).</p>	<p>-Fórmulas infantiles (Culturrelle®, Probiotics, Baby, Grow+Thrive). -Tabletas masticables (Microbiot®). -Cápsulas (Pearls®). -Bebida Láctea (Keifir®).</p>	<p>Mazzola, G. (2015). The role of bifidobacteria in newborn health and the intestinal microbial balance.</p>
<i>Bacillus</i>	<p><i>coagulans</i> <i>clausii</i> <i>ceruus</i> <i>subtilis</i> <i>licheniformis</i></p>	<p>Bacilos Gram Positivo, aerobios facultativos, formadores de esporas que le permiten sobrevivir mejor a las condiciones de almacenamiento y al pH gástrico sin perder su viabilidad en comparación de aquellos probióticos que no forman esporas. Además, las esporas presentan una mayor adherencia a la superficie epitelial que la forma vegetativa de la célula. Puede estimular el sistema inmunológico del huésped promoviendo la secreción de inmunoglobulinas IgA secretorias (sIgA) y la actividad fagocítica de los macrófagos.</p>	<p>-Enterocolitis necrosante -Activación inmunológica -Prevención de Diarrea infantil y asociada a antibióticos. -Tratamiento y prevención de infecciones gastrointestinales causadas por <i>H. pylori</i>. Y <i>C. perfringens</i>.</p>	<p>-Enterogermina -Suplemento alimenticio (Primal Defense™). -Suspensión (Enterogermina®) -Cápsulas (Bactsubtil®, Biosporin®). -Productos lácteos (Activia®)</p>	<p>Cutting, S. M. (2011). <i>Bacillus</i> probiotics. <i>Food microbiology</i>, 26(2), 214-220.</p>

Género	Especie	Características fisiológicas/metabólicas	Aplicación terapéutica	Forma comercial	Referencia
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>faecium</i> <i>cecorum</i>	Cocos Gram Positivo con agrupación en diplo y estreptococos, consideradas bacterias ácido-lácticas. Presenta tolerancia a sales, ácidos y bilis que lo vuelve ideal para resistir el ambiente gastrointestinal. Es capaz de producir una gran variedad de compuestos antimicrobianos como bacteriocinas (enterocinas) que inhiben Gram positivos, especialmente al género <i>Listeria</i> .	-Tratamiento de infecciones gastrointestinales causadas por <i>H. pylori</i> , <i>L. monocytogenes</i> , y <i>C. difficile</i> . -Diarrea asociada a antibióticos. -Reducción de niveles de colesterol en sangre. -Síndrome del Intestino Irritable. -Enterocolitis necrosante.	-Suplementos alimenticios para animales (Cerniver®, Fortiflor®). -Suplementos alimenticios para humanos (Symbioflor®).	Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018). The genus <i>Enterococcus</i> : between probiotic potential and safety concerns—an update. <i>Frontiers in microbiology</i> , 9, 1791.	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>boulardii</i> <i>florentinus</i> <i>thermophilus</i>	Hongo levaduriforme capaz de formar pseudohifas e hifas verdaderas, capaz de fermentar varios carbohidratos y constituye el grupo de hongos patógenos oportunistas más importante cuyo principal lugar de colonización es el tracto digestivo abarcando desde la boca hasta el ano.	-Tratamiento de Enfermedades gastrointestinales causadas por <i>H. pylori</i> y <i>C. difficile</i> . -Síndrome de colon irritable. -Diarrea causada por uso crónico de antibióticos, diarrea asociada a <i>C. difficile</i> , diarrea del viajero. -Tratamiento de candidiasis vulvovaginal.	-Cápsulas (Florastor®, MitoMax®). -Liofilizado (Ultra-Levure®). -Bebida con probióticos (Kombucha fermented tea®). -Solución oral en gotas (Proteflor®).	McFarland, L. V. (2010). Systematic review and meta-analysis of <i>Saccharomyces boulardii</i> in adult patients. <i>World Journal of Gastroenterology</i> : 16(18), 2202.	
<i>Streptococcus salivarius</i> <i>thermophilus</i>	Cocos Gram positivos con agrupación en cadenas Largos o en pares, anaerobios facultativos, oxidasa y catalasa negativos; son capaces de fermentar algunos carbohidratos produciendo ácido láctico y cuentan con propiedades hemolíticas. Forman parte de la microbiota de la boca, piel, intestino y tracto respiratorio.	-Prevención de caries	-Fórmula infantil (Hyperbiotics PRO-KIDS ENT). -Cápsulas (Probiotic-10).	Wescombe, P. A., Hale, J. D., Heng, N. C., & Tagg, J. R. (2012). Developing oral probiotics from <i>Streptococcus salivarius</i> . <i>Future microbiology</i> , 7(12), 1355-1371.	

CAPÍTULO 3. MICROENCAPSULACIÓN

3.1 ¿Qué es la microencapsulación?

Un fármaco requiere de un adecuado sistema de administración y liberación que le permita ejercer su máximo efecto terapéutico sobre el organismo. Para ello, se han desarrollado múltiples formas farmacéuticas para los medicamentos que aseguren una adecuada administración y liberación; se escoge con base a las características fisicoquímicas del fármaco, así como el sitio de acción del fármaco, la concentración en plasma que se desea obtener, el tiempo que requiere para ejercer su efecto, entre otros aspectos biofarmacéuticos.

Las formas farmacéuticas convencionales como las tabletas, cápsulas, suspensiones, cremas, inyectables, no son capaces de asegurar por completo una adecuada absorción, liberación y acceso al sitio de acción del fármaco, y no pueden prevenir una distribución no específica del fármaco o un metabolismo prematuro de la sustancia activa (Sinko y Singh, 2011). Para dar solución a los inconvenientes que pueden presentar las formas farmacéuticas convencionales, se comenzaron a desarrollar sistemas de liberación controlada cuyo principal objetivo es controlar el tiempo de liberación del fármaco que puede ser en periodos de días o incluso meses y mantener durante más tiempo la concentración máxima en sangre, además de brindar numerosos beneficios con los que no cuentan los sistemas convencionales como una mayor protección para los medicamentos frágiles o lábiles y una mayor comodidad y aceptación por parte del paciente (Bhowmik, et al., 2012).

Una de las tecnologías empleadas recientemente para el desarrollo de formas farmacéuticas de liberación controlada es la microencapsulación cuyo proceso consiste en formar microcápsulas de entre 1 y 1000 μm , cubriendo pequeñas partículas líquidas o sólidas de una o más sustancias activas con una matriz polimérica o lipídica que puede ser homogénea o heterogénea (Sobel, Versic y Gaonkar, 2014).

3.2 Microcápsulas

Las microcápsulas pueden definirse como sistemas de tipo reservorio, constituidas principalmente por 2 partes claramente diferenciadas: un núcleo interno que contiene el compuesto activo y una membrana de revestimiento que generalmente es de naturaleza polimérica como el alginato. Pueden tener un único núcleo (microcápsulas mononucleares) o varios núcleos (Microcápsulas polinucleadas). Estas microcápsulas también pueden ser utilizadas para fabricar comprimidos (Ej. Beloken retard®) o pueden introducirse en cápsulas (Ej.: Kadian, Zohydro ER®) para facilitar su administración (Bordas, 2018; Pérez, et al., 2020), como se observa en la **figura 2**:

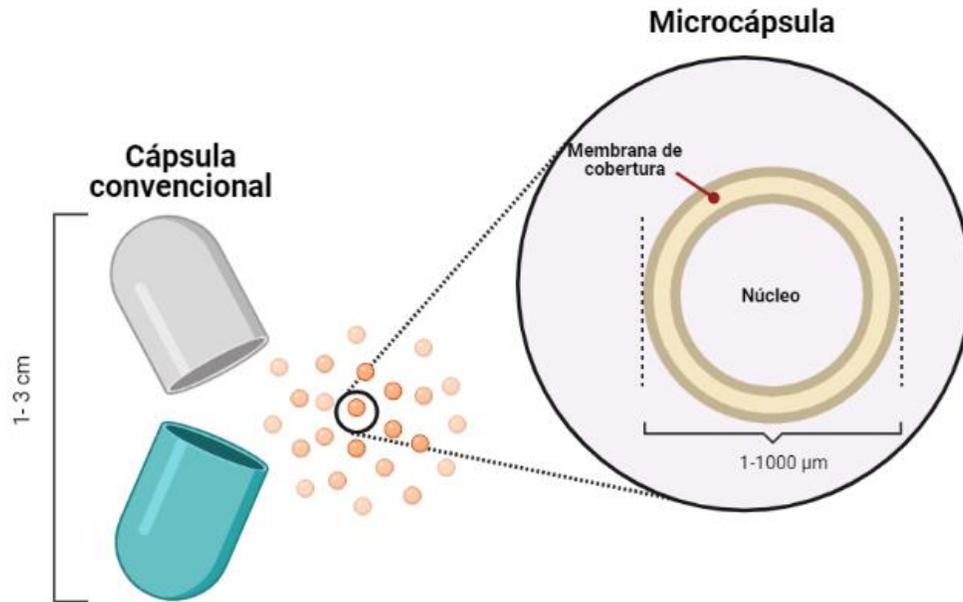


Figura 2. Ejemplo de microcápsulas contenidas en una cápsula. Comparación de tamaños de una cápsula convencional y una microcápsula y las partes que la conforman. Creación propia, referencia: (Bordas, 2018).

3.2.1 Tipos de morfología

Existen diferentes tipos de morfologías en las microcápsulas que están en función del tipo de núcleo y del proceso de fabricación (Jyothi, et al., 2012). La forma más sencilla y común es la microcápsula mononucleada, cuyo núcleo y membrana están bien definidas y tienen una forma esférica. También existen microcápsulas con más de un núcleo que se conocen como multinucleadas, anteriormente denominadas microesferas o encapsulación de matriz, estas pueden presentar formas irregulares y no esféricas. Por último, algunas microcápsulas no cuentan con un núcleo bien definido, más bien, se forma una esfera con la mezcla homogénea del material de recubrimiento y la sustancia activa de interés que incluso se puede llegar a

encontrar sobre la superficie de la microcápsula y no en el interior, lo que limita mucho sus aplicaciones porque puede considerarse como una microencapsulación incompleta (Sobel, Versic y Gaonkar, 2014). Algunos autores clasifican a este último tipo de microcápsula como microcápsula de matriz, sin embargo, otros autores prefieren el término de microesfera o utilizan ambos términos indistintamente (Bah, Bilal y Wang, 2019). En la **figura 3** se pueden observar las distintas morfologías que puede tener una microcápsula en función del tipo de núcleo contenido:

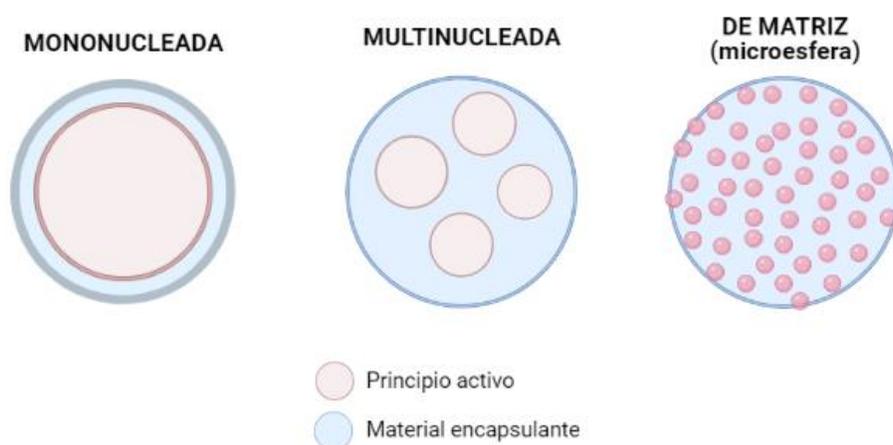


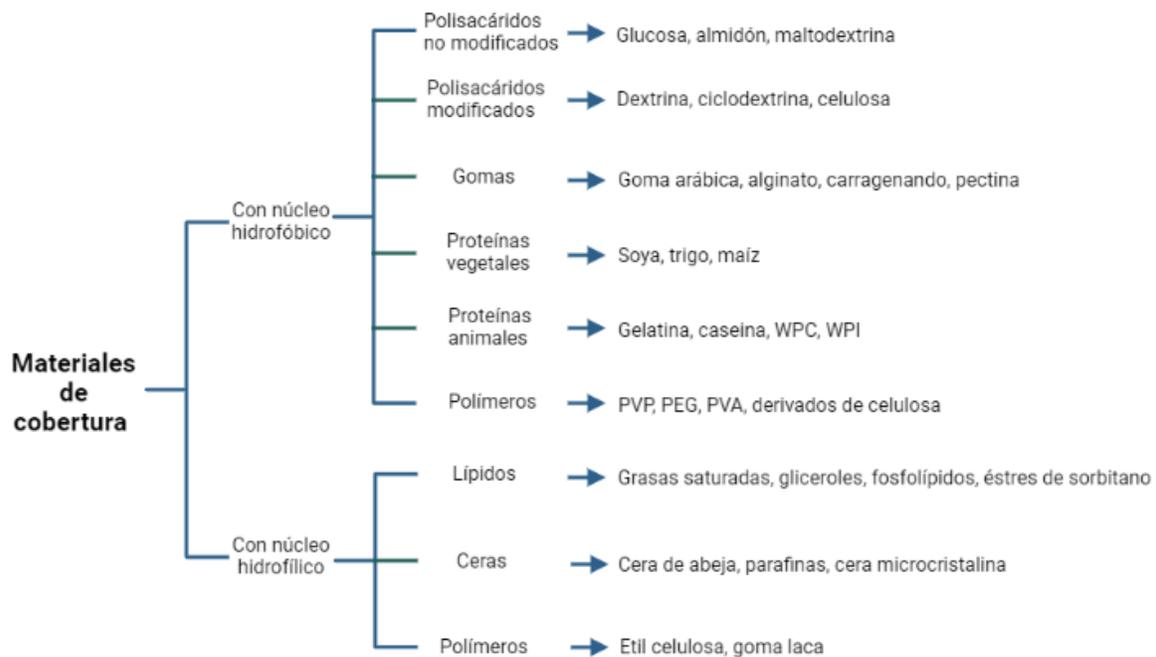
Figura 3. Diferentes tipos de morfología de las microcápsulas. Creación propia, referencia: (Lozano, 2012).

