



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS



**Encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en Alginato
de Calcio con Microestructura Modificada**

**Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Alimentarias**

Presenta:

I. en A. Flor de María Ortiz Martin

Directores:

Dra. Maribel Jiménez Fernández

Dr. Ebner Azuara Nieto

Xalapa de Enríquez, Veracruz

Agosto, 2016



Universidad Veracruzana



La presente tesis titulada

“Encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en Alginato de Calcio con Microestructura Modificada”,

Realizada por la

I.A. FLOR DE MARÍA ORTIZ MARTIN

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

Maestro en Ciencias Alimentarias

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 31 de agosto de 2016.


Dr. Cesar Ignacio Beristain Guevara


Dr. Oscar García Barradas


Dra. María Remedios Mendoza López

DEDICATORIAS

A Dios, por darme la fuerza y permitirme alcanzar una meta más en mi vida.

A mi mamá, por ser la persona que más me ha impulsado en la vida y que me ha dado todo para salir adelante, por ser mi motor y enseñarme a ser valiente, por su amor y apoyo incondicional y estar conmigo en cada momento de mi vida.

A mi hermana, por ser mi cómplice, mi amiga y mi confidente, por tantas risas y tanto amor, por siempre brindarme su apoyo y estar ahí cuando más lo necesito.

A mi papá, por su amor y confianza a lo largo de mi vida.

A mi novio Adrián, por ser mi compañero de vida y mi mejor amigo, por ir de la mano por el mundo, por estar a mi lado, por siempre sacarme una sonrisa aun en los momentos difíciles, por darme ánimos, amor y apoyarme en todo momento.

A mis tíos por brindarme su apoyo, consejos, cariño y estar al pendiente de mí siempre.

A mi abuelita Elsa, porque fue una madre para mí y me enseñó que hay que luchar por lo que queremos y a salir adelante siempre.

A mi abuelita Tame, por el amor y cariño que siempre me ha dado.

A la Dra. Maribel y al Dr. Ebner porque sin ellos esto jamás hubiera sido posible.

A mi amiga Dani, que formó parte de esta generación de la maestría y que sé que estaría muy orgullosa y estaríamos festejando juntas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Veracruzana, por formarme profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A mi directora de tesis, la Dra. Maribel Jiménez Fernández, por su apoyo incondicional, sus consejos, por brindarme tantos conocimientos y estar al pendiente de mí en todo momento. Gracias por siempre escucharme cuando la necesitaba!

A mi director de tesis, el Dr. Ebner Azuara Nieto, por todo su tiempo, su ayuda, su dedicación, paciencia e interés en mi trabajo. Gracias por su apoyo en todo momento y por tantas enseñanzas.

A mis sinodales, el Dr. César Ignacio Beristain Guevara, Dr. Oscar García Barradas y Dra. María Remedios Mendoza López, por su tiempo para la revisión de este trabajo y por sus valiosas sugerencias y aportaciones para mejorar esta tesis.

A Laura Acosta, por ayudarme desde que inicié este proyecto, por tu tiempo y por enseñarme tantas cosas que me sirvieron para poder realizar esta tesis.

A los amigos que me dejó la maestría, Kari, Jaz, Moni y Andrés, que a pesar de ya conocerlos, fue hasta ahora que nos unimos y se volvieron muy importantes para mí. Gracias por todos los momentos compartidos, tantas risas, desveladas estudiando y por hacer todos los días divertidos!

A Anita y Concha, porque a pesar de que solo estuvimos medio año compartiendo laboratorio, son mis grandes amigos de siempre y han estado todos estos años apoyándome.

A mis demás amigos de laboratorio, en especial a Dafne, Lis, Jaquie y Erick por ayudarme siempre que lo necesité y brindarme su apoyo y amistad.

Índice

1	INTRODUCCIÓN	1
2	MARCO TEÓRICO	3
2.1	Probióticos	3
2.1.1	Características de los microorganismos probióticos.....	4
2.1.2	Bacterias ácido lácticas (BAL).....	6
2.1.2.1	<i>Lactobacillus</i>	7
2.1.2.1.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8
2.1.3	Efectos benéficos de las bacterias probióticas	9
2.2	Encapsulación	11
2.2.1	Aplicación de la encapsulación.....	12
2.2.2	Métodos de encapsulación	14
2.2.2.1	Coacervación	15
2.2.3	Materiales de recubrimiento	16
2.2.3.1	Alginato	18
2.2.4	Liofilización	20
2.3	Microestructura	20
2.3.1	Materiales con microestructura modificada	23
2.4	Antecedentes	24
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	27
4.1	Objetivo general	27
4.2	Objetivos específicos	27
4.3	Hipótesis	27
5	MATERIAL Y MÉTODOS	28
5.1	Aspectos generales	28
5.2	Materia prima.....	28
5.3	Métodos	29

5.3.1	Estandarización de la cepa.....	29
5.3.1.1	Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i>	29
5.3.1.2	Preparación del inóculo estándar	29
5.3.2	Elaboración de cápsulas por coacervación cargadas con <i>L. plantarum</i>	30
5.3.3	Evaluación y caracterización de las cápsulas con <i>L. plantarum</i>	31
5.3.3.1	Viscosidad de la solución a encapsular.....	31
5.3.3.2	Actividad de agua.....	31
5.3.3.3	Humedad.....	31
5.3.3.4	Color.....	31
5.3.3.5	Higroscopicidad.....	32
5.3.3.6	Tiempo de disolución.....	32
5.3.3.7	Viabilidad de <i>L. plantarum</i> en las cápsulas	32
5.3.3.8	Eficiencia de encapsulación	33
5.3.3.9	Micrografías en Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)	33
5.3.4	Evaluación de las propiedades de flujo	34
5.3.4.1	Densidad aparente	34
5.3.4.2	Densidad compactada.....	34
5.3.4.3	Compresibilidad.....	34
5.3.4.4	Índice de Hausner	35
5.3.4.5	Ángulo de reposo	35
5.3.5	Evaluación de las cápsulas en condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i>	36
5.3.6	Evaluación de la estabilidad	36
5.3.6.1	Isotermas de adsorción de vapor de agua	36
5.3.6.2	Modelamiento de isotermas de adsorción	38
5.3.6.3	Cálculo de las propiedades termodinámicas.....	39
5.3.6.3.1	<i>Propiedades integrales</i>	39
5.3.6.4	Volumen de microporos.....	40
5.3.6.5	Almacenamiento.....	41
5.3.7	Análisis estadístico	41

6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
6.1	Estandarización de la cepa	42
6.1.1	Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i>	42
6.2	Elaboración de cápsulas por coacervación cargadas con <i>L. plantarum</i>	43
6.3	Evaluación y caracterización de las cápsulas con <i>L. plantarum</i>	44
6.3.1	Determinación de Actividad de agua, Humedad, Higroscopicidad y Tiempo de disolución.	44
6.3.2	Análisis de Color	46
6.3.3	Viabilidad	48
6.3.4	Eficiencia de encapsulación	50
6.3.5	Determinación de las Propiedades de flujo	51
6.3.6	Micrografías en Microscopio Electrónico de Barrido	53
6.3.7	Análisis de imagen	54
6.3.8	Evaluación de las cápsulas en condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i>	56
6.4	Evaluación de la estabilidad mediante isotermas de adsorción, propiedades termodinámicas y almacenamiento	59
6.4.1	Isotermas de adsorción	59
6.4.2	Modelamiento de isotermas de adsorción	60
6.4.3	Propiedades termodinámicas	63
6.4.3.1	Entalpía Integral (ΔH_{INT})	64
6.4.3.2	Entropía Integral (ΔS_{INT})	66
6.4.4	Volumen de microporos	70
6.4.5	Almacenamiento	73
7	CONCLUSIONES	77
8	BIBLIOGRAFÍA	79
9	ANEXOS	93
9.1	Agar y caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe)	93
9.2	Buffer PBS	93
9.3	Micrografías de las cápsulas obtenidas por goteo y atomización	94
9.4	Micrografías de las cápsulas en condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i>	95

9.5	Viabilidad de <i>L. plantarum</i> durante el almacenamiento.....	97
9.6	Constancia Congreso Nacional de Avances en Alimentación y Biotecnología	98

Índice de Figuras

Figura 1. Modelo de caja de huevo formado por cationes polivalentes de cloruro de calcio y los grupos con carga negativa del ácido gulurónico del alginato.	18
Figura 2. Escala nanométrica y ejemplos de nanoestructuras.	22
Figura 3. Celdas de equilibrio para la construcción de isothermas de adsorción.	37
Figura 4. Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en caldo MRS.	42
Figura 5. Cápsulas desarrolladas. 5a, Cápsulas obtenidas por goteo; 5b, Cápsulas obtenidas por atomización.	44
Figura 6. Espacio de color L* (Luminosidad), C* (Saturación) y °H (tono).	47
Figura 7. Microestructura de las cápsulas de alginato de calcio obtenidas por goteo, secadas por liofilización	54
Figura 8. Microestructura de las cápsulas de alginato de calcio obtenidas por atomización, secadas por liofilización.	54
Figura 9. Micrografías de las cápsulas durante condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i> .	58
Figura 10. Isotherma de adsorción de humedad a 25 °C de las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización.	60
Figura 11. Isotherma de adsorción de humedad a 15, 25 y 35 °C de las cápsulas obtenidas por goteo.	61
Figura 12. Isotherma de adsorción de humedad a 15, 25 y 35 °C de las cápsulas obtenidas por atomización.	62
Figura 13. Variación de la entalpía integral con la a_w para cápsulas obtenidas por goteo.	65
Figura 14. Variación de la entalpía integral con la a_w para cápsulas obtenidas por atomización.	66
Figura 15. Variación de la entropía diferencial e integral con la humedad a 25 °C para cápsulas obtenidas por goteo.	67
Figura 16. Variación de la entropía diferencial e integral con la humedad a 25 °C para cápsulas obtenidas por atomización.	68
Figura 17. Variación de la entropía integral con la a_w de cápsulas obtenidas por goteo.	69

Figura 18. Variación de la entropía integral con la a_w de cápsulas obtenidas por atomización.	70
Figura 19. Ajuste del modelo de Dubinin-Radushkevich para calcular el volumen de microporos para las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización a 25 °C.	71
Figura 20. Microestructura de las cápsulas de alginato de calcio obtenidas por goteo, secadas por liofilización.	94
Figura 21. Microestructura de las cápsulas de alginato de calcio obtenidas por atomización, secadas por liofilización.	94
Figura 22. Micrografías a 700X de las cápsulas obtenidas mediante goteo y atomización durante las condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i> .	95
Figura 23. Micrografías a 1000X de las cápsulas obtenidas mediante goteo y atomización durante las condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i> .	96

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Principales especies de microorganismos considerados probióticos.	7
Cuadro 2. Ejemplos de ingredientes activos que necesitan ser encapsulados para su uso en la industria de alimentos.	13
Cuadro 3. Métodos de encapsulación.	14
Cuadro 4. Materiales de recubrimiento.	17
Cuadro 5. Clasificación de los poros.	23
Cuadro 6. Actividad de agua (a_w) de sales a diferentes temperaturas.	38
Cuadro 7. UFC/mL al inicio de la fase estacionaria.	43
Cuadro 8. Propiedades fisicoquímicas iniciales de las cápsulas obtenidas mediante goteo y atomización.	46
Cuadro 9. Análisis de color de las cápsulas obtenidas mediante goteo y atomización.	48
Cuadro 10. Reducción logarítmica de la viabilidad de las cápsulas con <i>L. plantarum</i> obtenidas por goteo y atomización.	49
Cuadro 11. Eficiencia de encapsulación de las cápsulas obtenidas por goteo y atomización.	51
Cuadro 12. Propiedades de flujo de las cápsulas obtenidas por goteo y atomización.	53
Cuadro 13. Área, perímetro, diámetro de Feret y circularidad de las cápsulas obtenidas por goteo y atomización.	55
Cuadro 14. Evaluación de <i>L. plantarum</i> libre y encapsulado en condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i>	57
Cuadro 15. Parámetros calculados con el modelo de GAB para las cápsulas obtenidas por goteo y atomización.	63
Cuadro 16. Parámetros del modelo de Dubinin – Radushkevich para las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización.	72
Cuadro 17. Porcentaje de supervivencia de <i>L. plantarum</i> en las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización durante el almacenamiento a 25 °C a diferentes a_w	75
Cuadro 18. UFC/g de <i>L. plantarum</i> en las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización durante el almacenamiento a 25 °C a distintas a_w	97