3.2.2 Materiales utilizados en microcápsulas

Tanto los materiales utilizados en el núcleo como en la cobertura deben de cumplir ciertas características y propiedades para obtener microcápsulas funcionales. El núcleo contiene a la sustancia de interés que puede ser un fármaco, células, proteínas, material genético o partículas de alimentos, y puede ser sólido o líquido,

en este último la sustancia activa puede estar dispersa o disuelta; el núcleo además puede contener excipientes como diluentes que también ejerzan un efecto retardante o acelerado de liberación del principio activo. (Suganya y Anuradha, 2017).

El material de cobertura debe ser capaz de formar una película que sea cohesiva con el núcleo y para ello debe ser químicamente compatible, evitando que reaccione con el núcleo; debe de proveer la flexibilidad, dureza, impermeabilidad, propiedades ópticas y estabilidad deseada en la microcápsula y debe controlar la liberación del núcleo bajo condiciones específicas.



Abreviaciones: WPC: Concentrado de proteína de suero; WPI: Proteína de suero de leche aislada; PVP: Polivinilpirrolidona; PEG: Polietilenglicol; PVA: Acetato de polivinilo.

Figura 4. Diferentes materiales de cobertura utilizados en microcápsulas clasificados según las propiedades hidrofílicas del material del núcleo. Creación propia, referencia: (Mishra, Jain y Jain, 2013).

Existe una gran variedad de materiales utilizados para cubrir el núcleo de una microcápsula, su elección depende de las características deseadas en la

microcápsula, pero sobre todo depende del material que compone al núcleo. La principal característica que define el tipo de cobertura que se utilizará es la interacción hidrofílica o hidrofóbica que presente el núcleo como se muestra en la **figura 4**. Los materiales utilizados en la cubierta son polímeros naturales como carbohidratos, lípidos o proteínas, y polímeros sintéticos como el polimetilmetacrilato (PMMA), acroleína o polímeros epoxi. (Mishra, Jain y Jain, 2013).

3.3 Técnicas de microencapsulación

Las diversas técnicas de microencapsulación se clasifican con base en los métodos que se utilizan para formar las microcápsulas, que pueden ser mediante métodos físicos o químicos. Dentro de las técnicas que utilizan métodos físicos se encuentran: Secado por aspersion, aspersion por enfriamiento, disco rotatorio, lecho fluidizado, extrusion centrifugal, coextrusion, encapsulacion molecular y emulsion múltiple. Algunas de las técnicas químicas utilizadas son: Separacion de fase, evaporacion con solvente, coacervacion, polimerizacion interfacial, gelificacion iónica, gelificacion interna (Sobel, Versic y Gaonkar, 2014).

3.4 Aplicaciones de la microencapsulación

La microencapsulación es una tecnología utilizada en diferentes sectores industriales como son la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética, agrícola y textil, dándole diferentes usos a la microencapsulación de sustancias activas (**tabla**

2). Una de las principales aplicaciones que se le da a la microencapsulación es aumentar el tiempo de vida de un ingrediente, ya sea protegiéndolo contra factores físicos y químicos como el calor, la luz, sustancias oxidantes, pH y humedad, o disminuyendo la volatilidad de ciertos ingredientes que sean muy volátiles, lo que dificulta su conservación en estado sólido; esto se aprovecha bastante para la protección de sustancias bioactivas muy susceptibles que requieren una mayor protección para conservar sus propiedades, por ejemplo, enzimas, microorganismos utilizados como probióticos o material genético. Otro uso que se le da, constantemente recurrido en la industria farmacéutica y alimenticia, es utilizar las microcápsulas como un sistema de liberación controlado para sustancias activas como son los fármacos o algunos ingredientes de alimentos. También se pueden enmascarar propiedades organolépticas de ingredientes como el olor, color y sabor, lo que resulta muy útil en formulaciones de productos destinados a ser ingeridos o aplicados sobre la piel. Además de ofrecer una protección contra factores externos, la microencapsulación de sustancias activas también previene reacciones no deseadas entre estas y el resto de los componentes de la formulación de un medicamento o un alimento. Otra aplicación que se le ha dado a la microencapsulación es facilitar la manipulación de sustancias líquidas convirtiéndolas en sólidos cuando se contienen en microcápsulas (Reyna, et al., 2015; Sobel, Versic y Gaonkar, 2014).

Industria	Aplicaciones	Referencia
Farmacéutica	<ul style="list-style-type: none"> • Sistemas de liberación controlada para la dosificación de fármacos. • Enmascaramiento de olor y sabor de ingredientes en formas farmacéuticas orales. • Protección de probióticos, células de islotes pancreáticos y otras sustancias bioactivas. 	(Tomaro, et al., 2013) (Lu y Park, 2012)
Alimenticia	<ul style="list-style-type: none"> • Microencapsulación de agentes probióticos en productos lácteos o suplementos alimenticios. • Reducción de la volatilidad de saborizantes. 	(Rathore, et al., 2013)
Cosmética	<ul style="list-style-type: none"> • Microencapsulación con liposomas de filtros solares en cremas bloqueadores UV. • Disminuir la volatilidad de fragancias y aceites esenciales volátiles. • Microencapsulación de sustancias hidrofóbicas en shampoos y acondicionadores. 	(Xu, et al. 2013). (Tekin, Bac y Erdogmus, 2014).
Agrícola	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de toxicidad de herbicidas, insecticidas y pesticidas. 	(Alonso, et al., 2014)
Textil	<ul style="list-style-type: none"> • Microencapsulación de agentes microbianos de origen natural. • Microencapsulación de extractos de planta utilizados para teñir telas. 	(Sumithra y Vasugi-Raaja, 2012) (Ganesan, et al., 2013)

Tabla 2. Algunas de las aplicaciones de la microencapsulación utilizadas en la industria. Creación propia.

CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE LA MICROENCAPSULACIÓN EN MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

4.1 Razones para microencapsular probióticos

Las formas farmacéuticas convencionales utilizadas para la administración de probióticos son las cápsulas y las tabletas recubiertas, sin embargo, las condiciones extremas a las que se enfrentan dentro del tracto digestivo, como el pH ácido, la presencia de peróxido de hidrógeno y altas concentraciones de oxígeno y sales biliares (Sarao y Arora, 2017). Estudios han demostrado que algunos productos probióticos comerciales son ineficientes porque los microorganismos probióticos contenidos en estos no logran sobrevivir en cantidades suficientes a lo largo del tracto gastrointestinal y para colonizar el tracto digestivo del paciente, lo que disminuye considerablemente el efecto terapéutico de los productos probióticos (Yao, 2020).

En la última década, para aumentar la supervivencia de los microorganismos probióticos en el ambiente gastrointestinal, se ha propuesto utilizar el método de microencapsulación ya que ha demostrado ser uno de los métodos más eficientes para que los probióticos microencapsulados sobrevivan mejor a las condiciones del tracto digestivo en comparación de los probióticos que se administran de forma libre, asegurando así su actividad en el intestino. (Pech-Canul, 2020; Cook, et al., 2012).

Sin embargo, la microencapsulación de probióticos enfrenta algunos retos que surgen por la misma naturaleza de las células vivas. El éxito de emplear esta tecnología en probióticos dependerá principalmente de las propiedades

fisicoquímicas de la célula, de las condiciones utilizadas durante el proceso de microencapsulación y de las propiedades deseadas en la micropartícula como su tamaño y densidad. Uno de los aspectos más importantes a considerar es el tamaño de la célula que se utilizará ya que de esto dependerá mucho el tamaño final de la microcápsula, requiriendo así de diversas técnicas para obtener los diferentes tamaños de micropartícula deseados; las bacterias tienen un diámetro de entre 1 y 5 μm , mientras que el diámetro de las levaduras es de 3 a 30 μm o en el caso de realizar microcápsulas con partículas de cultivos de microorganismos liofilizados, pueden alcanzar diámetros mayores a 100 μm (Frakolaki, et al., 2021). Otro desafío que se debe enfrentar es mantener la viabilidad de las células durante todo el proceso de manufactura, de transporte, distribución y almacenamiento.

4.2 Materiales utilizados en la microencapsulación de probióticos

4.2.1 Influencia del material en la microcápsula

La mayor parte de los materiales comestibles utilizados para la encapsulación de probióticos son poliméricos, principalmente polisacáridos, proteínas y lípidos, individualmente o formando mezclas. El material que se utilizará para encapsular el probiótico es un factor decisivo y el más importante que determinará las propiedades finales de la microcápsula; un pequeño cambio en la composición del material de cobertura o del núcleo puede afectar considerablemente las características físicas o químicas de las microcápsulas. (Pech-Canul, 2020).

4.2.2 Características de los materiales

Para considerar que un material es adecuado para ser utilizado en el proceso de encapsulación debe cumplir con ciertas características (Pérez, et al., 2013), sin embargo, no existe material que pueda ser utilizado para todos los diferentes usos que se les dan a las microcápsulas y que cumpla siempre con todas las características deseadas:

- Baja viscosidad a altas concentraciones
- Baja higroscopicidad para facilitar su manipulación y evitar la aglomeración
- Capacidad de emulsificar y estabilizar el material del núcleo
- Compatibilidad química y física con el material encapsulado.
- Brindar estabilidad y protección contra condiciones adversas (pH, oxígeno, humedad, temperatura, luz).
- Propiedades organolépticas que no dificulten su administración oral (sabor, olor).
- Bajo costo.

Parte de la microcápsula	Material	Nombre comercial
Cobertura	Polisacáridos	Alginato Pectina Carragenano Quitano Goma gellan
	Proteínas	Gelatina Caseína y caseinatos Proteína de suero de leche aislada Albúmina
		Soya Trigo

		Maíz Almidón
	Lípidos	Aceite de pescado (ácido palmítico) Mantequilla (ácido butírico) Aceite de girasol (ácido esteárico) Aceite de olivo (ácido oleico)
Núcleo	Prebióticos	Oligosacáridos (β -glucano) Almidón resistente
Recubierta	Polisacáridos	Alginato Pectina Goma Xantana y arábica Quitosano Carboximetil chitosan

Tabla 3. Materiales más empleados para microencapsular probióticos. Creación propia, referencia: (Pérez, et al., 2013, Yao, et al., 2020).

4.3 Métodos de microencapsulación más utilizados para probióticos

Antes de escoger el método de microencapsulación a utilizar, se debe tener en cuenta el diseño y el uso que se le dará a la microcápsula. Las microcápsulas de células de microorganismos están diseñadas para cumplir diferentes propósitos: Pueden contar con un diseño tal que se forme una barrera física que sirva como protección a los factores ambientales o gastrointestinales capaces de dañar a la célula como el ácido gástrico, temperatura, oxígeno, sales biliares o enzimas digestivas; también pueden diseñarse con el objetivo de aumentar el tiempo de vida de los microorganismos encapsulándolos junto con nutrientes específicos que le ayuden a sobrevivir un mayor tiempo, como son carbohidratos digeribles, fibras dietéticas, proteínas o minerales; pueden ser diseñadas para que contengan sustancias que generen un ambiente más favorable para los probióticos, por ejemplo, antiácidos que ayuden a regular el pH del tracto digestivo; por último, otro diseño está enfocado funcionar como una trampa para contener sustancias

bioactivas benéficas que puede secretar el microorganismo como enzimas que hidrolizan sales biliares, brindando mayor protección a los probióticos de las sales biliares en el intestino delgado. (Yao, et al., 2020).

En los últimos años se han estudiado diferentes métodos de microencapsulación para encontrar cuáles son los que se adecúan mejor a los probióticos, tomando en cuenta que el principal objetivo es proteger y aumentar la viabilidad de los microorganismos. (Rathore, et al., 2013). Son 4 las técnicas de microencapsulación más empleadas para probióticos: Extrusión, coacervación, secado por aspersión y emulsificación; cada método cuenta con diferentes características, ventajas y desventajas, así como también se obtienen diferentes propiedades de las microcápsulas para cada método empleado (**Tabla 4**) y su selección dependerá de la aplicación que se les dé a las microcápsulas.