Abreviaturas

a_w	Actividad de agua
cm	Centímetro
cm^3	Centímetro cúbico
DO	Densidad óptica
g	Gramo
kV	Kilovoltio
L	Litro
log	Logaritmo base 10
min	Minuto
mm	Milímetro
mm^2	Milímetro cuadrado
μm	Micrómetro
mPa	Milipascal
nm	Nanómetro
p	Peso
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
UFC	Unidades formadoras de colonias
v	Volumen

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud. El principal problema es su baja supervivencia frente a condiciones adversas, por lo que se requiere protegerlos mediante técnicas como la encapsulación. Por esta razón, se buscan alternativas para lograr una máxima protección de los probióticos y mayor estabilidad de las cápsulas mediante la modificación del material de pared a nivel de su microestructura. El objetivo de este trabajo fue encapsular *Lactobacillus plantarum* mediante coacervación por goteo y por atomización, produciendo esta última una modificación en la microestructura del alginato de calcio y así evaluar el efecto protector de esta modificación. Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y se realizaron micrografías mediante microscopio electrónico de barrido. Se evaluó la viabilidad de los microorganismos después del proceso de encapsulación y la viabilidad de *L. plantarum* libre y encapsulado durante las condiciones gastrointestinales *in vitro*. Mediante isoterma de adsorción obtenidas a 15, 25 y 35 °C y el cálculo de las propiedades termodinámicas se obtuvieron las condiciones de máxima estabilidad y se almacenaron a distintas a_w a 25 °C por 60 días. En las micrografías se muestra una superficie más porosa en las cápsulas por atomización, indicando cambios en su microestructura. La viabilidad de *L. plantarum* fue mayor en las cápsulas obtenidas por atomización que en las de goteo, dando una menor reducción logarítmica, obteniéndose una eficiencia de encapsulación mayor de 90.7 ± 0.70 % en comparación con las obtenidas por goteo que fue de 82.3 ± 0.67 %. Durante las condiciones gastrointestinales *in vitro* se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.001$) en la supervivencia entre las células libres y encapsuladas, siendo mayor la protección de las células encapsuladas, obteniendo un mayor efecto protector en las obtenidas por atomización. Mediante el cálculo de las propiedades termodinámicas se concluye que las cápsulas obtenidas por atomización son más estables a a_w de 0.536 y las de goteo a a_w de 0.115, lo cual posiblemente se deba al aumento en el número de microporos del alginato. Durante el almacenamiento se observa que la mayor supervivencia se presentó a a_w de 0.115 para las cápsulas obtenidas por goteo y de 0.536 para las obtenidas por atomización, a_w correspondientes a la zona de mínima entropía integral.

SUMMARY

Probiotics are live microorganisms that when are consumed in adequate amounts, confer the guest a health benefit. Their main problem is its low survival in adverse conditions, therefore it is required to protect them by techniques such as encapsulation. For this reason, alternatives are sought to achieve maximum protection of probiotics and increased stability of the capsules by modifying the wall material at a level of its microstructure. The aim of this work was to encapsulate *Lactobacillus plantarum* by coacervation using a dripping technique and atomization, the last one producing a modification in the microstructure of calcium alginate and thus evaluate the protective effect of this modification. The physicochemical properties were evaluated and micrographs were made using scanning electron microscopy. The viability of the microorganisms was evaluated after the encapsulation process and the viability of free and encapsulated *L. plantarum* during gastrointestinal conditions. By adsorption isotherms determined at 15, 25 and 35 °C and by calculating the thermodynamic properties, maximum stability conditions were obtained and capsules were stored at different a_w at 25 °C for 60 days. In the micrographs a porous surface is shown in capsules obtained by atomization what indicates changes in their microstructure. *L. plantarum* viability was higher in capsules obtained by atomization than in capsules obtained by dripping, giving a lower log reduction, obtaining higher encapsulation efficiency of $90.7 \pm 0.70\%$ compared with those obtained by dripping that was of $82.3 \pm 0.67\%$. During *in vitro* gastrointestinal conditions, significant difference ($P \leq 0.001$) was found in survival between free and encapsulated cells, being better the protection of the encapsulated cells, obtaining a greater protective effect on those obtained by atomization. By calculating the thermodynamic properties it is concluded that the capsules obtained by atomization are more stable at a_w of 0.536 and the capsules obtained by dripping at a_w of 0.115. During storage it shows that the highest survival was found at a_w of 0.115 for the capsules obtained by dripping and at a_w of 0.536 for those obtained by atomization, water activities corresponding to the minimum integral entropy zone.

1 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el interés por el consumo de alimentos funcionales ha ido aumentando gracias a los efectos positivos que imparten a la salud del consumidor. Entre los alimentos funcionales más importantes se encuentran los alimentos adicionados con bacterias probióticas, los cuales son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas, confieren al huésped beneficios a la salud. Los probióticos más utilizados pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), principalmente cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Dentro de los efectos benéficos de las bacterias probióticas, destacan los asociados al tracto gastrointestinal, al sistema inmune y al sistema cardiovascular. Para producir estos efectos benéficos a la salud, los probióticos deben sobrevivir y multiplicarse en el huésped, por esta razón, deben ser metabólicamente estables y activos en el producto, sobrevivir su paso a través del estómago y llegar al intestino grueso en cantidades mayores a 10^6 UFC/mL. Sin embargo, varios factores afectan la viabilidad de los probióticos, incluyendo el pH, el oxígeno, el almacenamiento, la temperatura, entre otros. Gracias a los nuevos avances tecnológicos, se han desarrollado diferentes métodos de protección de probióticos, los más utilizados son los métodos de microencapsulación.

La encapsulación es definida como el proceso en donde las células son retenidas dentro de una membrana encapsulante para reducir las lesiones y pérdidas de las células, resultando en una apropiada liberación en el intestino grueso. Gracias a este método es posible recubrir a los microorganismos, protegiéndolos contra factores ambientales perjudiciales, utilizando materiales de pared con base en carbohidratos, gomas, celulosas, lípidos, materiales inorgánicos o proteínas. Dichos materiales de pared deben proteger al centro activo, garantizando su máximo aprovechamiento y su correcta liberación. En la encapsulación de microorganismos se han utilizado materiales como el alginato de sodio, el cual es el polisacárido más usado para la encapsulación

en la industria alimentaria, por su bajo costo, gran biocompatibilidad, no presenta toxicidad alguna y forma matrices estables cuando se pone en contacto con sustancias cálcicas, tales como el cloruro de calcio.

La encapsulación es un excelente método para mantener la viabilidad de los microorganismos probióticos y permitir que lleguen a su sitio de acción para ejercer sus efectos benéficos, sin embargo, se busca lograr una mayor viabilidad, estabilidad y protección de las cápsulas modificando el alginato a nivel de su microestructura, aumentando de esta manera su número de microporos permitiendo conservar las cápsulas a mayores contenidos de humedad.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la modificación de la microestructura del alginato sobre la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* encapsulado por el método de coacervación mediante atomización.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Probióticos

La palabra probiótico se forma de dos vocablos, del latín “pro” (por o a favor de) y del griego “bios” (vida), por lo que probiótico significa “a favor de la vida” (Mukadam, 2015). La Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación definen a los probióticos como microorganismos vivos que al ser consumidos en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud (FAO/WHO, 2006), considerando cantidades adecuadas las concentraciones de 10^6 a 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo o mililitro de muestra (Dilnawaz *et al.*, 2011).

La definición de probiótico ha variado a lo largo del tiempo, con el objetivo de definir de una manera correcta lo que es un probiótico (De Vrese *et al.*, 2009). Vergin en 1954 definió a los probióticos como antagonistas de los antibióticos; Lilly y Stillwell en 1965 los definieron como sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos; Fuller en 1989 define a los probióticos como suplementos alimenticios microbianos vivos que ejercen una influencia beneficiosa sobre el crecimiento del huésped, mejorando así el equilibrio de su microbiota intestinal; Schaafsma en 1998 los define como microorganismos vivos que, con su ingesta en determinado número, provocan beneficios para la salud independientemente de sus propiedades nutritivas; Toedter en 2010 los llama microorganismos no patógenos, que son administrados para mejorar el balance de la microbiota humana, particularmente la del tracto gastrointestinal y de esta manera prevenir enfermedades (Chatterjee *et al.*, 2011).

Los probióticos son microorganismos vivos que son sensibles al calor, humedad, oxígeno y a condiciones ácidas. Es necesario mantener la viabilidad celular durante su procesamiento, almacenamiento y punto de venta (Kailasapathy, 2002), al igual que su supervivencia a través del tracto gastrointestinal después de la ingestión oral para aumentar sus beneficios a la salud (Mattilia-Sandholm *et al.*, 2002; Lisboa *et al.*, 2009),

para lograr esto, se utilizaron tecnologías de encapsulación que tienen el potencial de incrementar la viabilidad de los probióticos (Mortazavian *et al.*, 2007). El mercado de los probióticos es el segundo mercado más grande de ingredientes microencapsulados (Landi, 2011) y los productos lácteos siguen siendo los principales productos con contenido probiótico (Burgain *et al.*, 2011). Estos productos deben tener una cuenta de células vivas de por lo menos 10^6 UFC/g de producto.

El término probiótico incluye una gran gama de microorganismos, principalmente bacterias aunque también pueden encontrarse levaduras. Debido a que pueden permanecer con vida hasta el intestino grueso y proporcionar efectos beneficiosos sobre la salud del huésped, las bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias no ácido lácticas y algunas levaduras pueden ser considerados probióticos, siendo que las bacterias ácido lácticas son los probióticos más importantes conocidos por tener efectos benéficos en el tracto gastrointestinal humano (Anal y Singh, 2007).

Los beneficios de los probióticos son específicos de cada cepa, por esta razón es importante especificar el género y la especie de la bacteria probiótica cuando se mencionen sus beneficios a la salud (Luyer *et al.*, 2005; Canani *et al.*, 2007; Kekkonen *et al.*, 2007). Se ha mencionado que bacterias muertas, productos derivados de bacterias o productos finales del crecimiento bacteriano pueden proporcionar algunos beneficios a la salud, sin embargo por no estar vivos al ser administrados, no pueden ser considerados probióticos (Sanders *et al.*, 2007).

2.1.1 Características de los microorganismos probióticos

De acuerdo a Ramos *et al.* (2005); FAO/WHO (2006); Saulnier *et al.* (2009) para que un microorganismo pueda clasificarse como probiótico debe reunir ciertas características, como son:

- El microorganismo debe estar caracterizado a nivel de género, especie y cepa, preferiblemente en una colección de cultivos de confianza y reconocida internacionalmente.
- Ser seguro para el consumidor, determinado mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* para conocer mejor su función en los seres vivos.
- Ser viables en el momento de su consumo.
- Ser capaz de sobrevivir por el tracto gastrointestinal y de colonizar el intestino delgado como el grueso, favoreciendo el equilibrio de la microbiota intestinal.
- Deben proporcionar algún beneficio fisiológico como es la reducción de los niveles de colesterol e hipertensión, demostrado mediante estudios validados y bien descritos.
- Tener tolerancia a las enzimas y al oxígeno.
- Tener la capacidad de adherirse a las células epiteliales del huésped.
- Excluir a los patógenos, debido a la capacidad de segregar sustancias antimicrobianas.
- Facilitar y contribuir al equilibrio del ecosistema microbiano intestinal.

Es importante no confundir a los probióticos con los prebióticos, debido a que éstos últimos son ingredientes alimenticios no digeribles que brindan beneficios al consumidor, favoreciendo la proliferación de bacterias ácido lácticas, aumentando su impacto benéfico a la salud. Los oligosacáridos y polisacáridos son los alimentos más reconocidos por su efecto prebiótico (Lottipour *et al.*, 2012). Éstos deben tener resistencia a la acidez estomacal, soportar la hidrólisis enzimática y ser absorbidos a nivel gastrointestinal, además deben poder ser fermentados por la microflora intestinal y estimular el crecimiento de cierto tipo de bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar (Gibson *et al.*, 2004).

2.1.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos Gram positivos, no esporulados, carentes de citocromos, anaerobios facultativos, ácido tolerantes y estrictamente fermentativos, produciendo ácido láctico a partir de azúcares (Makarova *et al.*, 2006). Se encuentran en una gran variedad de ecosistemas como es la leche, el tracto gastrointestinal de la mayoría de los animales y la superficie de numerosas frutas y verduras; de los cuales la leche es el medio típico y satisfactorio para su proliferación. Son responsables de la fermentación láctica que produce ácido láctico a partir de azúcares que se lleva a cabo con el yogurt, las leches fermentadas y algunos tipos de quesos (Halasz, 2009).

A las bacterias ácido lácticas pertenecen los géneros de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, aunque también ha sido descrita *Escherichia coli* y ciertas especies de levaduras como *Saccharomyces boulardii*. Estas bacterias ofrecen grandes beneficios, unos como población del tracto intestinal y otros como bacterias fermentadoras utilizadas en la industria alimentaria. Aun teniendo diferentes campos de aplicación, la mayoría de los microorganismos probióticos son administrados a la dieta con el propósito de suplementar a la microflora intestinal y mejorar la salud del consumidor (Grajek *et al.*, 2005). En el Cuadro 1 se muestran las principales especies de microorganismos considerados probióticos.

Las BAL utilizan dos vías para la producción de ácido láctico mediante la fermentación de los carbohidratos, éstas son la ruta de Embden–Meyerhof, con generación casi exclusiva de ácido láctico y la vía de las pentosas, de la cual además del ácido láctico, se generan otros productos como etanol, ácido acético y dióxido de carbono (CO₂) (Lyhs *et al.*, 2002). De acuerdo a sus características fermentativas, las BAL se pueden dividir en 3 grupos: homofermentativas, que degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico como producto final y no fermentan pentosas ni gluconato; heterofermentativas facultativas, que fermentan las pentosas para producir ácido láctico y ácido acético y degradan las hexosas a ácido láctico, además pueden

producir CO₂ de gluconato pero no de glucosa y por último las heterofermentativas, que convierten por medio de la ruta de las pentosas, las hexosas en ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂ y pentosas en ácido láctico y ácido acético (Lyhs *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Principales especies de microorganismos considerados probióticos.

Lactobacillus spp.	Bifidobacterium spp.	Otros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. plantarum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>
<i>L. delbrueckii subsp bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. gasei</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. lactis</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. reuteri</i>		

FAO/WHO, 2006

2.1.2.1 Lactobacillus

El género *Lactobacillus* es el grupo más numeroso dentro de las BAL. Éstos son bacilos Gram positivos, en forma de bastones delgados y largos, no esporulados, sin flagelo, catalasa negativos (aunque algunas cepas pueden presentar actividad pseudo-catalasa), pueden ser aerotolerantes o anaeróbicos, altamente fermentativos, con

producción de ácido láctico, dióxido de carbono y etanol, e incluso en ocasiones ácido acético (Giraffa, 2010). El género *Lactobacillus* representa el grupo más grande dentro de la familia *Lactobacillaceae*, el cual está compuesto por 100 especies reconocidas (Claesson *et al.*, 2008).

Las cepas más utilizadas de *Lactobacillus*, para alimentos son *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. rhamosus*, *L. plantarum*, entre otras. Las cepas utilizadas en la industria actualmente son consideradas como no patógenas y son altamente reconocidas por sus beneficios a favor de la salud (Soccol *et al.*, 2010).

Los *Lactobacillus* son considerados probióticos por sus potenciales atributos terapéuticos y profilácticos. Se han reportado efectos benéficos a la salud, como la reducción del colesterol, prevención de la diarrea, la mejora de síntomas de intolerancia de la lactosa, efectos anticancerígenos y efectos inmunomoduladores (Giraffa, 2010; Pagnini *et al.*, 2010).

2.1.2.1.1 *Lactobacillus plantarum*

Es una bacteria ácido láctica Gram-positiva, no esporulada, heterofermentativa facultativa (fermenta azúcares para producir ácido láctico, etanol o ácido acético y dióxido de carbono bajo ciertas condiciones y sustratos selectivos). Es de forma bacilar, varillas rectas con extremos redondeados y es aerotolerante. Es encontrado en una variedad de nichos ambientales, incluyendo fermentaciones de lácteos, carnes, pescado y especialmente en vegetales o plantas (De Vries *et al.*, 2006; Mathara *et al.*, 2008).

Tiene una buena tasa de supervivencia a través del proceso industrial y periodo de conservación, debido a que se ha demostrado la capacidad de sobrevivir el tránsito gástrico y colonizar el tracto gastrointestinal en mamíferos; ya que es capaz de ir de los alimentos al tracto gastrointestinal donde puede sobrevivir y adherirse a la mucosa evitando su inmediata eliminación (Georgieva *et al.*, 2009).

Su crecimiento se ve afectado por factores como son el estrés por choques térmicos, estrés por un sistema ácido, choque alcalino de proteínas, estrés oxidativo relacionado a proteínas y sistemas por osmoprotección. Varias propiedades terapéuticas o profilácticas se asocian con *L. plantarum*, entre ellas la reducción de la diarrea, la reducción del dolor y estreñimiento asociado con el síndrome del intestino irritable, la reducción del hinchazón, flatulencia, habilidad para desplazar enteropatógenos y ejercer efectos positivos en la inmunidad en niños con VIH⁺ (Parvez *et al.*, 2006; Candela *et al.*, 2008).

En este trabajo se utilizaron tres cepas de *Lactobacillus plantarum*, CECT 7527, CECT 7528 y CECT 7529 contenidas en las cápsulas AB-LIFE.

2.1.3 Efectos benéficos de las bacterias probióticas

De acuerdo a Adelantado *et al.* (2006); Parvez *et al.* (2006); Collado *et al.* (2007) entre los mecanismos de acción de los probióticos se encuentran:

- ✓ Producción de sustancias antimicrobianas como por ejemplo, ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. Estos compuestos reducen el número de células patógenas viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas.
- ✓ Disminución del pH intestinal favoreciendo el crecimiento de microorganismos beneficiosos.
- ✓ Aumento de la resistencia a la colonización por competir con patógenos para unirse a los sitios de adhesión en la superficie del epitelio gastrointestinal, evitando el desequilibrio de la flora intestinal.
- ✓ Competición por nutrientes.
- ✓ Estimulación de la respuesta inmune. La estimulación de la inmunidad innata y adquirida protege contra la enfermedad intestinal, estimulando la producción de

IgA (Inmunoglobulina A), activando macrófagos e incrementando la concentración del IFN-gamma (interferón gamma).

- ✓ Reducen la incidencia y duración de diarreas.
- ✓ Producen importantes micronutrientes como vitaminas B2, B6 y biotina.
- ✓ Favorecen la asimilación de oligoelementos y la actividad antitumoral.
- ✓ Favorecen la digestión de la lactosa en personas intolerantes a la misma.
- ✓ Reducen los niveles de colesterol e hipertensión.
- ✓ Presentan actividad anticarcinogénica.
- ✓ Prevención de cáncer de colon.
- ✓ Inhiben la proliferación de células tumorales.
- ✓ Actúan frente infecciones del tracto genitourinario.

Para asegurar los beneficios de los probióticos durante el proceso de digestión, los microorganismos tienen que llegar al sitio de acción y permanecer en el sitio el tiempo suficiente (Doherty *et al.*, 2011; Madureira *et al.*, 2011; Heidebach *et al.*, 2012). Con el objetivo de mantener la viabilidad de los probióticos durante la producción, almacenamiento y su consumo en alimentos, se están proponiendo tecnologías de encapsulación. El objetivo de la encapsulación de probióticos es proteger a los microorganismos de condiciones adversas, permitiendo su llegada al intestino a la concentración requerida para ejercer sus efectos benéficos. Los microorganismos probióticos una vez estando en el sistema intestinal, son completamente liberados por diferentes maneras, como son los cambios en el pH, temperatura, actividad enzimática, tiempo y fuerza osmótica (Kailasapathy, 2002; Anal y Singh, 2007; Heidebach *et al.*, 2012).

2.2 Encapsulación

La encapsulación es una técnica que permite la protección de una amplia gama de materiales incluidos los de interés biológico, manteniéndolos dentro de una matriz polimérica o sistema de pared donde se crea un microambiente en la cápsula que es capaz de controlar las interacciones entre la parte interna y externa de ésta, con el propósito de incrementar la estabilidad y la vida media o de anaquel de éstos (Fuchs et al., 2006; Reyes, 2010). Las cápsulas liberan su contenido a tasas controladas durante periodos prolongados y bajo condiciones específicas (Wandrey *et al.*, 2010). Este proceso atrapa una sustancia (agente activo) dentro de otra sustancia (material de pared). La sustancia encapsulada, puede ser llamada núcleo, relleno, activo, o fase de carga útil y la sustancia que está encapsulando es llamada recubrimiento, membrana, cáscara, cápsula, material de pared, fase externa o matriz. (Fang y Bhandari, 2010).

En la ciencia e ingeniería de los alimentos la encapsulación involucra la incorporación de agentes activos como ingredientes naturales, polifenoles, aditivos volátiles, enzimas, bacterias (por ejemplo, bacterias ácido lácticas actuando como iniciadores o probióticos) en pequeñas cápsulas, dándoles la oportunidad de ser estables, protegidos y preservados contra la pérdida nutricional y de salud y actuar eventualmente como agentes antimicrobianos. Las matrices en contacto con los alimentos son generalmente compuestos naturales y deben ser Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS) para la salud humana (Nazzaro *et al.*, 2012).

La encapsulación permite cubrir a los probióticos activos con un material adecuado, controlando así el movimiento dentro y fuera de la cápsula. La liberación del centro activo se logra eliminando la pared de la cápsula, la cual se puede dar por distintas formas: por ruptura mecánica, disolución de la pared, fusión de la pared o por difusión a través de la misma (Sayrfa y Mohammed, 2010). La encapsulación preserva las bacterias ácido lácticas, y probióticos en alimentos y durante su recorrido a través del tracto gastrointestinal, y puede contribuir al desarrollo de nuevos alimentos funcionales (Nazzaro *et al.*, 2012).

La investigación acerca de la encapsulación comenzó en la década de 1930, cuando Green desarrolló las primeras copias sin papel carbón, utilizando materiales coloidales encapsulados. Después en 1950, Swisher patentó el método de extrusión logrando encapsular aceites esenciales y Wuster desarrolló la primera microencapsulación, mediante la técnica de lecho fluidizado, logrando desarrollar recubrimientos para fármacos permitiendo su liberación dosificada, mejorando la estabilidad y enmascarando el sabor.

En la actualidad, la tecnología de la encapsulación es comúnmente utilizada por las industrias farmacéutica, química, cosmética, de alimentos y de pinturas (Parzanese, s.f.).

2.2.1 Aplicación de la encapsulación

La encapsulación en aplicaciones alimentarias puede ser usada para distintos propósitos: (i) proteger ingredientes sensibles (aromas y sabores, ácidos grasos poliinsaturados, enzimas, probióticos, etc.) de factores ambientales (ácidos, bases, oxígeno, humedad, luz) durante su almacenamiento, (ii) convertir núcleos líquidos en polvos para facilitar la manipulación y mejorar la estabilidad de almacenamiento, (iii) aislar el núcleo de participar en interacciones indeseables con otros ingredientes durante el procesamiento o almacenamiento de alimentos que pueden impactar en la degradación del núcleo o la vida de anaquel del producto final, (iv) mejorar el contenido nutricional de un alimento sin afectar su sabor, aroma o textura, (v) controlar la liberación de sabores deseables y/o enmascarar sabores indeseables para mejorar la calidad del alimento, y (vi) liberación de los ingredientes alimenticios en el tiempo apropiado durante el procesamiento o almacenamiento o liberación controlada, sostenida o retardada del ingrediente (Desai y Park, 2005; Augustin y Hemar, 2009; Saglowicz y Leser, 2010). El Cuadro 2 muestra ejemplos de ingredientes activos que son comúnmente encapsulados en el área de alimentos.