4.3.1 Extrusión

Es considerado un método físico que consiste en encapsular a los microorganismos en una solución hidrocoloidal, donde usualmente se opta por utilizar alginato o carragenano. Esta mezcla se hace pasar a través de una aguja o boquilla, mediante un sistema de inyección a una velocidad constante y controlada, para formar las gotas del material encapsulado que son agregadas por goteo en una solución de endurecimiento que generalmente contiene NaCl_2 o CaCl_2 , para favorecer el proceso de polimerización y endurecimiento del material de recubrimiento. (Lee, et al, 2019).

Algunas ventajas de esta técnica son: se realiza en pocos pasos, es económica, no requiere solventes o el empleo de altas temperaturas en el proceso y los microorganismos sufren mínimo daño mecánico por lo que se obtiene una alta viabilidad. Sin embargo, es un proceso lento y difícil de producir a gran escala. (Sarao y Arora, 2017).

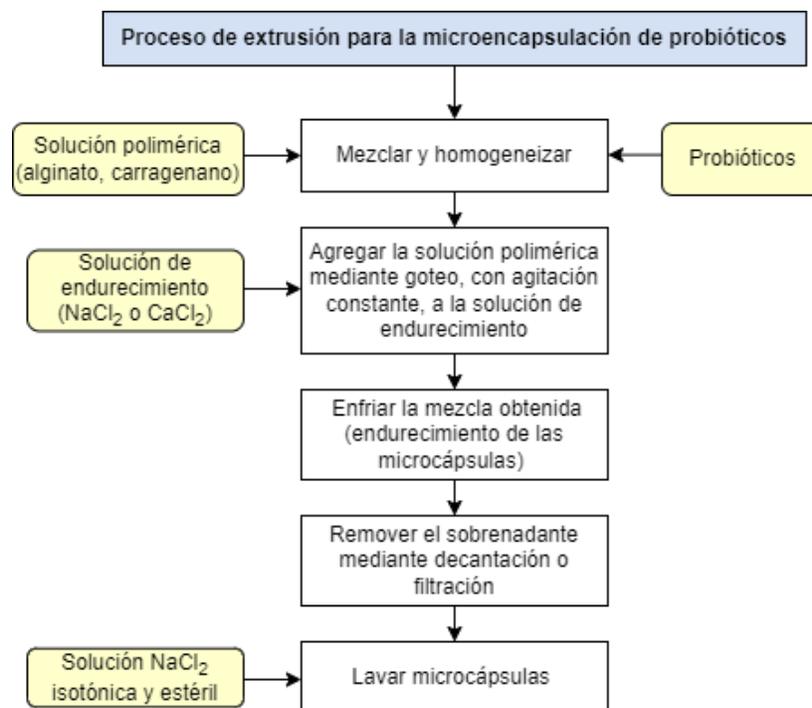


Figura 5. Diagrama del proceso de extrusión para la microencapsulación de probióticos. Creación propia, referencia: (Lee, et al., 2019).

4.3.2 Coacervación

Es un método fisicoquímico, donde están presentes 3 componentes iniciales: el material del núcleo, que en este caso es el probiótico; el polímero encapsulante de naturaleza proteica en estado líquido; el solvente utilizado para preparar la solución acuosa del polímero encapsulante. La deposición del polímero encapsulante sobre

el probiótico se lleva a cabo cuando el polímero es absorbido en la interfase formada entre el probiótico y la fase líquida (Mishra, Jain y Jain, 2013).

La coacervación puede ser simple o compleja: En la coacervación simple sólo se utiliza un polímero como material encapsulante y la coacervación se lleva a cabo induciendo la desolvatación del agente encapsulante modificando el pH y/o temperatura, agregando una sal o agregando un polímero incompatible con la solución del agente encapsulante, sin embargo, no es muy común que se utilice este tipo de coacervación a nivel industrial; en la coacervación compleja, los coacervados se forman cambiando las condiciones de pH del medio y se pueden utilizar uno o más materiales poliméricos, por ejemplo, un polímero catiónico como un polisacárido con uno aniónico como una proteína, estos se entrecruzarán gracias a las interacción de cargas, como se ilustra en la **figura 7** (Frakolaki, et al., 2020).

Este método representa una tecnología prometedora para la encapsulación debido a su buena capacidad de encapsulamiento y la capacidad de liberación controlada del material del núcleo por estrés mecánico, cambios de temperatura o pH, especialmente porque la encapsulación de probióticos requiere de un sistema que los libere cuando este es expuesto a un pH básico en el colon. Sin embargo, es un método más costoso, complejo y que requiere del control de diferentes condiciones críticas del proceso, por lo que es más difícil de llevar a cabo a gran escala, además de que con la coacervación no se logran obtener microcápsulas muy pequeñas (Rathore, et al., 2013).

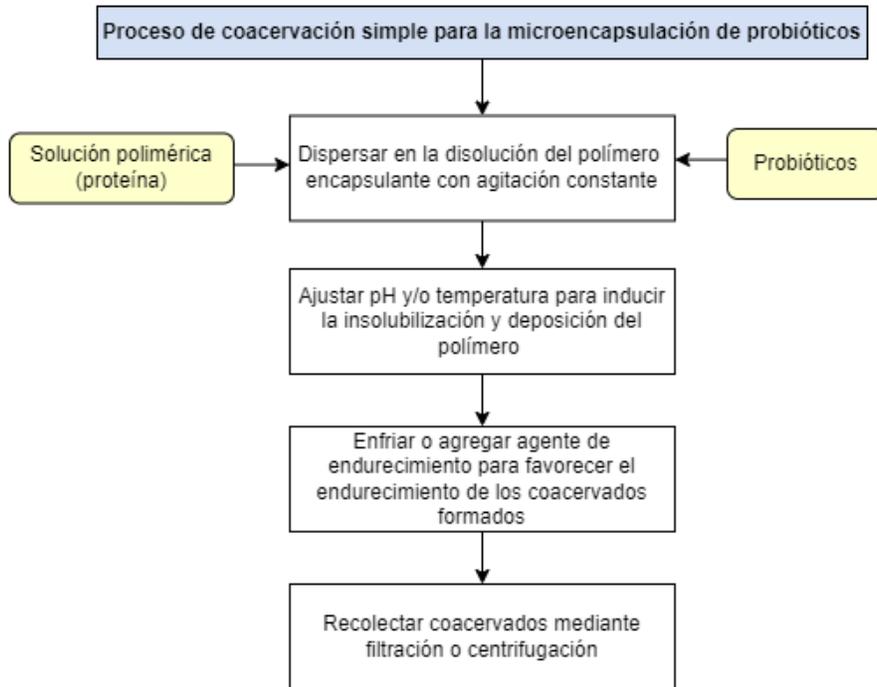


Figura 6. Diagrama del proceso para llevar a cabo la microencapsulación de probióticos mediante coacervación simple. Creación propia, referencia: (Frakolaki, et al., 2020).

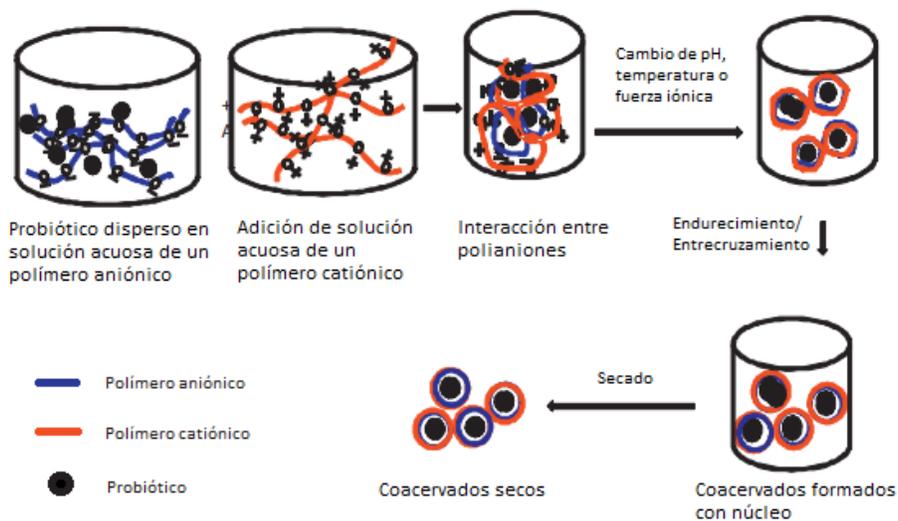


Figura 7. Esquema del proceso de coacervación compleja utilizando un polímero aniónico y un polímero catiónico. Modificado de: (Timilsena, et al., 2018).

4.3.3 Secado por aspersion

El método de atomización o aspersion es un método físico que consiste en atomizar aire caliente a una suspensión o emulsión homogénea de probióticos y el material polimérico encapsulante. Esta suspensión se introduce a un equipo de aspersion **(figura 8)** donde se deja gotear dentro de una cámara de secado y se le atomiza aire caliente para lograr una rápida evaporación del solvente, obteniendo así los probióticos microencapsulados con el material polimérico en forma de partículas de polvo. El éxito de esta técnica radica en 2 factores: El material polimérico utilizado y la optimización de los parámetros del proceso, principalmente la temperatura del aire.

La principal ventaja de este método es que es un proceso continuo, rápido y relativamente económico que puede ser utilizado a escala industrial. Existen posibles inconvenientes por el uso de altas temperaturas, ya que esto puede disminuir la viabilidad de los microorganismos, sin embargo, varios estudios reportan mínima pérdida de viabilidad (Gad, 2008).

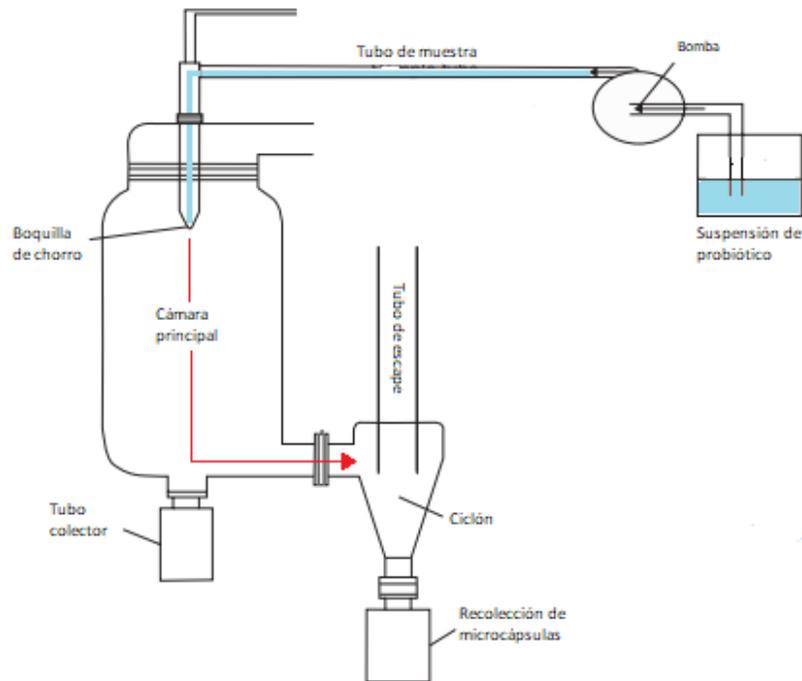


Figura 8. Esquema de un equipo empleado para el método de secado por aspersión. Modificado de: (Gad, 2008).

4.3.4 Emulsificación- evaporación del disolvente

Una de las formas de preparación de microcápsulas más utilizado en la industria se realiza preparando una emulsión, cuya fase interna o dispersa en forma de microgotas se solidifica, cubriendo núcleos de la sustancia activa para formar microcápsulas. En este sistema la fase interna está conformada por un disolvente orgánico donde se disuelve el polímero encapsulante; la fase externa es un líquido inmiscible con la fase interna que sea o contenga disuelto a un agente estabilizante como un tensoactivo para evitar fenómenos de agregación y coalescencia que desestabilicen la emulsión; los probióticos se disuelven o dispersan en la fase interna de la emulsión. Una vez preparada la emulsión, se elimina el disolvente

orgánico de la fase interna evaporándolo, con agitación, para favorecer la compactación del polímero y la encapsulación de los probióticos. Finalmente se llevan a cabo procesos de separación, lavado y secado para la recogida de las microcápsulas (Lozano, 2012).

El tamaño de microcápsula puede controlarse modificando la velocidad de agitación, la concentración del surfactante o el valor de equilibrio hidrofílico-lipofílico (EHL) empleado. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es que las microcápsulas obtenidas pueden contener residuos de la fase orgánica que afectan las propiedades organolépticas de la microcápsula, además de ser un agente tóxico para las células del tracto gastrointestinal. (Frakolaki, et al., 2020).