Cuadro 2. Ejemplos de ingredientes activos que necesitan ser encapsulados para su uso en la industria de alimentos.

Nombre	Ejemplos	Ventajas potenciales de encapsulación
Sabores	Aceites cítricos	Permitir la incorporación en medio acuoso. Facilitar su almacenamiento y utilización. Retardar la degradación química. Controlar la liberación de sabores.
Antimicrobianos	Aceites esenciales	Mejorar la compatibilidad de la matriz. Facilitar su almacenamiento y utilización. Retardar la degradación química. Enmascarar sabores desagradables. Incrementar la potencia.
Antioxidantes	Carotenoides	Permitir su incorporación en medios acuosos. Facilitar su almacenamiento y utilización. Retardar su degradación química.
Péptidos bioactivos	Colecistoquinina	Retardar su degradación en el estómago. Reducir la amargura y la astringencia. Controlar su liberación y su bioactividad.
Oligosacáridos y fibras	Quitosano	Evitar interacciones adversas con ingredientes. Mejorar la textura del producto. Controlar su liberación en el tracto gastrointestinal.
Lípidos bioactivos	ácidos grasos ω -3	Permitir su incorporación en medios acuosos. Evitar su degradación química (oxidación). Controlar su liberación en el tracto gastrointestinal.
Vitaminas	Vitamina D	Permitir su incorporación en medios acuosos. Facilitar su uso. Evitar su degradación química (oxidación). Mejorar su biodisponibilidad.
Probióticos	Bacterias ácido lácticas	Evitar su degradación en el estómago. Mejorar la viabilidad celular en el producto.

Garti y McClements, 2012

2.2.2 Métodos de encapsulación

Las propiedades de los compuestos funcionales y los materiales de pared, como son el tamaño de partícula, el tamaño de distribución, la eficiencia de encapsulación, la forma y la solubilidad, son alteradas por las técnicas usadas para la encapsulación. Es importante seleccionar la técnica apropiada basada en el requerimiento de la encapsulación. El mayor problema de las cápsulas es la agregación y la fuga irreversible de los compuestos funcionales, y es necesario disminuir su humedad a tal grado que permita una mejor estabilidad de esos compuestos (Choi *et al.*, 2004). El secado incrementa la estabilidad comparada con la fuente original, y puede sostener los compuestos por largos periodos de almacenamiento (Guterres, 2009).

Hay diferentes métodos para la encapsulación de los materiales del núcleo, y todas esas técnicas son generalmente categorizadas en tres tipos: (1) Métodos mecánicos; (2) Métodos físico-químicos; y (3) Métodos físico-mecánicos (Ghosh, 2006). En el Cuadro 3 se muestran algunas técnicas de encapsulación de acuerdo a su clasificación:

Cuadro 3. Métodos de encapsulación.

Métodos Químicos	Métodos Físico-químicos	Métodos Físico-mecánicos
Polimerización Interfacial	Coacervación y separación de fase	Secado por aspersión y congelación
Polimerización <i>In situ</i>	Encapsulación Sol-gel	Recubrimiento de lecho fluidizado
Policondensación	Microencapsulación CO ₂ supercrítica asistida	Evaporación de disolvente

Garti y McClements, 2012

Para efectos del presente trabajo, la elaboración de las cápsulas con contenido probiótico se realizó mediante un método físico-químico, la coacervación simple, por

dos métodos: para las cápsulas con alginato modificado se realizó la coacervación mediante atomización y para las cápsulas con alginato no modificado, por goteo.

2.2.2.1 Coacervación

La coacervación se refiere a la separación de un sistema coloidal en dos fases líquidas, cuando las soluciones de dos coloides hidrofílicos son mezclados bajo condiciones adecuadas, es decir, al mezclar polielectrolitos de cargas opuestas en un medio acuoso (Lanchman *et al.*, 2013). Este proceso consiste principalmente en tres pasos básicos: emulsificación o separación de las tres fases inmiscibles, coacervación o deposición del recubrimiento y endurecimiento o estabilización del recubrimiento (Zhang *et al.*, 2012)

El proceso de coacervación puede ser categorizado en dos tipos: simple o compleja, dependiendo del número de polímeros usados como material de pared. La coacervación simple utiliza sólo un tipo de polímero, la separación de fases es inducida por la adición de agentes fuertemente hidrofílicos, alcohol o sal a la solución coloidal, cambio en la temperatura, o cambio en el pH. La coacervación compleja ocurre principalmente a través de interacciones electrostáticas entre dos o más soluciones poliméricas con cargas opuestas, y resultan en dos fases líquidas inmiscibles: una es la fase continua pobre en polímero; la otra es la fase densa rica en polímero, también llamada fase coacervada, que es usada para recubrir una variedad de ingredientes activos del núcleo (Schmitt y Turgeon, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2013). La coacervación compleja es principalmente controlada por la densidad de carga de los biopolímeros, que es ante todo influenciada por el pH y la fuerza iónica de la dispersión (Souza *et al.*, 2013).

Un coacervado se considera el soluto polimérico separado en forma de una diminuta gota esférica, la cual se mantiene unida por las fuerzas hidrofóbicas de un líquido circundante. Los coacervados poseen propiedades osmóticas y se forman espontáneamente a partir de ciertas soluciones orgánicas diluidas (Lanchman *et al.*, 2013). La tecnología de coacervación ofrece numerosas ventajas sobre otros métodos

de encapsulación, para proteger a los ingredientes funcionales lábiles y de alto valor, como son las condiciones de preparación no agresivas (ni disolventes orgánicos ni temperaturas drásticas son requeridas), alta integridad del material de pared, alta eficiencia de encapsulación, y excelentes características de liberación controlada, ya que las microcápsulas resultantes son inmiscibles en agua (Jin *et al.*, 2007; Beindorff y Zuidam, 2010; Taneja y Singh, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

2.2.3 Materiales de recubrimiento

Las técnicas de encapsulación son principalmente usadas en la liberación de compuestos funcionales a los sitios objetivos y en gran parte depende de los materiales de pared usados. La efectividad de los compuestos funcionales depende totalmente de la preservación de los compuestos (Chen *et al.*, 2006). Entre todos los materiales, los más extensamente utilizados para encapsulación en aplicaciones alimentarias son los polisacáridos, seguido de proteínas y lípidos (Nedovic *et al.*, 2011).

La correcta elección del material que va a ser empleado como recubrimiento del centro activo es un paso muy importante. Esta selección se basa en las características químicas del centro activo, en su aplicación, en las condiciones de almacenamiento y el proceso de encapsulación (Sandoval *et al.*, 2004).

Los materiales usados para el diseño de recubrimientos protectores de encapsulados deben ser de grado alimenticio, biodegradables, y capaces de formar una barrera entre la fase interna y su entorno. La mayoría de los materiales usados para la encapsulación en el sector alimenticio son biomoléculas. Los materiales tienen que proporcionar máxima protección al material activo contra las condiciones ambientales, mantener los activos dentro de la estructura de la cápsula durante el procesamiento o el almacenamiento bajo varias condiciones, no reaccionar con el material encapsulado, tener buenas características reológicas a alta concentración si es necesario y tener la capacidad de facilitar el trabajo durante la encapsulación. En el Cuadro 4 se muestran los principales materiales de recubrimiento usados en la encapsulación de alimentos.

Cuadro 4. Materiales de recubrimiento.

Tipo de Material	Ejemplos
Proteínas	Albúmina, Caseinatos, gelatina, gluten, péptidos, proteína de soya, proteínas de guisantes, proteínas de suero
Azúcares simples	Fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, sacarosa
Carbohidratos/gomas	Quitosano, jarabe de maíz, ciclodextrina, jarabe de glucosa deshidratado, maltodextrinas, almidones y derivados de almidones modificados, agar, alginatos, carragenina, goma arábica, pectina, goma gelana
Lípidos	Grasas y aceites comestibles, grasas fraccionadas, grasas duras, cera de abejas
Emulsificantes	Mono y diglicéridos, lecitina, liposomas, surfactantes de grado alimenticio
Celulosa	Acetilcelulosa, carboximetilcelulosa, celulosa acetato butirato, celulosa acetato ftalato, etilcelulosa, metilcelulosa

Garti y McClements ,2012

El material de recubrimiento empleado para este proyecto fue un polisacárido, el alginato de sodio.

2.2.3.1 Alginato

El alginato es un polisacárido extraído principalmente de algas marinas. Este polisacárido natural está constituido por unidades de ácidos *D*-manurónico y *L*-gulurónico unidos linealmente por enlaces 1,4-glucosídico (Mokarram *et al.*, 2009; Katouzi *et al.*, 2011). Los alginatos con alto contenido de ácido gulurónico tienden a formar geles más rígidos y de mayor porosidad, al contrario de alginatos ricos en ácido manurónico (Kailasapathy, 2002; Anal y Singh, 2007).

Este biopolímero es el más utilizado para la formación de matrices en la industria de alimentos, debido a su facilidad de uso, biocompatibilidad, seguridad y bajo costo (Sohail *et al.*, 2011; Bruschi y Záchia, 2011; Burgain *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta que los alginatos son capaces de gelificar en presencia de cationes polivalentes, se desarrolló el modelo conocido como el de la caja de huevos, que se muestra en la Figura 1 (“*egg-box model*”) y que es aceptado en la actualidad. Este modelo requiere el mecanismo de unión cooperativa de dos o más cadenas. La cadena plegada de unidades de ácido gulurónico (G) del alginato sódico se muestra como una estructura bidimensional similar a una caja de huevos de cartón arrugado con intersticios en los cuales se sitúan y coordinan los iones calcio (Grant *et al.*, 1973).

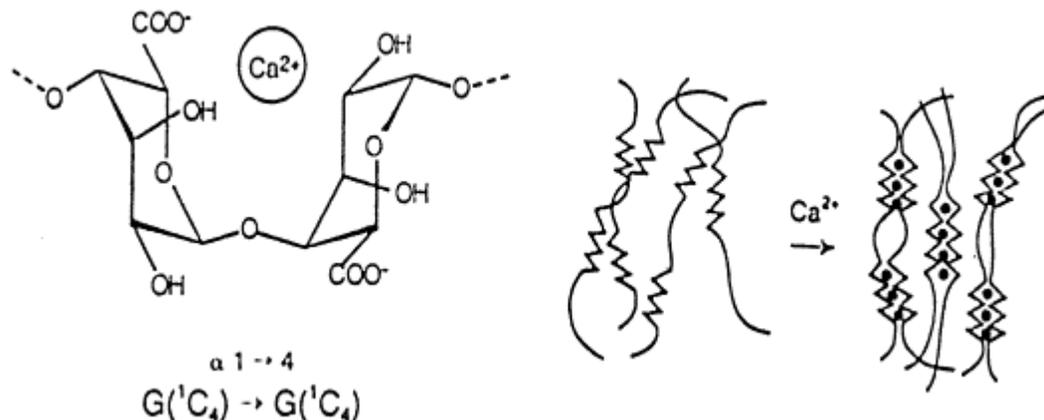


Figura 1. Modelo de caja de huevo formado por cationes polivalentes de cloruro de calcio y los grupos con carga negativa del ácido gulurónico del alginato.

Imagen tomada de Prieto *et al.*, 2007 modificada.

Cuando dos cadenas de bloque G se alinean, se forman cavidades entre ellas en donde se acomoda un catión polivalente. Estos cationes polivalentes son capaces de solidificar soluciones de alginato de sodio y formar geles, el catión más empleado para entrecruzar alginato es el calcio (Ca^{2+}). Al entrar en contacto los cationes, comienzan a reemplazar al sodio en los extremos carboxílicos del alginato. Por su valencia múltiple, actúan atrayendo electrostáticamente los extremos aniónicos de dos cadenas adyacentes de alginato, formando una red sólida (González, 2009).

Las ventajas de la utilización del alginato como agente encapsulante son diversas, no presenta toxicidad alguna y forma matrices estables cuando se pone en contacto con sustancias cálcicas, tales como el cloruro de calcio (CaCl_2). Sin embargo, gran parte de su éxito se basa en la correcta elección de materiales y de óptima metodología de elaboración. Los alginatos con alto contenido de ácido gulurónico son los más utilizados en la encapsulación, ya que presentan mejor resistencia mecánica, alta porosidad y tolerancia a ciertas sales y agentes quelantes en el proceso de extrusión (Kailasapathy, 2002).

Aun siendo el alginato un excelente material de pared, se busca obtener una mayor estabilidad de las cápsulas mediante la modificación del material de pared a nivel de su microestructura. Esta modificación se logra mediante el proceso de coacervación por atomización, ya que a diferencia de la coacervación por goteo, va a disminuir el tamaño de las partículas, aumentando así el área superficial. De igual manera, hay un aumento en la velocidad de reacción, es decir, en la gelificación, obteniendo una mayor homogeneidad en el tamaño de los poros, creando una mayor cantidad de microporos, logrando así un cambio en su microestructura.

2.2.4 Liofilización

El proceso de liofilización es una alternativa de interés como método de conservación de alimentos que permite prolongar el tiempo de vida útil, conservando las propiedades fisicoquímicas relacionadas con la calidad. Consiste en la eliminación del agua de un producto por sublimación del agua libre acompañada de la evaporación de algunas porciones remanentes de agua no congelable (Abdelwahed *et al.*, 2006).

Debido a la ausencia de agua líquida y a las bajas temperaturas requeridas para el proceso, la mayoría de las reacciones de deterioro y reacciones microbiológicas se detienen dando un producto final de excelente calidad. Así la liofilización se considera uno de los mejores métodos de conservación de las propiedades organolépticas y nutritivas de productos biológicos (Shui y Leong, 2006).

La sublimación ocurre cuando la presión de vapor y la temperatura de la superficie del hielo se encuentran por debajo del punto triple del agua (Song *et al.*, 2005). Los productos liofilizados se caracterizan por su baja actividad de agua, bajos cambios de volumen y de forma, alta capacidad de rehidratación, aumento en su porosidad y por presentar un estado vítreo (Krokida y Maroulis, 2000).

2.3 Microestructura

La microestructura de los alimentos es la organización y la interacción de elementos dentro de un alimento. El conocimiento de la microestructura es necesario cuando se desea controlar adecuadamente las propiedades de los alimentos ya que existe una conexión entre estructura y funcionalidad. Las mejoras en la calidad de los alimentos existentes y la creación de nuevos productos estarán basadas en la modificación de la estructura a un nivel por debajo del microscópico, esto se debe a que la mayoría de los elementos responsables de las propiedades de transporte, comportamiento físico y reológico, textura y características sensoriales de los alimentos están por debajo del rango de 100 μm (Aguilera, 2005).

El desarrollo de la nanotecnología ha llevado al desarrollo de muchas oportunidades tecnológicas, comerciales, y científicas para la industria (Huang *et al.*, 2010). La aplicación de la nanotecnología en la industria alimentaria involucra varios cambios en la macroescala, como son la textura, el sabor y el color, que ha llevado al desarrollo de nuevos productos. Esto además mejora muchas funciones, como son la biodisponibilidad oral, solubilidad en agua y la estabilidad térmica de los compuestos funcionales (McClements *et al.*, 2009).

La nanotecnología es un campo multidisciplinario que cubre una vasta gama de procesos, materiales y aplicaciones que abarcan las ciencias físicas, químicas, biológicas, ingeniería y electrónica. Se centra en la caracterización, fabricación, y manipulación de sustancias en tamaño en el rango de la escala nanométrica, aproximadamente entre 1 y 100 nm. El pequeño tamaño de partícula, en combinación con el incremento del área superficial, exhibe propiedades únicas y novedosas creando así gran potencial para diversas aplicaciones (Weiss *et al.*, 2006; Rashidi y Khosravi-Darani, 2011).

Un nanomaterial es definido como cualquier material que tiene una o más dimensiones en el rango de la nanoescala, mientras que una nanopartícula es una entidad discreta que tiene las tres dimensiones en la nanoescala (FAO/WHO, 2010). Se ha reportado que el tamaño nano mejora las propiedades de los compuestos bioactivos como son las propiedades de liberación, solubilidad, y absorción eficiente a través de las células y tiempos de residencia prolongados de los compuestos en el tracto gastrointestinal (Ezhilarasi *et al.*, 2013). En la Figura 1 se muestra la escala nanométrica (10^{-9} m) y algunos ejemplos de nanoestructuras.

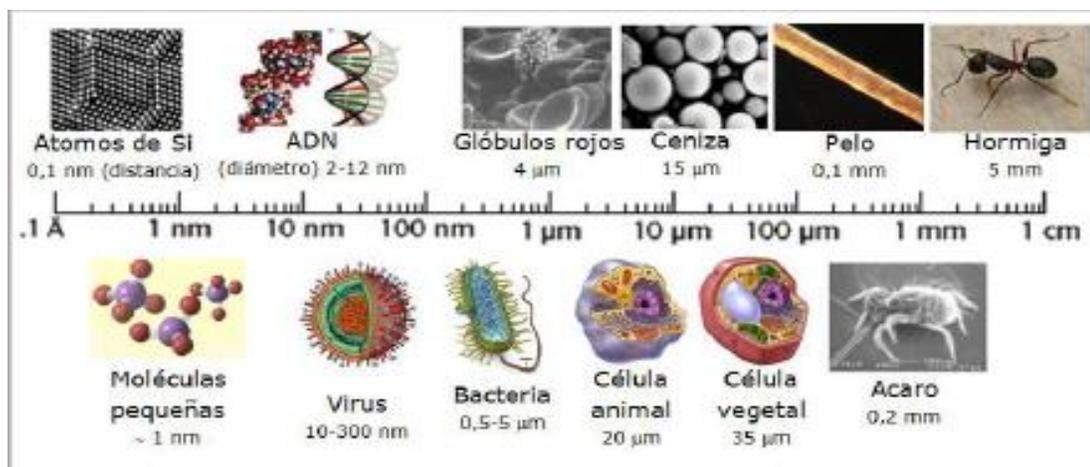


Figura 2. Escala nanométrica y ejemplos de nanoestructuras.

Imagen tomada de Gago, 2009

Nuevos productos alimenticios que contienen nanoestructuras se han introducido o se están desarrollando actualmente para diferentes propósitos (Chaudhry *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2008; Luykx *et al.*, 2008; Rao y McClements, 2012): (i) para proteger a los nutraceuticos de una degradación durante su manufactura, distribución y almacenamiento, mejorando su estabilidad, (ii) para mejorar la biodisponibilidad de ingredientes alimentarios funcionales poco solubles que elevan el valor nutricional, (iii) para aumentar la vida de anaquel de los alimentos protegiéndolos del oxígeno y agua (Leclercq *et al.*, 2009), (iv) para optimizar y modificar las características sensoriales de productos alimenticios creando nuevas sensaciones al consumidor (ej. textura, consistencia, desarrollo de nuevos sabores o enmascaramiento de sabores, alteración del color), y (v) para controlar la liberación de ingredientes funcionales. Además, la encapsulación también ayuda en la liberación controlada de ingredientes activos en donde el tiempo de retención gastrointestinal puede ser prolongado y el sitio de liberación del ingrediente activo puede ser ajustado de acuerdo a la necesidad (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

El presente trabajo se centra en el estudio de los materiales con microestructura modificada, los cuales presentan un aumento en el número de microporos, en los que

las moléculas de agua se acomodarán ordenadamente sin que tomen parte de reacciones de deterioro.

2.3.1 Materiales con microestructura modificada

A diferencia de las nanopartículas que pueden atravesar tejidos, los materiales nanoporosos impiden la infiltración de moléculas grandes (adsorción selectiva). Existen diferentes clasificaciones de la porosidad de los materiales tal es el caso de Roman y Palmese (2006) que definen a los materiales con poros o cavidades en el rango de 1 a 100 nm como “nanoporosos”. Sin embargo, la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) establece una clasificación de tamaño de los poros (Cuadro 5), según sea el valor de su diámetro promedio:

Cuadro 5. Clasificación de los poros.

Tipo de poro	Diámetro del poro
Microporos	<2nm
Mesoporos	2-50nm
Macroporos	>50nm

IUPAC

Numerosas investigaciones de años recientes han permitido concluir que la adsorción de gases y vapores en microporos difiere de la adsorción en materiales con poros grandes o no porosos, debido a que dentro de los microporos las moléculas de agua se acomodan ordenadamente y mientras exista volumen de microporos disponible las moléculas se adsorberán disminuyendo su entropía integral. Los microporos son los primeros en llenarse a una determinada a_w , cuando terminan, se crea una resistencia en la boca de los poros, que disminuye la velocidad de sorción de las moléculas de agua (Azuara y Beristain, 2007).

Un alimento cuya matriz microporosa pueda ser controlada, aumentando el número de microporos, podría hacer posible conservar los productos con altos contenidos de humedad sin que el agua forme parte en las reacciones de deterioro (Azuara y Beristain, 2006). Los microporos son los primeros en interaccionar con las moléculas de agua del ambiente, favoreciendo un mayor orden o mínima entropía del agua que puede ayudar a conferir un blindaje a los alimentos, haciendo que el agua pueda encontrarse menos disponible para participar en reacciones de deterioro, ya que los microporos actúan como filtro de moléculas grandes.

2.4 Antecedentes

Priya *et al.* (2011) evaluaron la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* en las condiciones adversas del tracto gastrointestinal mediante su encapsulación con polielectrolitos nanoestructurados: Quitosano y carboximetilcelulosa. La supervivencia de las células encapsuladas en los jugos gástricos e intestinales simulados aumentó significativamente en comparación con las células sin encapsular. El aumento de supervivencia de *L. acidophilus* encapsulado se atribuyó a la impermeabilidad de las nanocapas de polielectrolitos a las enzimas como la pepsina y la pancreatina que causan proteólisis y a la estabilidad de las nanocapas al pH gástrico e intestinal.

Viveros-Contreras *et al.* (2013) estudiaron la estabilidad del ácido ascórbico encapsulado en una matriz de alginato de calcio por coacervación, utilizando dos métodos: goteo y atomización, seguido de secado por liofilización. Se realizaron isoterms y se obtuvo la mínima entropía integral a una a_w de 0.234 en los productos obtenidos por goteo, mientras que en el polvo obtenido por atomización, se obtuvo a una a_w de 0.706.

Pascual-Pineda *et al.* (2014) encapsularon carotenoides por coacervación usando material nanoestructurado (NE) preparado con alginato/zeolita (1:3) y otro no nanoestructurado (AA) preparado con alginato al 2%. Se encontró que el NE protegió a

los carotenoides a actividades de agua (a_w) mayores que el AA. La mayor retención de los carotenoides fue observada a actividades de agua correspondientes a la mínima entropía integral (0.35-0.45 para NE y 0.1 para AA). Se concluye que incrementando el número de microporos en la matriz sólida de materiales de pared es posible mejorar la preservación de nutrientes y sustancias funcionales durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos.

Peredo-Lovillo *et al.* (2016) encapsularon *Lactobacillus plantarum* por el método de coacervación compleja mediante aspersion. El estudio demostró que el método de coacervación mediante aspersion es un método apropiado para generar cápsulas con *Lactobacillus plantarum*, conservando su viabilidad durante la encapsulación, condiciones gastrointestinales y almacenamiento.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los *Lactobacillus* son considerados probióticos por sus potenciales atributos terapéuticos y profilácticos. Se han reportado efectos benéficos a la salud al ser consumidos en cantidades adecuadas a través de la dieta, como la reducción del colesterol, prevención de la diarrea, la mejora de síntomas de intolerancia de la lactosa, efectos anticancerígenos y efectos inmunomoduladores, entre otros (Giraffa, 2010; Pagnini *et al.*, 2010). El principal problema que presentan los probióticos es su baja supervivencia frente a condiciones adversas. Por esta razón, es necesario protegerlos durante su producción, almacenamiento y después de su ingestión oral (Lisboa *et al.*, 2009).