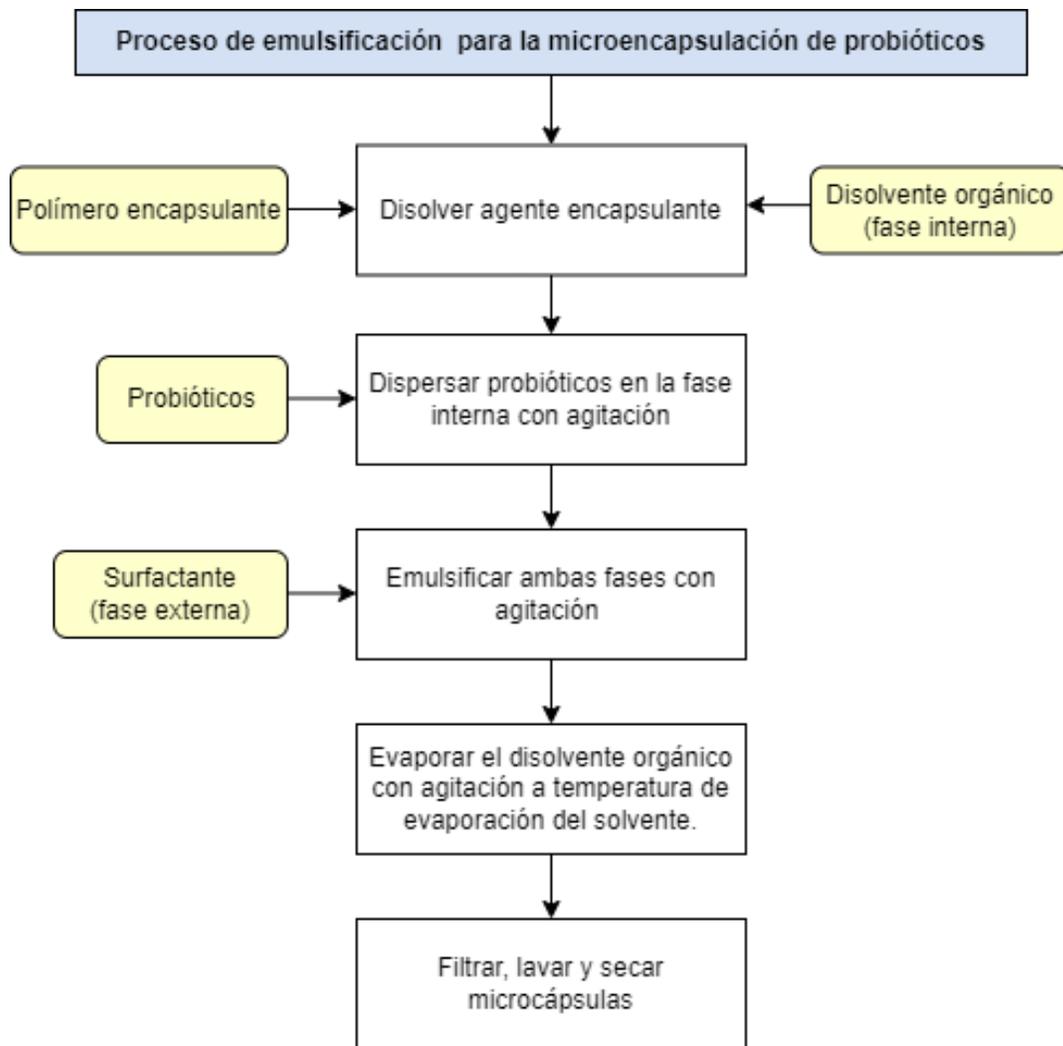


Figura 9. Diagrama del proceso para realizar la microencapsulación de probióticos mediante el método de emulsificación. Creación propia, referencia (Lozano, 2012).

MÉTODO	PROPIEDADES DE LAS MICROCÁPSULAS OBTENDIAS	REFERENCIA
Extrusión	<ul style="list-style-type: none"> -Microcápsulas mononucleadas o de reservorio. -Diámetro entre 15 μm y 3.5 mm. -Capa de cobertura poco estable. -Baja carga microbiana. 	Le, et al., 2019
Coacervación	<ul style="list-style-type: none"> -Microcápsulas mononucleadas o de reservorio. -Diámetro entre 10 μm y 3.0 mm. -Alta carga microbiana. -Puede contener más de un material polimérico en su cubierta si se realiza una conservación compleja. -Cobertura hidrofóbica. -Muy útil para la liberación de probióticos cuando son expuestos a un mayor pH en el intestino. 	Rathore, et al., 2013
Secado por aspersión	<ul style="list-style-type: none"> -Microcápsulas mononucleadas o de reservorio. -Diámetro entre 3 y 600 μm. -Se conserva buena estabilidad durante un almacenamiento prolongado. -Microcápsulas secas, estables y con baja densidad aparente. -Cobertura hidrofílica, por lo que puede presentar problemas de liberación anticipada de los probióticos. 	Pérez, et al., 2013
Emulsificación	<ul style="list-style-type: none"> -Microcápsulas mononucleadas o de reservorio. -Diámetro entre 25 μm y 2 mm. -Alta viabilidad. -La cubierta puede contener residuos indeseables de la fase oleosa. -Las microcápsulas obtenidas pueden ser cubiertas con una segunda capa para aumentar la protección del probiótico o mejorar las características sensoriales de la microcápsula. 	Frakolaki, et al., 2020.

Tabla 4. Diferencias reportadas entre las propiedades de las microcápsulas obtenidas por los métodos de extrusión, coacervación, secado por aspersión y emulsificación. Creación propia.

CAPÍTULO 5. PRUEBAS DE CALIDAD

5.1 Análisis granulométrico y morfológico

El tamaño de partícula puede, entre otros parámetros, afectar la capacidad de absorción del principio activo y su biodisponibilidad. Para el caso particular de las micropartículas estas requieren un determinado tamaño que generalmente se encuentra en un rango de 1 a 1000 micras, por lo que es necesario realizar un estudio granulométrico para determinar el tamaño de la partícula.

En la **tabla 5** se presentan distintas técnicas para la determinación del tamaño de una partícula con el rango aproximado de dimensiones que pueden medir:

Método	Rango aproximado (μm)	
	Límite superior	Límite inferior
Tamización	5	80.000
Microscopía	0,5	1.000
Microscopía electrónica	0,005	20
Elutriación	3	200
Centrifugación	0,05	3
Ultracentrifugación	0,001	1
Sedimentación	1	200
Turbidometría	0,01	50
Difracción de rayos X	0,002	0,1
Difracción luz láser	0,5	900

Tabla 5. Rango de diversos métodos de cálculo de tamaño de partícula. Referencia: (Lozano, 2012).

Los métodos más utilizados para la determinación del tamaño de las microcápsulas son:

5.1.1 Difracción láser

La difracción de luz láser de ángulo corto o por sus siglas en inglés LALLS o también denominada en inglés como <<light scattering>> o <<laser diffraction>>, consta de un equipo con diferentes partes (**figura 10**). El equipo parte de una fuente de luz láser de He-Ne que emite un haz de luz a una longitud de onda definida, generalmente a 650 nm. Este haz atraviesa una celda que contiene la muestra a analizar; el haz al chocar con las partículas se desvía o difracta su trayectoria. Posteriormente, la luz difractada es recolectada por una lente y enviada a una placa detectora para que el equipo sea capaz de medir el ángulo de difracción con el cual se calcula el tamaño de la partícula. Algunos equipos pueden incorporar una microcámara para fotografiar las partículas en suspensión y se pueden visualizar mediante un tratamiento informático en un ordenador.

Este método ha demostrado ser uno de los más eficientes ya que incluso la farmacopea europea ha descrito el análisis granulométrico mediante esta técnica (método 2.9.31 de Ph. Eur.).

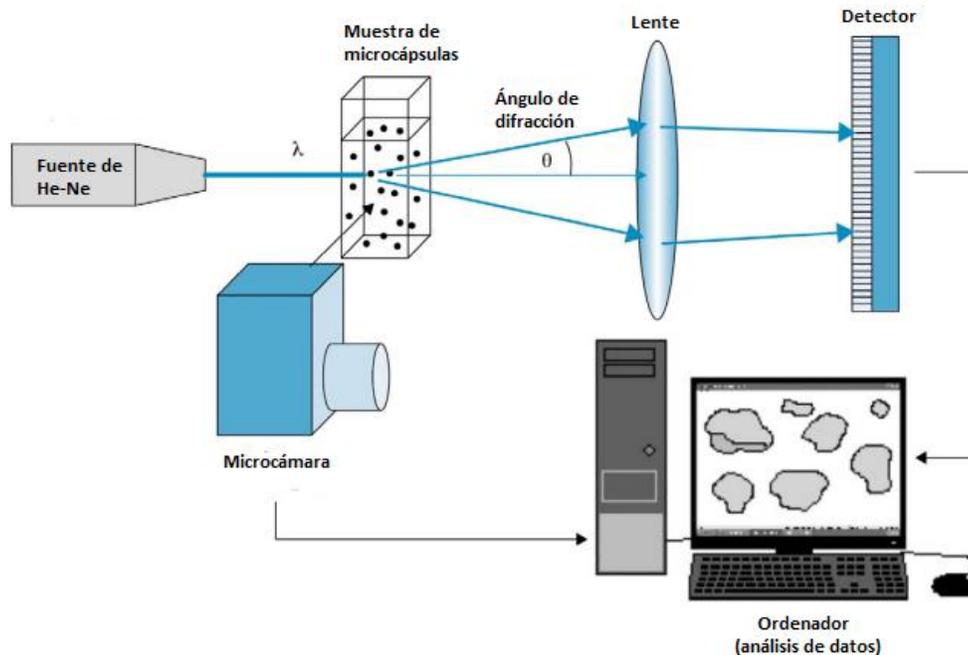


Figura 10. Esquema de un equipo granulométrico por difracción láser. Modificado de: (Lozano, 2012).

5.1.2 Microscopía óptica

Una de las grandes ventajas de la microscopía es que nos permite ver directamente las partículas de nuestra muestra y es mucho más económico que el método de difracción laser, sin embargo, una de las principales limitantes de este método es la cantidad de muestra que se puede analizar ya que generalmente suele ser muy pequeña e insuficiente para poder realizar un análisis estadístico y sería necesario analizar varias muestras. Equipos modernos de microscopía han solucionado esta limitante, adaptándolos con cámaras que envían señales a través de una interfaz a un ordenador, dotado de un programa capaz de realizar no solo el análisis de tamaño sino también de la forma de las partículas, como se esquematiza en la **figura 11**. Esta metodología

también ha sido descrita en la Farmacopea Europea, en el ensayo límite de tamaño de partícula (Ph. Eur. 2.9.13).

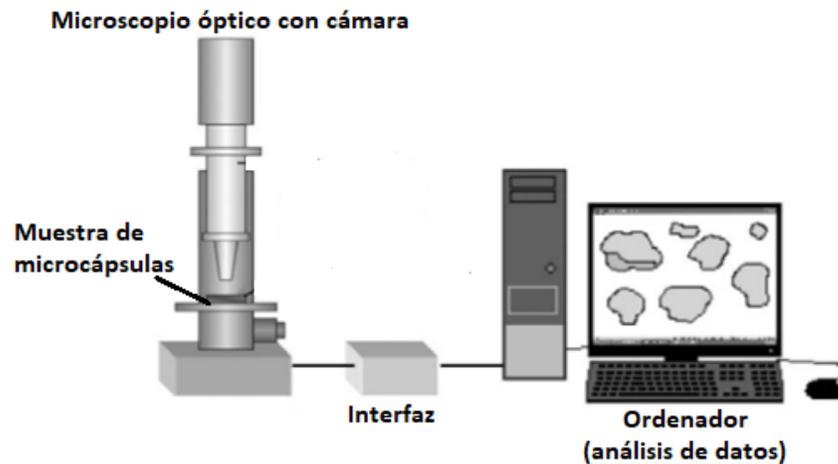


Figura 11. Esquema de un equipo automático de granulometría por microscopía óptica. Referencia: (Lozano, 2012).

5.2 Evaluación de la viabilidad de los probióticos

El principal propósito de utilizar la microencapsulación en los microorganismos probióticos es preservar su viabilidad al ser expuestos en el ambiente gastrointestinal cuando son ingeridos por vía oral. Además, también existe pérdida de la viabilidad celular durante los procesos de manufactura, tanto por factores físicos o químicos, por ejemplo, en la microencapsulación mediante secado por aspersión, los microorganismos son expuestos a altas temperaturas que pueden afectar su viabilidad (Rathore, et al., 2013). Una vez fabricadas las microcápsulas, es indispensable evaluar la viabilidad de los microorganismos para asegurar la eficacia del sistema de liberación del probiótico, así como garantizar que los pacientes recibirán la dosis requerida de probióticos

recomendada, que, al variar de acuerdo con la cepa y el producto, provocan que no se pueda establecer una dosis general, aunque la mayoría se encuentra entre 10^6 y 10^9 UFC/día (Guarner, et al., 2017).

La evaluación de la viabilidad se puede realizar con el método de cuenta en placa después de exponer el producto en jugo gástrico simulado (JGS) utilizando modelos de digestión *in vitro* que pueden ser estáticos o dinámicos, estos últimos simulan mejores las condiciones gastrointestinales ya que utilizan varios compartimentos. Otro método utilizado para la evaluación de la viabilidad celular es la citometría de flujo, como describe la Organización Internacional de Estandarización (ISO, 2015), mediante el método analítico específico: “Recuento de células vivas por citometría de flujo”, que es una variación validada del método oficial ISO119244:2015 (Yao, et al., 2019).