Uno de los métodos para proteger a los probióticos es la encapsulación, la cual tiene el potencial de incrementar la viabilidad de éstos (Mortazavian *et al.*, 2007). La tecnología de coacervación ofrece numerosas ventajas sobre otras técnicas de encapsulación para proteger a los ingredientes funcionales lábiles y de alto valor, como son las condiciones de preparación no agresivas (ni disolventes orgánicos ni temperaturas drásticas son requeridas), alta eficiencia de encapsulación, y excelentes características de liberación controlada (Jin *et al.*, 2007; Beindorff y Zuidam, 2010; Taneja y Singh, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

Sin embargo, se busca encontrar nuevas alternativas para lograr una máxima protección y viabilidad de los probióticos obteniendo cápsulas tecnológicamente factibles que presenten una mayor estabilidad durante el almacenamiento mediante la modificación del material de pared a nivel de su microestructura.

4 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la modificación de la microestructura de alginato de calcio en la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* mediante coacervación por atomización.

4.2 Objetivos específicos

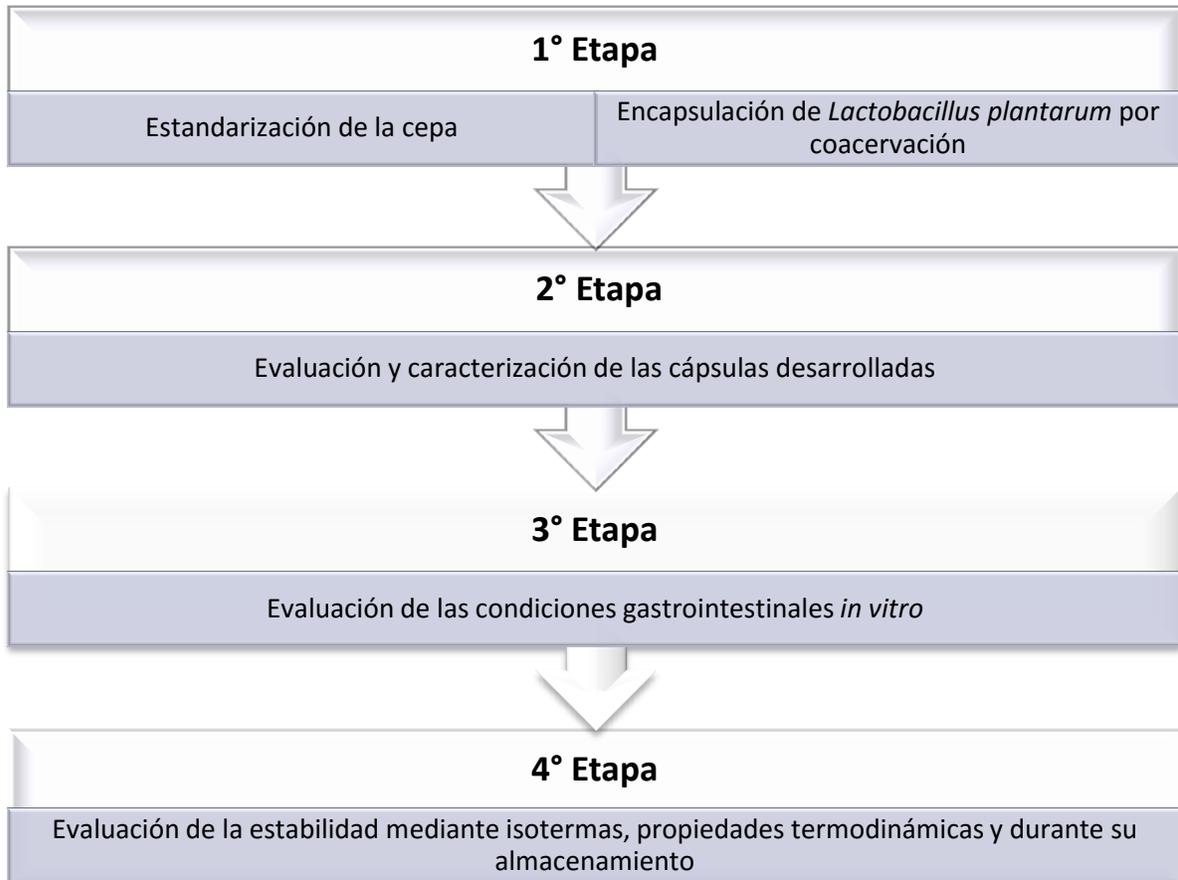
1. Encapsular *Lactobacillus plantarum* por el método de coacervación por goteo y por atomización.
2. Evaluar las propiedades fisicoquímicas y de flujo de las cápsulas desarrolladas.
3. Evaluar *in vitro* (en condiciones gastrointestinales simuladas) el efecto protector del material de pared modificado y no modificado sobre la viabilidad del *Lactobacillus plantarum* encapsulado.
4. Evaluar la estabilidad de las cápsulas desarrolladas mediante isotermas de adsorción, propiedades termodinámicas y durante su almacenamiento.

4.3 Hipótesis

Los materiales con microestructura modificada confieren un mayor efecto protector al *Lactobacillus plantarum* encapsulado que los materiales no modificados.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Aspectos generales



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Maestría en Ciencias Alimentarias del Instituto de Ciencias Básicas perteneciente a la Universidad Veracruzana con dirección Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Ánimas, C.P. 91190 en Xalapa, Veracruz, México.

5.2 Materia prima.

Para la encapsulación se utilizó una cepa de *Lactobacillus plantarum* cápsulas comerciales AB-LIFE®. Como material de pared, se utilizó alginato de sodio proveniente de la Droguería Cosmopolita, Ciudad de México.

5.3 Métodos

5.3.1 Estandarización de la cepa

5.3.1.1 Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum*

Se realizó una cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* donde se identificaron las etapas y velocidad de crecimiento determinando las horas de incubación en las que termina la fase exponencial y comienza la fase estacionaria. Se utilizó una cápsula (125.9 mg aproximado) de cepa liofilizada de *Lactobacillus plantarum* que se homogeneizó en 100 mL de caldo MRS (marca Difco) estéril y se incubó a 37 ± 1 °C en incubadora (marca Binder, USA) por 20 horas. Se prepararon los blancos de caldo MRS. Se analizó cada hora la DO_{560nm} , mediante un espectrofotómetro UV-Visible (marca VELAB, modelo VE-5100UV) y se obtuvo la cinética de crecimiento del microorganismo, se realizó por triplicado.

Obtenida la cinética de crecimiento e identificadas las etapas de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* se incubó el microorganismo en caldo MRS estéril por el tiempo obtenido anteriormente como inicio de la fase estacionaria y se realizó un conteo en placas de agar MRS (marca Difco) incubadas a 37 ± 1 °C para obtener la concentración de *Lactobacillus plantarum* en UFC/mL en el inicio de esta fase.

5.3.1.2 Preparación del inóculo estándar

Se utilizó una cápsula de cepa liofilizada de *Lactobacillus plantarum* suspendida en 100 mL de caldo MRS (marca Difco) estéril y se incubó a 37 ± 1 °C en incubadora (marca Binder, EUA) por el tiempo en que concluye la fase exponencial e inicia la fase estacionaria determinado en la realización de la cinética de crecimiento. Una vez terminado el tiempo de incubación, se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min. a 5 °C; al término se decantó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados de 50 mL con buffer salino de fosfatos (PBS pH 7.0) cada uno y se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min. a 5

°C. Esta biomasa (inóculo estándar) se utilizó para la formación de cápsulas de *Lactobacillus plantarum*.

5.3.2 Elaboración de cápsulas por coacervación cargadas con *L. plantarum*

Se elaboraron 100 g de solución, primero se mezcló 2% de alginato de sodio y 98% de agua destilada estéril a 3000 rpm por 3 minutos. Después se agregó a la solución el inóculo estándar y se agitó a 1000 rpm durante 15 minutos en una placa de agitación (marca Cole Parmer, modelo 4810, Illinois) (Krasaekoopt, 2004; Sabikhi *et al.*, 2010; Jayalalitha *et al.*, 2012).

Para la elaboración de las cápsulas se emplearon 2 técnicas, la primera fue por coacervación mediante la técnica de goteo y la segunda fue por coacervación por atomización. Para la primera, la solución previamente preparada se dejó caer sobre 300 mL de solución de cloruro de calcio al 2% mediante una pipeta con punta de 500 µm desde una altura de 12 cm; dejando reticular las cápsulas por 30 minutos. Para la segunda, la solución fue inyectada usando una bomba peristáltica (marca Thermo Scientific, serie 72310000), con una potencia de 1-2 rpm, a través de una manguera (marca Watson-Marlow, Tipos Punsil), con un diámetro de 3.2 mm que está unida a una boquilla de dos fluidos de acero inoxidable de la serie 1/8JJ, a una altura de 12 cm sobre una superficie de una solución de cloruro de calcio al 2%, dejando reticular las cápsulas por 30 minutos (Viveros- Contreras *et al.*, 2013).

Después de la reticulación, las gotas de ambas técnicas fueron recolectadas, filtradas y lavadas con agua destilada estéril y secadas mediante liofilización por 48 horas, usando un equipo Labconco (Lyph Look 4.5, USA) (Viveros-Contreras *et al.*, 2013).

5.3.3 Evaluación y caracterización de las cápsulas con *L. plantarum* desarrolladas

5.3.3.1 Viscosidad de la solución a encapsular

Se midió la viscosidad de la solución utilizando un viscosímetro analógico (marca Brookfield, modelo RVT, EUA). Se colocaron 3 mL de la solución y se midió con la aguja 14 a 50 rpm durante 30 s (Brookfield, 1995).

5.3.3.2 Actividad de agua

Se determinó empleando un equipo incorporado con un sensor de punto de rocío (marca Aqua Lab, modelo Series 3, EUA) a 25 °C, colocando 1 g de muestra para la medición.

5.3.3.3 Humedad

Se determinó por el método de la A.O.A.C (2003), colocando 1 g de las cápsulas en charolas a peso constante, previamente taradas, en una estufa de vacío (marca Shel Lab, EUA.) durante 24 horas a 45 °C a una presión de 52 mm de Hg hasta peso constante.

5.3.3.4 Color

El análisis de color de las cápsulas se determinó con un colorímetro (ColorFlex Hunter Lab, modelo CX115 45/0. EUA) evaluando los siguientes parámetros:

- L* (Luminosidad o brillantez): 0 (oscuro) a 100 (claro)
- a*: -60 (verde) a +60 (rojo)
- b*: -60 (azul) a +60 (amarillo)

Se calculó Hue° que es el ángulo matiz (0°=rojo, 90°=amarillo, 180°=verde, 270°=azul) y Croma que es la saturación (0=tenué, 60=intenso) mediante las siguientes ecuaciones (Peña *et al.*, 2006):

$$\text{Ángulo matiz (°H)} = \arctan\left(\frac{b}{a}\right) \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{Cromaticidad (Croma)} = \sqrt{a^2 + b^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

5.3.3.5 Higroscopicidad

La higroscopicidad de las cápsulas fue determinada de acuerdo al procedimiento descrito por Fritzen-Freire *et al.* (2012), colocándose 1 g de cápsulas en un desecador equilibrado a 75% de humedad relativa conteniendo una solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) a temperatura ambiente. Las muestras se mantuvieron durante siete días en el desecador. Al finalizar este tiempo se calculó la humedad de las muestras.

5.3.3.6 Tiempo de disolución

La capacidad de disolución de las cápsulas fue calculada de acuerdo al método de Fritzen-Freire *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Se adicionó 1 g de cápsulas en 50 mL de citrato de sodio al 2% y fue dispersado mediante agitación magnética a 900 rpm. Se tomó el tiempo requerido para lograr una completa disolución de las cápsulas.