5.2.1 Modelo dinámico de digestión *in vitro* y cuenta en placa.

El modelo dinámico de digestión *in vitro* es el que mejor simulan las condiciones *in vivo* al que las microcápsulas estarán expuestas, esto gracias a que permite regular el pH, el flujo del producto y agregar diferentes enzimas digestivas en tiempo real en cada uno de los diferentes compartimientos simulados del tracto gastrointestinal. Por ejemplo, el sistema SHIME utilizado por (De Boever, Deplancke y Verstraete, 2000), que se esquematiza en la **figura 12**, fue reportado como un sistema para simular la actividad digestiva tanto del estómago como del colon; consta de 5 recipientes o vasos que contienen diferentes fluidos gástricos simulados, que se mantienen a 37°C ; los parámetros de cada uno de los fluidos gástricos simulados se muestran en la **tabla 6**. El

número de microorganismos viables, después de haber sido expuestos a la condiciones gástricas simuladas, puede determinarse mediante el método de cuenta en placa, utilizando agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) e incubando las placas en las condiciones requeridas dependiendo de la cepa; el resultado de la cuenta se expresa como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por gramo de microcápsulas ($\log \text{UFC g}^{-1}$) (Fritzen-Freire, et al., 2013).

Vaso	Segmento intestinal	Volumen (L)	Tiempo de retención (h)	pH
1	Estómago	0.2	2	2.0-2.5
2	Intestino Delgado	0.3	6	5.0-6.0
3	Colon ascendente	0.7	18	5.5-6.0
4	Colon transversal	1.3	36	6.0-6.4
5	Colon descendente	0.8	22	6.6-6.9

Tabla 6. Descripción de los diferentes vasos del sistema SHIME y sus parámetros de operación. Referencia: (De Boever, et al., 2000).

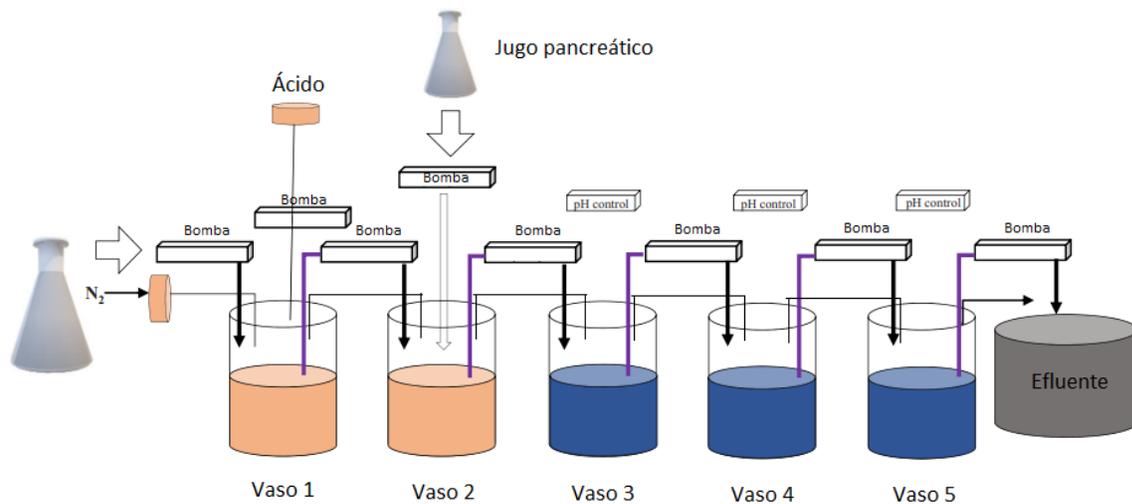


Figura 12. Esquema del Simulador del Ecosistema Microbiano del Intestino Humano (SHIME). Modificado de: (Yao, et al., 2019).

5.3 Análisis de propiedades fisicoquímicas

Cuando se desarrolla un nuevo sistema de liberación de probióticos es indispensable estudiar las propiedades fisicoquímicas del sistema para determinar su funcionalidad (Yao, et al., 2019). El estudio de las propiedades fisicoquímicas de las microcápsula proporciona información sobre la composición de la superficie y del núcleo de las micropartículas, permitiendo conocer la distribución de los microorganismos probióticos en la microcápsula, al igual que propiedades como la estabilidad térmica, propiedades de adhesión y la permeabilidad. El análisis de cada una de las propiedades se realiza a través de diferentes metodologías (Lozano, 2012).

5.3.1 Determinación del potencial zeta

Las propiedades adhesivas de las micropartículas están determinadas principalmente por su potencial y la carga superficial, que a su vez están relacionadas con la estabilidad física del sistema. Una partícula coloidal puede adquirir una carga eléctrica superficial cuando se dispersa en una fase continua, a través de: La ionización de los grupos funcionales de la partícula dispersa; adsorción de iones, presentes en la fase continua, sobre la superficie de la partícula; por la fricción entre las partículas y el medio de dispersión (Lozano, 2021). Para estudiar estos fenómenos electrostáticos se utiliza el modelo de la doble capa (**figura 13**) donde se describe que la atmósfera iónica de una partícula coloide está compuesta por dos capas: La primera, es la más próxima a la superficie de la partícula y está conformada por iones de carga opuesta (contraiones) fuertemente atraídos a la superficie por fuerzas electrostáticas, denominada capa rígida o de Stern; la

segunda capa interactúa con la capa de Stern y está compuesta tanto de contraiones como de coiones y se denomina capa difusa; el potencial que une ambas capas es conocido como potencial zeta (Yoval, et al., 2013).

Gracias al movimiento de las partículas cuando son sometidas a un campo eléctrico constante, se puede determinar el signo de la carga superficial, la movilidad electroforética y la potencial zeta (Lozano, 2012). Existen equipos automáticos que facilitan la medición del potencial zeta, por ejemplo, los equipos de la familia Zetasizer®, muy recurridos para realizar estas mediciones tanto en la industria como en investigación. Estos equipos realizan la medición del potencial zeta mediante dispersión de luz electroforética, donde se hace incidir un láser mientras las partículas se encuentran en movimiento, lo que origina frecuencias diferentes a la frecuencia original del láser y estas diferencias son proporcionales a la velocidad de la partícula, que es necesaria para que el equipo calcule la magnitud del potencial zeta (Bhattacharjee, 2016). En la **figura 14** se esquematiza la instrumentación de estos equipos:

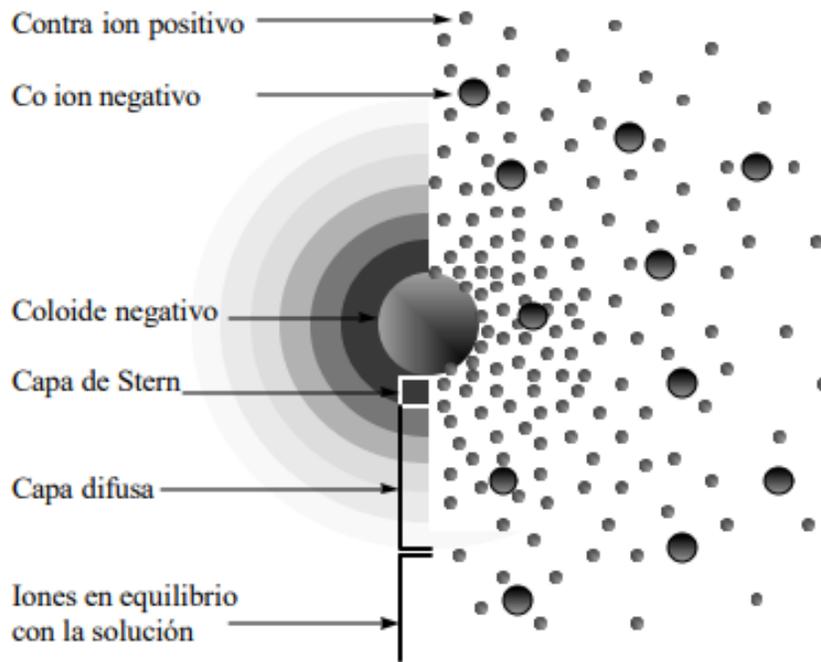


Figura 13. Modelo de la doble capa para partículas coloidales. Referencia: (Yoval, 2013).

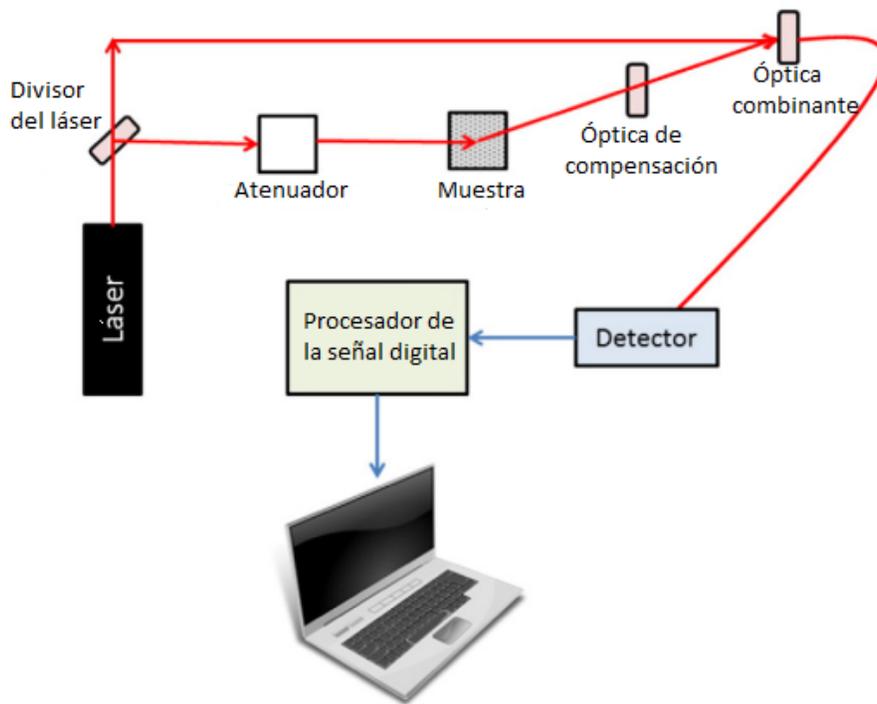


Figura 14. Esquema de la instrumentación utilizada para determinar el potencial zeta mediante dispersión de luz electroforética. Modificado de: (Bhattacharjee, 2016).

5.3.2 Calorimetría diferencial de barrido

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC por sus siglas en inglés) es la técnica de análisis térmico más común. En la DSC se someten las microcápsulas a una rampa de calentamiento que mide la pérdida o ganancia de calor en forma de Capacidad Calórica (C_p). Como resultado de cambios físicos o químicos en una muestra en función de la temperatura; los datos se obtienen como entradas diferenciales de calor en función de la temperatura, permitiendo caracterizar el grado de cristalinidad de las microcápsulas y la información sobre el comportamiento de fusión y cristalización del material (Vásconez, 2017; Lozano, 2012).

El análisis DSC tiene como principio el comparar la diferencia de cantidad de calor que se requiere para aumentar la temperatura entre la muestra y una referencia, ya que se espera que la cantidad de calor que la muestra requiera siempre sea mayor frente a la cantidad requerida por la referencia para presentar el mismo incremento de temperatura. De acuerdo con el mecanismo de operación, existen 2 tipos de DSC:

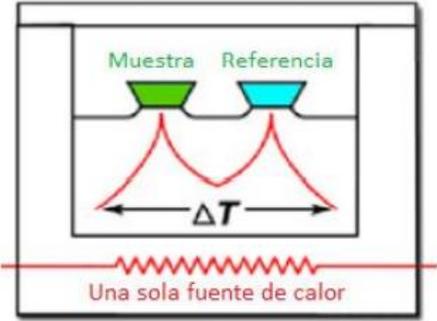
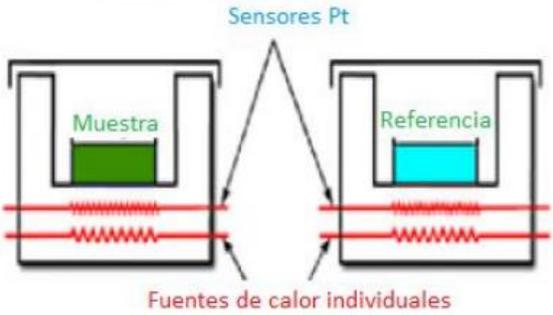
DSC de flujo térmico	DSC compensado en potencia
 <p data-bbox="237 632 799 772">La muestra y la referencia se calientan a una velocidad lineal en un solo horno y el calor se transfiere a través de un disco termoelectrico.</p>	 <p data-bbox="824 632 1386 882">La muestra y la referencia se colocan en hornos separados y se mantienen a la misma temperatura. La diferencia de potencia térmica requerida para mantener las mismas condiciones térmicas se mide en función de la temperatura.</p>

Figura 15. Comparación de los 2 tipos de DSC según su mecanismo de operación. Referencia: (Vásconez, 2017).

5.4 Evaluación de la eficiencia de encapsulación (EE)

La EE se considera como la tasa de supervivencia de los microorganismos probióticos después de haberse realizado el proceso de microencapsulación. Este parámetro se puede calcular fácilmente con la siguiente relación:

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

Donde N es el número de células probióticas viables, liberadas de la microcápsula y expresado como log UFC/g⁻¹ de microcápsula, mientras que N₀ representa el número de células viables teóricas contenidas en la suspensión, antes de utilizarse en el proceso de microencapsulación y expresado como log UFC/g⁻¹ de microcápsula (Dias, et al., 2018).