5.3.3.7 Viabilidad de *L. plantarum* en las cápsulas

La viabilidad celular fue determinada mediante el método estándar de cuenta en placa en agar MRS (marca Difco). Se tomó 1 g de las cápsulas recién elaboradas y se adicionaron 9 mL de citrato de sodio al 2%, seguido de una agitación por 30 min, para

la desintegración de las partículas. Una vez desintegradas, se tomó una alícuota de 1 mL que se transfirió a un tubo con 9 mL de PBS_{pH7.0}. Se hizo una serie de diluciones decimales hasta 10⁻⁹. De las diluciones 10⁻⁵ a 10⁻⁹ se tomó 1 mL y se inocularon en placas con agar MRS por duplicado; fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Se contaron las cajas calculando el promedio y los resultados se informaron como UFC/g de *L. plantarum* (Krasaekoopt, 2004).

5.3.3.8 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación es una medida combinada de la eficiencia del atrapamiento y la supervivencia de las células durante la encapsulación. Se calculó mediante la siguiente ecuación (Annan *et al.*, 2008):

$$EE = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde EE es la eficiencia de encapsulación expresada en porcentaje, N es el número de células liberadas de las cápsulas (log₁₀ UFC/g) y N₀ es el número de células libres (log₁₀ UFC/mL) adicionadas a la suspensión durante el proceso de encapsulación.

5.3.3.9 Micrografías en Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)

Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de barrido (JSM-5600LV, Jeol, Japón) a 25 kV; las cápsulas fueron montadas en un porta muestras y recubiertas con oro 60% y 40% de paladio y se observaron a diferentes aumentos para evaluar su microestructura. Por medio de análisis de imagen se determinaron los parámetros morfométricos (Área, Perímetro, Diámetro de Feret y Circularidad) de las cápsulas en el software Image J 1.50i, convirtiendo las imágenes a código binario.

5.3.4 Evaluación de las propiedades de flujo

5.3.4.1 Densidad aparente

La densidad a granel es la masa del polvo dividida entre el volumen aparente. Se pesó 0.5 g de muestra y se agregó a una probeta, se tomó nota del volumen que ocupó el polvo (Shah *et al.*, 1997). La densidad se calculó con la siguiente ecuación:

$$DA = \frac{M}{V} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde DA es la densidad aparente, M es el peso de la muestra en gramos y V es el volumen de la muestra en mL.

5.3.4.2 Densidad compactada

La densidad compactada es el volumen que ocupa la muestra después de compactarse. El volumen se midió después de golpear continuamente 50 veces el polvo, se tomó nota del volumen compactado (Shah *et al.*, 1997). Se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Dc = \frac{M}{Vc} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde M es el peso de la muestra en gramos y Vc es el volumen de la muestra compactada en mL.

5.3.4.3 Compresibilidad

La compresibilidad es la capacidad de compresión de la muestra en porcentaje y se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\%C = \left(\frac{DC - DA}{DC} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde, %C es la compresibilidad, DA es la densidad a granel y DC es la densidad compactada.

5.3.4.4 Índice de Hausner

El índice de Hausner es una medida de las propiedades de flujo de los polvos. Un índice de Hausner <1.3 indica un polvo con libre flujo, mientras que uno >1.3 indica una capacidad de flujo pobre (Hayes, 1987). El índice de Hausner se calculó con la siguiente ecuación:

$$IH = \frac{DC}{DA} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde, IH es el índice de Hausner, DC es la densidad compactada y DA es la densidad a granel.

5.3.4.5 Ángulo de reposo

El ángulo de reposo se determinó mediante el método de embudo. La muestra previamente pesada se colocó en un embudo, se ajustó la altura de éste a 20 cm. Se dejó caer la muestra libremente, se midió el diámetro y la altura del cono formado y calculó el ángulo de reposo mediante la siguiente ecuación (Cooper y Gunn, 1986):

$$\Theta = \tan^{-1} \left(\frac{h}{r} \right) \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde h es la altura del cono y r el radio del cono.

5.3.5 Evaluación de las cápsulas en condiciones gastrointestinales *in vitro*

Para la evaluación de *L. plantarum* libre y encapsulado se siguió la metodología reportada por Fareez *et al.* (2015).

Se preparó jugo gástrico simulado (JGS) suspendiendo pepsina en una solución de cloruro de sodio estéril (NaCl) (0.5% p/v) para una concentración final de 3 g/L. El pH fue ajustado a 1.8 con 1 mol/L de ácido clorhídrico (HCl) y filtrado con un filtro miliporo de 0.22 μm . El jugo intestinal simulado (JIS) se preparó dispersando 0.5% (p/v) de sales biliares en PBS estéril ajustado a pH 6.8. La suspensión fue filtrada de la misma manera.

La viabilidad de *L. plantarum* libre y encapsulado fue determinada incubando 1 g de las células libres o cápsulas en 10 mL de JGS a 37 °C con agitación constante de 50 rpm por 0, 60 y 120 min, respectivamente. Las cápsulas y células libres fueron filtradas y lavadas con agua estéril y las cápsulas fueron inmersas en 9 mL de solución de citrato de sodio al 2% para su desintegración. Se realizaron conteos en placa con agar MRS a los 0, 60 y 120 min. Después de los 120 min de incubación en el JGS, las células libres y las cápsulas fueron recuperadas de éste por centrifugación a 1800 rpm por 10 min y filtradas y lavadas con agua estéril. Posteriormente 1 g de éstas fueron incubadas en 10 mL de JIS con agitación constante de 150 rpm por 60 y 120 min. Se realizaron conteos en placa con agar MRS detallada anteriormente a estos tiempos.

5.3.6 Evaluación de la estabilidad

5.3.6.1 Isotermas de adsorción de vapor de agua

Se colocaron las muestras en un desecador al vacío con pentóxido de fósforo (P_2O_5) durante 10 días. Para la elaboración de las isotermas de adsorción se utilizó el método gravimétrico propuesto por Lang *et al.* (1981). 1 g de muestra seca fue pesada en charolas de aluminio y se colocaron dentro de celdas de equilibrio con soluciones

saturadas de sal (Figura 3) para obtener diferentes actividades de agua (Cuadro 6). Las muestras fueron colocadas por triplicado a las temperaturas de 15, 25 y 35 °C en las celdas equilibradas a diferentes actividades de agua en estufas (marca Binder, Lab-Line y Atto, respectivamente) hasta llegar al equilibrio; considerando el equilibrio cuando la diferencia de peso entre dos mediciones sea ≤ 1 mg/g de sólidos.

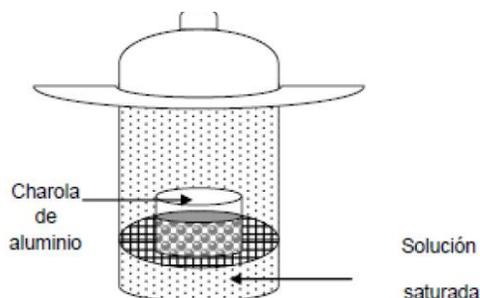


Figura 3. Celdas de equilibrio para la construcción de isotermas de adsorción.

El porcentaje de humedad se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso seco}} \times 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

Cuadro 6. Actividad de agua (a_w) de sales a diferentes temperaturas.

Sal	Nombre	a_w		
		15°C	25°C	35°C
P ₂ O ₅	Pentóxido de fósforo	0.000	0.000	0.000
LiCl	Cloruro de litio	0.121	0.115	0.108
KC ₂ H ₃ O ₂	Acetato de potasio	0.262	0.234	0.215
MgCl ₂	Cloruro de magnesio	0.340	0.329	0.318
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio	0.450	0.443	0.436
Mg(NO ₃) ₂	Nitrato de magnesio	0.602	0.536	0.515
NaNO ₂	Nitrito de sodio	0.693	0.654	0.628
NaCl	Cloruro de sodio	0.782	0.765	0.743
KCl	Cloruro de potasio	0.892	0.846	0.821
BaCl ₂	Cloruro de bario	0.910	0.903	0.895

Labuza *et al.* (1985)

5.3.6.2 Modelamiento de isotermas de adsorción

Para modelar las isotermas de adsorción de las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización se utilizó la ecuación de Guggenheim-Anderson-De Boer (GAB) mediante un ajuste de regresión no lineal.

Modelo de GAB (Van den Berg, 1984):

$$M = \frac{M_o C K a_w}{(1 - K a_w)(1 - K a_w + C K a_w)} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde, M es el contenido de humedad en equilibrio (g H₂O/100 g sólido seco); a_w es la actividad de agua; M_o es el contenido de humedad teórico de la monocapa (g

H₂O/100 g sólido seco); C y K son constantes energéticas relacionadas con la temperatura. Las constantes C y K se determinaron mediante las Ecuaciones 11 y 12, respectivamente.

$$C = c \exp[(h_m - h_n)/RT] \quad \text{Ecuación 11}$$

$$K = k \exp[(h_l - h_n)/RT] \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde, c y k son factores de acomodación entrópicos; h_m, h_l y h_n son las entalpías de sorción de la monocapa, multicapa y agua libre, respectivamente; R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta (Azuara y Beristain, 2006).

Las isothermas de sorción fueron modeladas en el programa KaleidaGraph™, versión 4.0 de Sinergy software.

5.3.6.3 Cálculo de las propiedades termodinámicas

Los cálculos de las propiedades termodinámicas se realizaron mediante las isothermas de adsorción ajustadas a la ecuación de GAB descrita anteriormente. El análisis termodinámico se realizó de acuerdo a la metodología reportada en la literatura (Beristain y Azuara, 1990; Azuara y Beristain, 2006; Domínguez *et al.*, 2007).

5.3.6.3.1 Propiedades integrales

La entalpía molar integral es calculada manteniendo la presión de difusión o potencial de superficie (ϕ) constante, como se indica en la Ecuación 13:

$$(\Delta H_{int})_T = \left[\frac{H_V(T)}{H^{\circ}_V(T)} - 1 \right]_{\phi} H^{\circ}_V(T) \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde, $H_V(T)$ es el calor molar integral del agua adsorbida en el alimento y ϕ puede ser encontrada por Nunes y Rotstein (1991) en la Ecuación 14:

$$\phi = \mu_{ap} - \mu_a = RT \frac{W_{ap}}{W_v} \int_0^{a_w} M d \ln a_w \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde, ϕ es la presión de difusión o potencial de superficie del alimento; μ_a es el potencial químico del adsorbente participando en la fase condensada; μ_{ap} es el potencial químico del adsorbente puro; W_{ap} es el peso molecular del adsorbente y W_v es el peso molecular del agua.

El calor de condensación del agua pura $H^\circ_v(T)$ puede ser calculado como propuso Wexler (1976) en la Ecuación 15:

$$H^\circ(T) \text{ Jmol}^{-1} \text{ K}^{-1} = 6.15 \times 10^4 - 94.14T + 17.74 \times 10^{-2} T^2 - 2.03 \times 10^{-4} T^3 \quad \text{Ecuación 15}$$

Cuando se conocen los valores para $(\Delta H_{int})_T$, los cambios en la entropía molar integral $(\Delta S_{int})_T$ pueden ser calculados con la Ecuación 16:

$$(\Delta S_{int})_T = S_s - S_L = \frac{-(\Delta H_{int})_T}{T} - RT \ln a_w \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde, S_s es S/n que corresponde a la entropía integral del agua adsorbida en el alimento; S es la entropía total de las moléculas de agua adsorbidas y S_L es la entropía molar del agua líquida pura en equilibrio con el vapor.

5.3.6.4 Volumen de microporos

El modelo de Dubinin-Radushkevich sigue siendo el más ampliamente utilizado para estudiar el llenado de poros en la región de los microporos (Sonwane y Bathia, 2000). El contenido de humedad correspondiente al volumen de microporos (n_0) fue

obtenido usando la ecuación de Dubinin-Radushkevich descrita en la Ecuación 17 (Fletcher y Thomas, 2000):

$$\log n = \log n_0 - B \log^2 \left(\frac{P^{\circ}v}{P_v} \right) \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde, n es la cantidad de humedad adsorbida; n_0 es la cantidad de humedad adsorbida correspondiente al volumen de microporos, B es la constante relacionada con la estructura microporosa del adsorbente y $\left(\frac{P^{\circ}v}{P_v} \right)$ es el inverso de la actividad de agua.

5.3.6.5 Almacenamiento

Las cápsulas fueron almacenadas a las a_w correspondientes a la mínima entropía integral y a una a_w intermedia para ambas a 25 °C en una estufa (marca Lab-Line) y el análisis de viabilidad durante el almacenamiento se evaluó mediante la técnica de conteo en placa en Agar MRS (marca Difco) detallada anteriormente a los 15, 30 y 60 días.