Para poder determinar N, se debe utilizar un método validado donde la muestra de microcápsulas sea sometida a un proceso de centrifugación que las separe del medio líquido donde fueron preparadas, seguido de un tratamiento de ruptura para liberar su contenido y finalmente utilizar un método que permita determinar el número de células viable como cuenta en placas de MRS (Lozano, 2012).

5.5 Modelos *in vivo*

Los modelos *in vitro* son muy prácticos y fáciles de replicar, sin embargo, no pueden considerarse un modelo exacto del ambiente gastrointestinal humano; para obtener resultados más aproximados a las condiciones ambientales reales se utilizan los modelos *in vivo*.

Otra razón importante para considerar incluir modelos *in vivo*, en los estudios de calidad de las microcápsulas de probióticos, es que se han reportado diferencias de correlación de los resultados obtenidos mediante modelos *in vitro* e *in vivo* utilizando el mismo tipo de microcápsulas, por ejemplo, Würth et al., 2015, reportó que un sistema de microcápsulas, basadas en proteínas de leche, no aumentó la viabilidad de los probióticos en el sistema gastrointestinal de roedor, a pesar de que en el modelo *in vitro* sí se obtuvo un aumento en la viabilidad.

Los modelos *in vivo* más utilizados son los de roedores, principalmente de ratas y ratones, sin embargo, hay que tener en cuenta que el sistema gastrointestinal de los roedores dista mucho del sistema gastrointestinal humano. Otra propuesta de modelo *in vivo* es el sistema gastrointestinal porcino, debido a que la morfología del colon es más parecida a la del humano, no obstante, esto podría aumentar el costo

de las pruebas y las consideraciones éticas involucradas para aceptar su uso (Yao, et al., 2019).

5.5.1 Modelo en roedores

Análogamente a los modelos *in vitro* que exponen las microcápsulas de probióticos a jugos gástricos simulados, en los modelos *in vivo* las microcápsulas son ingeridas por el roedor para poder ser digeridas por el sistema gastrointestinal y posteriormente analizar cada uno de los compartimentos del sistema para poder determinar el número de células viables.

Para ejemplificar cómo se lleva a cabo un modelo *in vivo* para determinar el número de células viables, se esquematiza en la **figura 16** la metodología que siguió Würth et al., 2015 con el objetivo de analizar la supervivencia de células de *Lactobacillus casei*, contenidas en microcápsulas basadas en proteínas de leche, al ser expuestas al sistema gastrointestinal de ratones libres de patógenos específicos (SPF). En el experimento se realizaron 2 tratamientos: un grupo de 5 ratones ingirió 5×10^8 UFC por ratón de células probióticas microencapsuladas y el segundo grupo de ratones recibió la misma cantidad de probióticos libres, sin microencapsular. 3.5 horas después de la administración de los probióticos, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron 4 compartimentos intestinales: estómago, intestino delgado y el colon. Los órganos extraídos fueron abiertos longitudinalmente y mezclados, por separado, con vortex en 3 mL de solución estéril de buffer de fosfatos salina (BPS). Posteriormente los tejidos fueron sedimentados mediante centrifugación por 5 min a 300 g, y se conservó el sobrenadante donde se encontraban los probióticos. Para poder realizar la cuenta selectiva de las células probióticas, se utilizó una cepa

resistente a eritromicina de *L. casei* ($L.c^{Eri}$), el sobrenadante de cada compartimento se sembró en una placa de MRS con 5 $\mu\text{g/mL}$ de eritromicina y se incubaron a 37°C por 48 h, de esta forma sólo crecieron las colonias del probiótico seleccionado y no las demás células de la microbiota. Finalmente, se compararon las cuentas de las células viables de ambos tratamientos mediante un análisis estadístico para comprobar si existe un aumento de la viabilidad cuando las células son microencapsuladas.

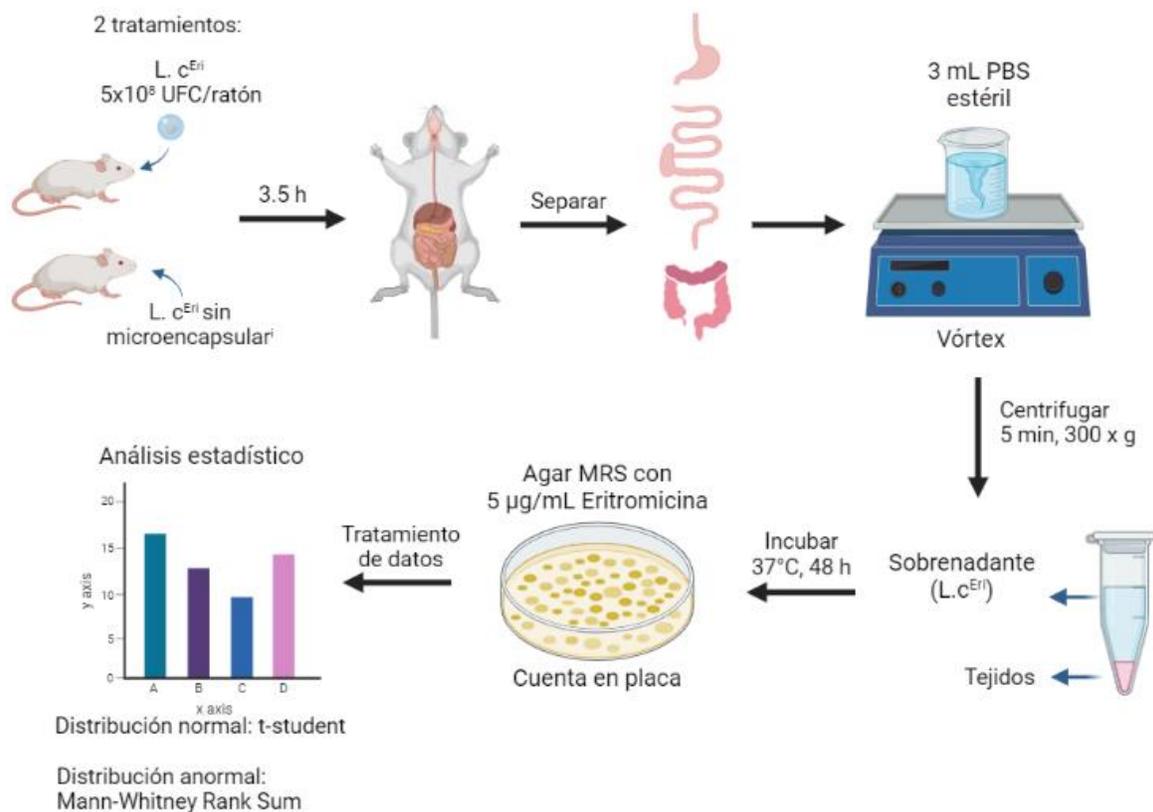


Figura 16. Ejemplo de la metodología de un modelo in vivo, utilizada para el análisis de supervivencia de células de *L. casei* resistentes a eritromicina ($L. c^{Eri}$), microencapsuladas y libres, cuando son expuestas al sistema gastrointestinal de ratones SPF, con $n=5$ para ambos tratamientos. Creación propia, referencia (Würth et al., 2015).

CAPÍTULO 6. PANORAMA ACTUAL

6.1 El mercado de la microencapsulación

En los próximos años, se estima que el mercado global de la microencapsulación alcance un valor de 19 billones de dólares para el 2025, con un crecimiento compuesto anual de 13.6%; este crecimiento será dirigido por la industria farmacéutica, cosmética y, principalmente, por el sector de alimentos y bebidas, que demanda cada vez más la incorporación de sabores, enzimas, células inmovilizadas y probióticos microencapsulados en sus productos (Salaün, 2019).

Para desarrollar un producto que contenga un probiótico debe de conocerse el mercado al que será dirigido; por ejemplo, para qué sectores o sector determinado de la población estará dirigido el producto y a quiénes se considerarán, tomando en cuenta factores de inclusión como edad, religión, alimentación especial, grupos con enfermedades específicas, etc. También debe de considerarse si será regional o global, ya que el mercado de la microencapsulación también es dependiente de la zona geográfica, por el ejemplo: En Norte América, esta tecnología es empleada principalmente por las industrias farmacéuticas, de alimentos y de productos de cuidado personal, además de tener un futuro prometedor para el sector textil; en Europa occidental, este mercado ha crecido rápidamente en cuanto a la disponibilidad de materias primas y tecnologías de recubrimiento, específicamente para la industria farmacéutica y cosmética; el mercado de la región Asia-Pacífico se espera que sea uno de lo que mayor crecimiento tenga, debido principalmente a que la presencia de la industria farmacéutica, alimenticia y de detergentes es cada vez mayor en la región (Salaün, 2019).

6.2 Aspectos legislativos

Los probióticos son considerados insumos para la salud y en México, de acuerdo con el Reglamento de Insumos para la Salud, están clasificados como suplementos alimenticios. Sin embargo, en México no existe una norma que regule la incorporación de probióticos a los alimentos, o que garantice su integridad y usualmente sólo basta con que los fabricantes cumplan con ciertas normas de carácter oficial relacionadas a la producción y comercialización de alimentos como:

- NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de Higiene para el Proceso de Alimentos, Bebidas o Suplementos Alimenticios.
- NOM-086-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Alimentos y Bebidas No Alcohólicas con Modificaciones en su Composición. Especificaciones Nutrimientales.
- NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones Generales de Etiquetado para Alimentos y Bebidas no Alcohólicas Preenvasados-Información Comercial y Sanitaria.

A nivel internacional, la inocuidad y eficacia de los probióticos para mejorar la salud es revisada y regulada por la FAO y la OMS, cuyo principal objetivo es estandarizar la regulación para que todos o la mayor parte de los países cumplan con los mismos requisitos. Además, antes de lanzar el producto probiótico al mercado, debe de conocerse la regulación nacional e internacional para saber cuáles serán las obligaciones legales del fabricante o si el microorganismo no ha sido añadido antes a algún otro alimento y deberá pasar por el cumplimiento de los criterios de

selección y estudios que comprueben la seguridad y eficacia de la cepa utilizada (Castillo, et al., 2019).

6.3 Productos en el mercado

Hoy en día están disponibles una gran variedad de productos probióticos con diferentes propósitos, según la o las cepas que contengan. En estos productos, la eficacia depende principalmente de la manera en la que los probióticos serán liberados y/o entregados en el cuerpo, sin embargo, existe un gran problema de desinformación por parte de las empresas hacia los consumidores ya que, en la mayoría de las ocasiones, a las personas no se les proporcionan estos detalles técnicos tan importantes del producto.

De acuerdo con un estudio de mercado realizado por Lumina Intelligence en el año 2018, donde se identificaron las principales marcas de productos probióticos en 20 diferentes países, se concluyó que la mayoría de estas marcas no mencionan en sus productos el tipo de sistema de liberación a través del cual funcionan. Aproximadamente el 81% de los suplementos alimenticios que contienen probióticos estudiados, no mencionan qué sistema de liberación utilizan y de los que sí mencionan esta información, los nombres más utilizados son “Genéricos”, “resistentes a pH”, “Liofilizado”, “BIO-tract”, entre otros. Es importante destacar que “Microencapsulación” ocupa el cuarto lugar de los sistemas de liberación mencionados con mayor frecuencia en los productos que sí brindan esta información, siendo superado únicamente por cápsulas como “BIO-tract”, cápsulas de liberación retardada” y “DRcaps capsules”. A pesar de que la microencapsulación

figura entre uno de los principales sistemas de liberación mencionados en los productos, este representa sólo el 1.1% de todos los productos considerados en el estudio de mercado, lo cual indica que la tecnología apenas comiza a ser introducida en el mercado, pero se espera en los próximos años que su presencia sea cada vez mayor (Lumina Intelligence, 2019).

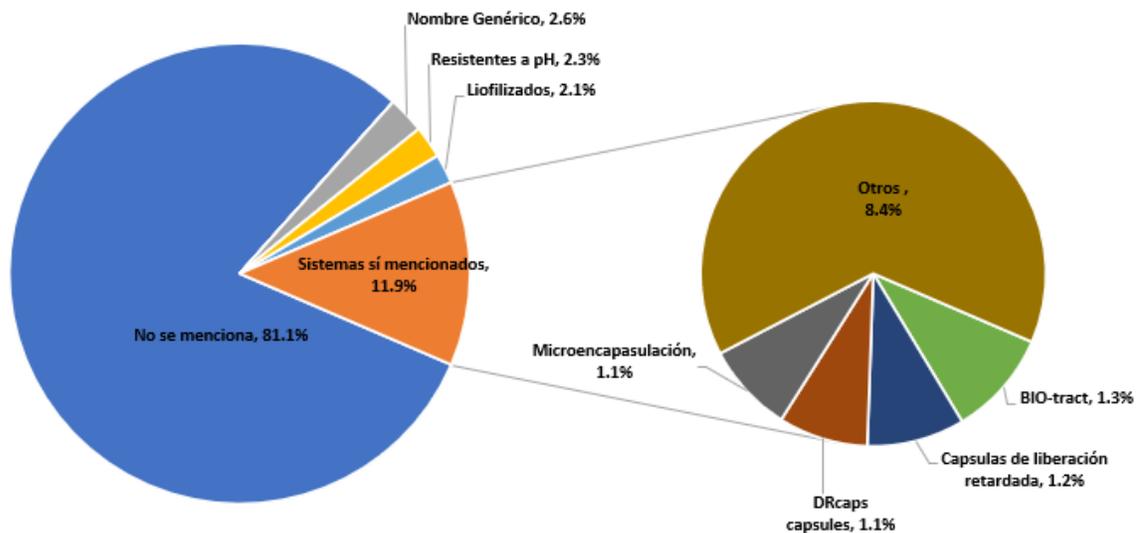


Figura 17. Comparación de los porcentajes de sistemas de liberación sí mencionados en suplementos probióticos contra los no mencionados. Estudio de mercado realizado por Lumina Intelligence. Referencia (Lumina Intelligence, 2019).

Por lo anterior mencionado, se dificulta la búsqueda de ejemplos de productos que ya se comercializan con esta tecnología, ya que bien, son muy pocos y el fabricante no siempre da a conocer esta información técnica. Sin embargo, a continuación, se mencionan algunos ejemplos de productos que, más que informar que son fabricados con la tecnología de microencapsulación, hacen uso de esa información como un diferenciador para su producto, resaltando la protección adicional que se le proporcionan a los probióticos con esta tecnología:

Tabla 7. Ejemplos de productos probióticos en el mercado con tecnología de microencapsulación y sus ventajas declaradas por el fabricante. Creación propia.

Producto	Datos del producto	Ventajas declaradas por el fabricante
<p data-bbox="245 375 558 403">Osmobiotic Flora Adulto</p>  <p data-bbox="180 1171 298 1194">Referencia:</p> <p data-bbox="180 1207 626 1415">Laboratorios BOIRON. (2018). OSMOBIOTIC FLORA ADULTO (probiótico). España. BOIRON. Recuperado de: https://www.boiron.es/nuestros-productos/complementos-alimenticios/osmobiotic-flora-adulto-probiotico</p>	<p data-bbox="797 331 985 359">Patentado por:</p> <p data-bbox="651 375 927 403">Laboratorios BOIRON®</p>	<p data-bbox="1159 331 1490 403">1. Tecnología de microencapsulación.</p>
	<p data-bbox="846 426 937 453">Cepas:</p> <p data-bbox="651 457 1133 529"><i>Bifidobacterium animalis subsp. Lactis</i> BS01 (LMG P-21384)</p> <p data-bbox="651 543 1110 571"><i>Lactobacillus casei</i> LC03 (DSM 27537)</p>	<p data-bbox="1159 470 1490 590">2. Protege a las cepas microbióticas de la acidez gástrica y les confiere una resistencia superior a las cepas no microencapsuladas. Llegan vivas en mayor número al intestino.</p>
	<p data-bbox="724 594 1058 621">Presentación y Contenido:</p> <p data-bbox="651 638 1133 665">12 sobres de 1.6 g. Cada sobre contiene:</p> <p data-bbox="651 682 964 709">2x10⁹ UFC de <i>B. animalis</i>.</p> <p data-bbox="651 726 922 753">1x10⁹ UFC de <i>L. casei</i>.</p>	<p data-bbox="1159 653 1490 772">3. Formulado y patentado sin alérgenos.</p>
	<p data-bbox="724 783 1058 810">Indicaciones terapéuticas:</p> <p data-bbox="651 827 1133 854">Tomar 1 sobre al día durante 12 días.</p> <p data-bbox="651 871 1133 1234">Para favorecer el bienestar y funcionamiento normal de la flora intestinal en adultos. Eficaz en casos de estreñimiento y síntomas asociados como hinchazón intestinal y dolor abdominal. Restablecer la función gastrointestinal y la regularidad en 12-24 días.</p>	

Producto	Datos del producto	Ventajas declaradas por el fabricante
<p data-bbox="256 310 548 338">Osmobiotic Flora Bebé</p>  <p data-bbox="180 1640 298 1661">Referencia:</p> <p data-bbox="180 1675 613 1734">Laboratorios BOIRON. (2018). OSMOBIOTIC FLORA BEBÉ (probiótico). España. BOIRON.</p> <p data-bbox="180 1749 334 1770">Recuperado de:</p> <p data-bbox="180 1785 604 1881">https://www.boiron.es/nuestros-productos/complementos-alimenticios/osmobiotic-flora-bebe-probiotico</p>	<p data-bbox="797 268 987 296">Patentado por:</p> <p data-bbox="659 310 935 338">Laboratorios BOIRON®</p>	<p data-bbox="1157 268 1492 338">1. Tecnología de microencapsulación.</p>
	<p data-bbox="846 359 938 386">Cepas:</p> <p data-bbox="654 401 1130 478"><i>Bifidobacterium breve</i> BR03 (DSM 16604).</p> <p data-bbox="654 493 1109 520"><i>Lactobacillus casei</i> LC03 (DSM 27537)</p>	<p data-bbox="1157 401 1492 569">2. Protege a las cepas microbióticas de la acidez gástrica y les confiere una resistencia superior a las cepas no microencapsuladas. Llegan vivas en mayor número al intestino.</p>
	<p data-bbox="724 590 1060 617">Presentación y Contenido:</p> <p data-bbox="654 632 1130 709">Frasco de 5 mL con cuentagotas. 5 gotas contienen:</p> <p data-bbox="654 724 946 751">2. x10⁸ UFC de <i>B. breve</i>.</p> <p data-bbox="654 766 946 793">2.5x10⁸ UFC de <i>L. casei</i>.</p>	<p data-bbox="1157 814 1492 884">3. Formulado y patentado sin alérgenos.</p>
	<p data-bbox="724 863 1060 890">Indicaciones terapéuticas:</p> <p data-bbox="654 905 1130 982">Administrar 5 gotas al día en una sola toma, durante 15 días.</p> <p data-bbox="654 997 1130 1367">Probióticos específicos para el cuidado intestinal de bebés de 1 mes a 3 años. Recomendado para favorecer el bienestar y funcionamiento normal de la flora intestinal, tanto en casos de diarreas como en situaciones de estreñimiento que es muy habitual en lactantes.</p>	

Producto	Datos del producto	Ventajas declaradas por el fabricante
<p data-bbox="228 310 578 338">Osmobiotic Immuno Senior</p>  <p data-bbox="180 1591 613 1871">Referencia: Laboratorios BOIRON. (2018). OSMOBIOTIC IMMUNO SENIOR (probiótico). España. BOIRON. Recuperado de: https://www.boiron.es/nuestros-productos/complementos-alimenticios/osmobiotic-immuno-senior-probiotico</p>	<p data-bbox="797 268 987 296">Patentado por:</p> <p data-bbox="651 310 927 338">Laboratorios BOIRON®</p>	<p data-bbox="1157 268 1490 338">1. Tecnología de microencapsulación.</p>
	<p data-bbox="846 363 938 390">Cepas:</p> <p data-bbox="651 405 1133 474"><i>Bifidobacterium longum</i> BL03 (DSM16603)</p> <p data-bbox="651 495 1133 564"><i>Bifidobacterium animalis subsp. Lactis</i> BS01 (LMG P-21384)</p> <p data-bbox="651 585 1133 655"><i>Bifidobacterium animalis subsp. Lactis</i> BS05 (DSM P-23032).</p>	<p data-bbox="1157 405 1490 747">2. Protege a las cepas microbióticas de la acidez gástrica y les confiere una resistencia superior a las cepas no microencapsuladas. Llegan vivas en mayor número al intestino.</p>
	<p data-bbox="724 726 1060 753">Presentación y Contenido:</p> <p data-bbox="651 768 1024 842">30 sobres de 1.6 g. Cada sobre contiene:</p> <p data-bbox="651 863 951 890">1x10⁹ UFC de <i>B. longum</i>.</p> <p data-bbox="651 911 1081 938">1x10⁹ UFC de <i>B. Subsp. Lactis</i> BS01</p> <p data-bbox="651 959 1081 987">1x10⁹ UFC de <i>B. Subsp. Lactis</i> BS05</p> <p data-bbox="651 1008 894 1035">1 µg de Vitamina D3</p>	<p data-bbox="1157 816 1490 978">3. Contiene 3 probióticos + Vitamina D que contribuye al funcionamiento normal del sistema inmune</p>
<p data-bbox="724 1050 1060 1077">Indicaciones Terapéuticas:</p> <p data-bbox="651 1092 1130 1165">Para adulto a partir de 60 años, tomar 1 sobre al día durante 30 días.</p> <p data-bbox="651 1186 1130 1304">Se recomienda que las personas con una inmunodeficiencia grave o enfermedad crónica.</p> <p data-bbox="651 1325 1130 1398">Contribuye al funcionamiento normal del sistema inmunitario.</p>	<p data-bbox="1157 1045 1490 1119">3. Formulado y patentado sin alérgenos.</p>	

Producto	Datos del Producto	Ventajas declaradas por el fabricante
<p style="text-align: center;">PROFLORA™</p>  <p>Referencia: GUna. (2020). Proflorea. Italia. Guna S.p.a. Recuperado de: https://guna.com/list/products/food-supplements/proflora/</p>	<p style="text-align: center;">Patentado por:</p> <p>GUNA S.p.a</p>	<ol style="list-style-type: none"> Asociación única e innovadora de 6 cepas probióticas exclusivas y selectas contenidas en “microcápsulas gastroprotejidas” para una máxima actividad biológica probiótica, en conjunto con fibra prebiótica. Capacidad de colonización probiótica aumentada. Garantiza que contiene al 100% de las células vivas y viables hasta antes de su fecha de caducidad. Estabilidad y supervivencia controlada de las cepas durante su producción, conservación y tiempo de comercialización, hasta el momento de su consumo. Libre de alérgenos.
	<p style="text-align: center;">Cepas:</p> <p><i>Bifidobacterium lactis</i> BS01 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA02 <i>Lactobacillus paracasei</i> LPC00 <i>Lactobacillus salivarius</i> LS03 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR06 <i>Lactobacillus plantarum</i> LP02</p>	
	<p style="text-align: center;">Presentación y Contenido:</p> <p>30 sobres de 2.5 g. Cada sobre contiene: 2x10⁹ UFC de cada cepa. Fibra prebiótica FOS</p>	
	<p style="text-align: center;">Indicaciones terapéuticas:</p> <p>Promueve el balance de la microbiota intestinal</p> <p>Soporte nutricional en caso de presentar: Disbiosis, desórdenes gastro-intestinales, intolerancia o reacciones adversas a ciertos alimentos, timpanitis.</p> <p>Ayuda a restablecer la flora intestinal en caso de: Tratamiento con antibióticos o laxantes, diarrea, desórdenes digestivos, síndrome de colon irritable, infecciones urogenitales, alergias respiratorias</p>	

Producto	Datos del Producto	Ventajas declaradas por el fabricante
<p data-bbox="300 310 506 338">PROLACTIS® LT</p>  <p data-bbox="180 1766 626 1896"> Referencia: Saninforma. (2020). PROLACTIS LT. Italia. Saninforma. Recuperado de: https://www.saninforma.it </p>	<p data-bbox="797 268 987 296">Patentado por:</p> <p data-bbox="654 312 951 340">Perrigo (Omega Pharma)</p>	<p data-bbox="1159 312 1490 659">1. Contiene probióticos microencapsulados para una mayor protección gástrica, fortaleciendo su efectividad y que garantiza la máxima supervivencia de los probióticos durante el tránsito gastrointestinal.</p> <p data-bbox="1159 726 1490 1205">2. Gracias a esta tecnología, además, basta con tomar la dosis de probióticos presente en un sobre de PROLACTIS® LT para tener la misma acción que se obtiene con una dosis cinco veces mayor que las mismas cepas elaboradas de forma tradicional.</p> <p data-bbox="1159 1272 1409 1299">3. Libre de alérgenos</p>
	<p data-bbox="846 363 938 390">Cepas:</p> <p data-bbox="654 407 1057 478"><i>Bifidobacterium breve</i> BR03 (DSM 16604)</p> <p data-bbox="654 495 1089 567"><i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR04 (DSM 16605)</p>	
	<p data-bbox="724 636 1060 663">Presentación y Contenido:</p> <p data-bbox="654 680 1036 800">14 sobres. Cada sobre contiene: 1x10⁹ UFC de cada cepa. Fibra prebiótica FOS</p>	
	<p data-bbox="724 867 1060 894">Indicaciones terapéuticas:</p> <p data-bbox="654 911 1133 1486"> Adultos, tomar 1 a 2 sobres al día por ciclos mensuales repetibles. Niños mayores a 3 años, tomar 1 sobre al día por al menos 14 días. Ayuda a promover o mantener el equilibrio de la microbiota intestinal, en todas aquellas circunstancias en las que la composición se encuentra alterada (disbiosis) por diversos factores como: Uso de antibióticos, virosis intestinal, ingesta inadecuada y/o consumo del alcohol, situaciones de estrés psicofísico. </p>	

Producto	Datos del Producto	Ventajas declaradas por el fabricante
<p data-bbox="269 310 537 338">PROBINUL® 5 Neutro</p>  <p data-bbox="180 1755 626 1890">Referencia: CADI GROUP. (2018). Probinul 5 Neutro. Italia. CADI GROUP FARMACEUTI. Recuperado de: https://cadigroup.eu/products</p>	<p data-bbox="776 264 1008 338">Dueño de patente: CADI GROUP®</p>	<p data-bbox="1159 264 1495 569">1. La microencapsulación de los probióticos garantiza una efectividad 5 veces mayor a la de la misma cantidad de probióticos cuando no son microencapsulados.</p> <p data-bbox="1159 632 1495 842">2. La vitamina C y E brindan una excelente acción antioxidante y contribuyen a estimular el sistema inmune.</p> <p data-bbox="1159 905 1409 932">3. Libre de alergen</p>
	<p data-bbox="846 359 938 386">Cepas:</p> <p data-bbox="651 405 1052 751"><i>Bifidobacterium lactis</i> BS01 <i>Lactobacillus plantarum</i> LP09 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR06 <i>Streptococcus thermophilus</i> ST15 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA02 <i>Bifidobacterium infantis</i> BI02 <i>Bifidobacterium longum</i> BL03 <i>Lactobacillus salivarius</i> LS03</p>	
	<p data-bbox="724 772 1060 800">Presentación y Contenido:</p> <p data-bbox="651 819 1117 936">12 sobres de 5 g. Cada sobre contiene: 1x10⁹ UFC de cada cepa Vitamina C y vitamina E.</p>	
	<p data-bbox="724 1003 1060 1031">Indicaciones terapéuticas:</p> <p data-bbox="651 1050 1133 1713">En adultos, tomar 1 sobre al día. Para niños menores de 8 años, se recomienda reducir la dosis a la mitad. Ayuda a reequilibrar la flora intestinal en situaciones como: Constipación crónica Durante y después de tratamiento con antibióticos. Diarrea de varios orígenes o provocada por quimioterapia o radioterapia. Síndrome del intestino irritable Apoya una alimentación correcta en caso de alteraciones metabólicas como diabetes, obesidad, celiaquía, malabsorción.</p>	

6.4 Conclusiones

Con base en la información desarrollada en el presente trabajo monográfico de actualización y en los objetivos planteados:

- Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped. La mayor parte de los probióticos empleados pertenecen a los géneros de bacterias *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Todos los probióticos deben de cumplir con criterios que permitan su adecuada identificación a nivel de género, especie y cepa, así como contar con la evidencia necesaria para demostrar su seguridad y eficacia.
- La microcápsulas son sistemas de tipo reservorio, constituidas por un núcleo interno que contiene el compuesto activo y una membrana de revestimiento que generalmente es de naturaleza polimérica. Las técnicas de microencapsulación se clasifican con base en los métodos que se utilizan para formar las microcápsulas, que pueden ser mediante métodos físicos o químicos. Este sistema es aprovechado principalmente por la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y textil.
- El método de microencapsulación ha demostrado ser uno de los más eficientes para conservar la viabilidad de los probióticos en las condiciones del tracto digestivo, en comparación de los probióticos que se administran de forma libre. La mayor parte de los materiales utilizados para la encapsulación de probióticos son polisacáridos, como alginato o quitosán, y proteínas como

caseína y proteína de suero de leche aislada. Las técnicas más utilizadas para microencapsular probióticos son: Extrusión, coacervación, secado por aspersion y emulsificación.

- Las pruebas de calidad son indispensables para asegurar la eficacia, seguridad y estabilidad del producto. Con ellas se evalúan: propiedades físicas mediante un análisis granulométrico y morfológico y propiedades fisicoquímicas, destacando el potencial zeta. Uno de los aspectos a evaluar más importantes para un producto probiótico es la conservación de la viabilidad celular, utilizando tanto modelos *in vitro* como *in vivo*, siendo este último el que mejor replica las condiciones reales a las que serán expuestas las microcápsulas.
- Se espera que el mercado de la microencapsulación crezca mucho en los próximos años, debido principalmente a las nuevas aplicaciones que se le dan en la industria alimenticia y farmacéutica. La microencapsulación ya figura dentro de los principales sistemas de liberación declarados por los fabricantes de suplementos alimenticios a nivel global, sin embargo, esto apenas representan aproximadamente un 1% de los principales suplemento que contienen probióticos, de acuerdo con el estudio de mercado realizado por Lumina Intelligence en el año 2018.

REFERENCIAS:

- Argueta, G. (2014). Efecto de un recubrimiento comestible adicionado con lactobacillus casei shirota, sobre las características fisicoquímicas, texturales, y sensoriales de una galleta tipo habanera.
- Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1551-1558.
- Bah, M. G., Bilal, H. M., & Wang, J. (2020). Fabrication and application of complex microcapsules: A review. *Soft Matter*, 16(3), 570-590.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of controlled release*, 235, 337-351.
- Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B. P., Duraivel, S., & Kumar, K. S. (2012). Controlled release drug delivery systems. *The Pharma Innovation*, 1(10).
- Bordas Pérez, I. (2018). Metoprolol succinate 95mg extended-release tablets. Universidad de Barcelona.
- Castillo-Escandón, V., Fernández-Michel, S. G., Cueto-Wong, M. C., & Ramos-Clamont Montfort, G. (2019). Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of controlled release*, 162(1), 56-67.
- Cutting, S. M. (2011). Bacillus probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220.
- De Boever, P., Deplancke, B., & Verstraete, W. (2000). Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. *The Journal of nutrition*, 130(10), 2599-2606.
- Dias, C. O., de Almeida, J. D. S. O., Pinto, S. S., de Oliveira Santana, F. C., Verruck, S., Müller, C. M. O., ... & Amboni, R. D. D. M. C. (2018).

Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. *Food bioscience*, 24, 26-36.

- Food and Agriculture Organization, & World Health Organization. (2006). *Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. FAO.
- Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., & Tzia, C. (2021). A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(9), 1515-1536.
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Pinto, S. S., Muñoz, I. B., & Amboni, R. D. (2013). Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 39-44.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365-378.
- Gad, S. C. (Ed.). (2008). *Pharmaceutical manufacturing handbook: production and processes* (Vol. 5). John Wiley & Sons.
- Ganesan, P. et al. (2013). Process optimization of Aerva lanata extract treated textile material for microbial resistance in healthcare textiles. *Fibers and Polymers*, 14(10): 1663-1673.
- Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., ... & Kim, N. (2017). Probióticos y prebióticos. *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos*, 1, 1-29.
- Guarner F, Requena T, Marcos A. (2010). Consensus statements from the Workshop "Probiotics and Health: Scientific evidence". *Nutr Hosp* 2010; 25: 700-704.
- Havenaar, R., & Huis, J. H. (1992). Probiotics: a general view. In *The Lactic Acid Bacteria Volume 1* (pp. 151-170). Springer, Boston, MA.

- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in microbiology*, 9, 1791.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiótic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11: 506-514.
- Hiippala, K., Jouhten, H., Ronkainen, A., Hartikainen, A., Kainulainen, V., Jalanka, J., & Satokari, R. (2018). The potential of gut commensals in reinforcing intestinal barrier function and alleviating inflammation. *Nutrients*, 10(8), 988.
- Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de gastroenterología de México*, 78(4), 240-248.
- ISO. (2015). Milk and milk products. Starter cultures, probiotics and fermented products Quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry
- Jyothi, S. S., Seethadevi, A., Prabha, K. S., Muthuprasanna, P., & Pavitra, P. (2012). Microencapsulation: a review. *Int. J. Pharm. Biol. Sci*, 3, 509-531.
- Khalighi, A., Behdani, R., & Kouhestani, S. (2016). Probiotics: A comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, 10, 63646.
- Lee, Y., Ji, Y. R., Lee, S., Choi, M. J., & Cho, Y. (2019). Microencapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* kbl409 by extrusion technology to enhance survival under simulated intestinal and freeze-drying conditions. *Journal of microbiology and biotechnology*, 29(5), 721-730.
- Lu, Y., & Park, K. (2012). Microencapsulation: methods and pharmaceutical applications. *Encyclopedia of pharmaceutical science and technology*, 4th edn. Informa Healthcare, USA.
- Lumina Intelligence. (2019). Delivery Systems and Consumers: Microencapsulated probiotics, HPMC capsules and more. Recuperado el 25 de marzo del 2022 de: <https://www.lumina->

intelligence.com/blog/probiotics/delivery-systems-and-consumers-microencapsulated-probiotics-hpmc-capsules-and-more/.

- Mazzola, G. (2015). The role of bifidobacteria in newborn health and the intestinal microbial balance.
- Mishra, D. K., Jain, A. K., & Jain, P. K. (2013). A review on various techniques of microencapsulation. *Int J Pharm Chem Sci*, 2(2), 962-968.
- Morelli, L., & Capurso, L. (2012). FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of clinical gastroenterology*, 46, S1-S2.
- Oliveira, G., & González-Molero, I. (2016). Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinología y Nutrición*, 63(9), 482-494.
- Ozen, M., & Dinleyici, E. C. (2015). The history of probiotics: the untold story. *Beneficial microbes*, 6(2), 159-165.
- Parker, R. B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*, 29, 4-8.
- Pasin, B. L., Azón, C. G., & Garriga, A. M. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130-151.
- Pech-Canul, A. D. L. C., Ortega, D., García-Triana, A., González-Silva, N., & Solis-Oviedo, R. L. (2020). A brief review of edible coating materials for the microencapsulation of probiotics. *Coatings*, 10(3), 197.
- Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M. A., Tortoló-Cabañas, K., & Gastón-Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47(1), 14-25.
- Pérez-López, A., Gómez-Lázaro, L., Martín-Sabroso, C., & Aparicio-Blanco, J. (2020). Sistemas de liberación prolongada de opioides: Analgesia y dependencia Extended-release delivery systems of opioids: Analgesia and dependence. *An Real Acad Farm*, 87(1), 35-51.
- Pizzorno, J. E., & Murray, M. T. (2013). Textbook of natural medicine/edited by Joseph E. Pizzorno, Michael T. Murray. P-279-294.

- Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 369-381.
- Reyna, E. N., Álvarez, G. M., Iliná, A., & Hernández, J. L. M. (2015). Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investigación y Ciencia*, 23(66), 64-70.
- Rodríguez, J. M. (2015). Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Nutrición hospitalaria*, 31(1), 33-47.
- Salaün, F. (Ed.). (2019). *Microencapsulation: Processes, Technologies and Industrial Applications*. BoD–Books on Demand.
- Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 2010; 1: 164-185.
- Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(2), 344-371.
- Sinko, P. J., & Singh, Y. (2011). *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences: physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences*. Walter Kluwer.
- Sobel, R., Versic, R., & Gaonkar, A. G. (2014). Introduction to microencapsulation and controlled delivery in foods. In *Microencapsulation in the food industry* (pp. 3-12). Academic Press.
- Suárez, J. E. (2013). Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 38-41.
- Suganya, V., & Anuradha, V. (2017). Microencapsulation and nanoencapsulation: a review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(3), 233-239.
- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., ... & Sanders, M. E. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and

scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(11), 687-701.

- Sobel, R., Versic, R., & Gaonkar, A. G. (2014). Introduction to microencapsulation and controlled delivery in foods. In *Microencapsulation in the food industry* (pp. 3-12). Academic Press.
- Timilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International journal of biological macromolecules*, 121, 1276-1286.
- Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Malhotra, M., Kahouli, I., & Prakash, S. (2013). Microencapsulation for the therapeutic delivery of drugs, live mammalian and bacterial cells, and other biopharmaceutics: current status and future directions. *Journal of pharmaceutics*, 2013.
- UMITHRA, M. y RAAJA, N. V. (2012). Micro-encapsulation and nano-encapsulation of denim fabrics with herbal extracts. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 37(4): 321-325.
- Vásconez, D. V. (2017). Calorimetría diferencial de barrido.
- Wescombe, P. A., Hale, J. D., Heng, N. C., & Tagg, J. R. (2012). Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Future microbiology*, 7(12), 1355-1371.
- Wieërs, G., Belkhir, L., Enaud, R., Leclercq, S., Philippart de Foy, J. M., Dequenne, I., ... & Cani, P. D. (2020). How probiotics affect the microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 454.
- Wilkins, T., & Sequoia, J. (2017). Probiotics for gastrointestinal conditions: a summary of the evidence. *American family physician*, 96(3), 170-178.
- Würth, R., Hörmannspurger, G., Wilke, J., Foerst, P., Haller, D., & Kulozik, U. (2015). Protective effect of milk protein based microencapsulation on bacterial survival in simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system. *Journal of functional foods*, 15, 116-125.

- Xu, Q., Geng, S., Dai, Y., Qin, G., & Wang, J. Y. (2013). CDBA-liposome as an effective sunscreen with longer UV protection and longer shelf life. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 129, 78-86.
- Yao, M., Xie, J., Du, H., McClements, D. J., Xiao, H., & Li, L. (2020). Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 857-874.
- Yoval, L. S., Palacios, L. M., Soberanis, M. P., & Guzmán, L. O. S. (2013). Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer. *Instituto Mexicano de tecnología del Agua*.
- Zhang, Z., Lv, J., Pan, L., & Zhang, Y. (2018). Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(19), 8135-8143.