5.3.7 Análisis estadístico

Para poder comparar las diferencias entre las cápsulas obtenidas por goteo y las obtenidas por atomización se realizó un análisis estadístico mediante un ensayo test-t. Para la sección de análisis de imagen los datos fueron transformados a logaritmo para cumplir con los criterios de normalidad y homogeneidad de varianza. Para la evaluación de digestión *in vitro* y la supervivencia de *L. plantarum* durante el almacenamiento se utilizó un análisis de Anova de una vía usando el método para comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Estandarización de la cepa

6.1.1 Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum*

En la Figura 4 se observan las etapas de crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, identificando que el inicio de la fase estacionaria se localiza aproximadamente a las 16 horas de incubación, marcando este tiempo el fin de la fase exponencial, con una DO_{560nm} promedio ($n=3$) de 2.16, siendo éste, el tiempo al cual se incubó *Lactobacillus plantarum* para preparar los inóculos a encapsular.

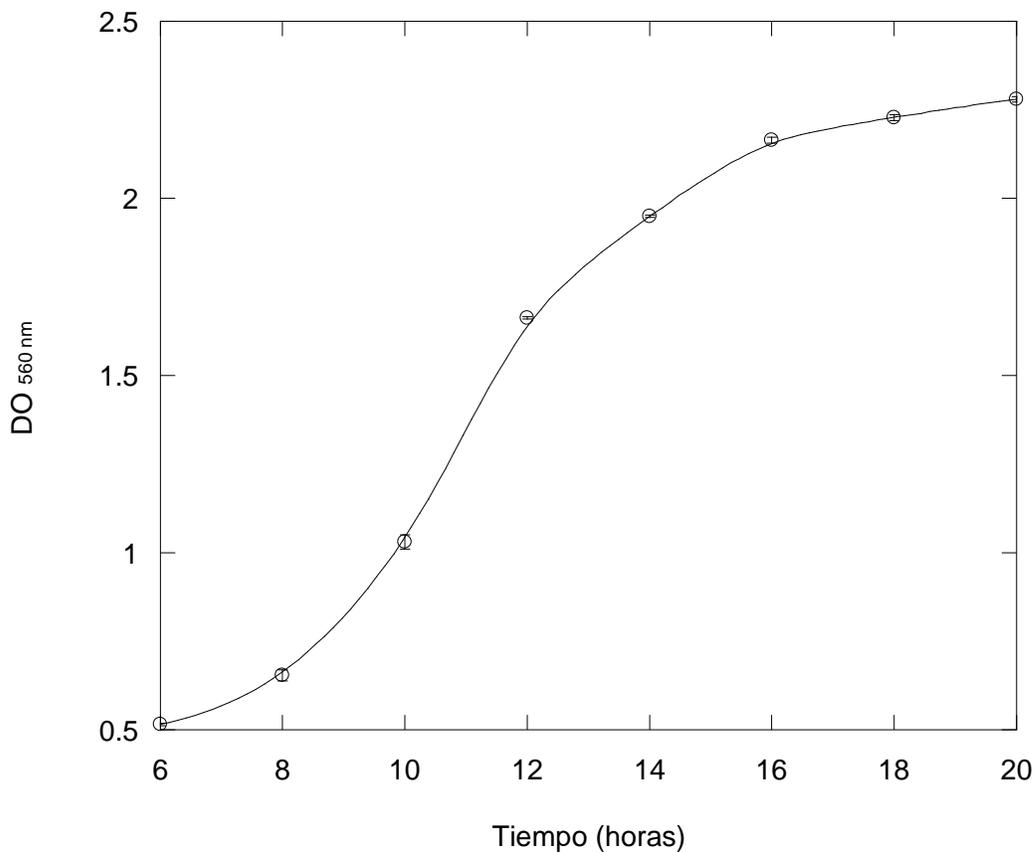


Figura 4. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* en caldo MRS.

Peredo (2014) realizó una cinética de crecimiento de *L. plantarum* encontrando el inicio de la fase estacionaria a las 16 horas de incubación, siendo este tiempo similar al encontrado en este trabajo. Se realizó el conteo en placa en Agar MRS del microorganismo incubado por 16 horas con una $DO_{560 \text{ nm}}$ de 2.16 para conocer la población inicial en UFC/mL al inicio de la fase estacionaria (Cuadro 7).

Cuadro 7. UFC/mL al inicio de la fase estacionaria.

$DO_{560 \text{ nm}}$	UFC/mL
2.16	2.24×10^{10}

Guevara (2009) indica que la mejor etapa de recuperación del microorganismo para su encapsulación es la estacionaria, por ser la fase de crecimiento donde se encuentra la mayor población bacteriana. Por esta razón, se realizó la curva de crecimiento, a fin de identificar el tiempo al cual *L. plantarum* se encontraba en el inicio de la fase estacionaria. Para efectos de este trabajo, identificando este punto a las 16 horas de incubación aproximadamente donde tenemos una $DO_{560 \text{ nm}}$ de 2.16 ± 0.015 con una población de 2.24×10^{10} UFC/mL.

6.2 Elaboración de cápsulas por coacervación cargadas con *L. plantarum*

Se preparó el inóculo estándar de *Lactobacillus plantarum* a una $DO_{560 \text{ nm}}$ aproximada de 2.16 ± 0.015 de acuerdo a la sección de preparación del inóculo estándar y fue adicionado a la solución de alginato de sodio al 2%, la cual presentó una viscosidad de 1250 mPa·s.

Se obtuvieron cápsulas con *L. plantarum* por el método de coacervación mediante las técnicas de goteo y atomización, secadas ambas por liofilización durante 48 horas. En la Figura 5 se muestran las imágenes de las cápsulas obtenidas por ambos métodos. Como se observa, las partículas obtenidas por el método de goteo son de

mayor tamaño y presentan diferencias en su forma y coloración. Las partículas obtenidas por atomización son más pequeñas, homogéneas y tienen apariencia y comportamiento de polvos.



5a

5b

Figura 5. Cápsulas desarrolladas. 5a, Cápsulas obtenidas por goteo; 5b, Cápsulas obtenidas por atomización.

6.3 Evaluación y caracterización de las cápsulas con *L. plantarum*

6.3.1 Determinación de Actividad de agua, Humedad, Higroscopicidad y Tiempo de disolución.

Una vez obtenidas las cápsulas con *L. plantarum* por medio de coacervación, se analizaron por triplicado actividad de agua, porcentaje de humedad, higroscopicidad y el tiempo de disolución de las cápsulas de ambos métodos. Los resultados de estos parámetros fisicoquímicos se expresan en el Cuadro 8.

La actividad de agua y el contenido de humedad son factores muy importantes relacionados con la estabilidad de un alimento. La actividad de agua es un parámetro

que se ha relacionado con los cambios deteriorativos de los alimentos, encontrándose que mientras más alto sea su valor y se encuentre más cercana a 1, mayor será su inestabilidad. Tonon *et al.* (2009) indican que valores bajos favorecen la estabilidad de las cápsulas al presentar menos agua disponible y así prolongar su vida útil. En el Cuadro 8 se observa que ambos métodos presentaron valores muy bajos de actividad de agua, aunque con diferencia significativa ($P \leq 0.001$) entre éstos, siendo de 0.063 ± 0.001 para las cápsulas por goteo y 0.049 ± 0.002 para las atomizadas, al igual que valores bajos en el contenido de humedad, pero sin diferencia significativa ($P = 0.130$), siendo de 2.43 ± 0.07 para las primeras y 2.31 ± 0.07 para las segundas. Estos valores bajos se presentan debido a que proceso de liofilización da como resultado productos con muy bajas actividades de agua y bajos contenidos de humedad, por lo que se considera un excelente método de conservación de productos alimenticios (Kokida y Maroulis, 2000).

Los valores de higroscopicidad de ambas cápsulas presentan diferencia significativa ($P \leq 0.001$) siendo mayor en las cápsulas atomizadas debido al aumento en la porosidad del alginato, siendo ésta de 39.83 ± 0.41 g de agua/100 g de ss., mientras que la de goteo es de 27.06 ± 0.20 g de agua/100g de ss. Este término describe cuán fácilmente un material puede absorber humedad cuando se somete a un cambio dado en la humedad relativa. Un material altamente higroscópico va a mostrar una absorción de agua mucho mayor que materiales con baja higroscopicidad (Figura y Teixeira, 2007). En este trabajo se puede observar que un mismo material de igual manera puede presentar cambios en su higroscopicidad debido a cambios en su microestructura.

El tiempo de disolución es el tiempo en el que las cápsulas son desintegradas por completo. Las cápsulas presentan diferencia significativa ($P \leq 0.001$) entre ambos métodos, siendo que las de goteo presentan un mayor tiempo de disolución que fue de 148 ± 9 min debido a su mayor tamaño, en comparación con las de goteo cuyo tiempo fue de 14 ± 1 min.

Cuadro 8. Propiedades fisicoquímicas iniciales de las cápsulas obtenidas mediante goteo y atomización.

Parámetro	Goteo	Atomización
a_w	0.063 ± 0.001^b	0.049 ± 0.002^a
Humedad (% b.h.)	2.43 ± 0.07^a	2.31 ± 0.07^a
Higroscopicidad (g de agua/100 g de ss.)	27.06 ± 0.20^a	39.83 ± 0.41^b
Tiempo de disolución (min)	148 ± 9^b	14 ± 1^a

Los datos incluyen la media \pm D.E. Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas.

6.3.2 Análisis de Color

El color es un atributo de apariencia de los productos; su observación permite en algunos casos detectar ciertas anomalías y defectos (Abdullah *et al.*, 2004). El color depende de la materia prima y el tratamiento para la elaboración de los productos pero también existen diferentes factores que intervienen en el cambio de color como un cambio en la estructura de los alimentos.

Se evaluaron los parámetros L^* , a^* y b^* de acuerdo a lo establecido por la CIE o Comisión Internationale de L'Éclairage (Comisión Internacional de Iluminación) para poder calcular $^\circ$ Hue o Ángulo matiz (tono) y Cromo (saturación) y así ubicar el espacio de color de cada uno de los métodos (Figura 6) (Peredo, 2014).

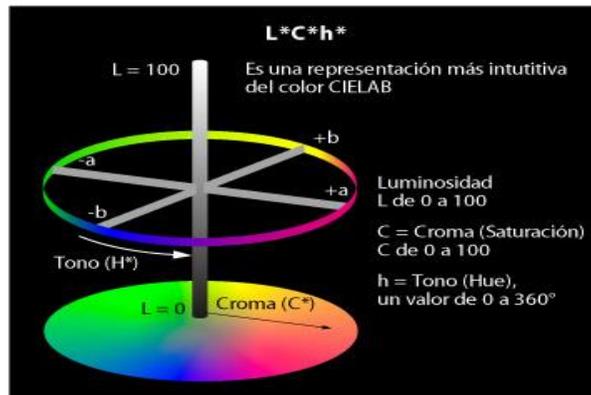


Figura 6. Espacio de color L* (Luminosidad), C* (Saturación) y °H (tono).

En el Cuadro 9 se muestran los parámetros L*, a*, b*, Ángulo matiz y Cromo calculados para ambos métodos. El parámetro L* presentó diferencia significativa ($P \leq 0.001$) entre ambos métodos, siendo de 69.76 ± 0.03 para las cápsulas obtenidas por goteo, mientras que para las obtenidas por atomización fue de 88.87 ± 0.08 , lo cual indica valores en el rango de blanco para ambas, debido a que este parámetro indica luminosidad y va de valores 0 (negro) a 100 (blanco); en el parámetro a* los valores presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.001$), siendo de 0.74 ± 0.07 para las cápsulas obtenidas por goteo y de 0.21 ± 0.05 para las atomizadas, indicando que ambos métodos oscilan en la escala de rojo, debido a que valores negativos indican verde y positivos rojo; en el parámetro b* de igual manera se presentó diferencia significativa ($P \leq 0.001$) entre ambos métodos, siendo que las cápsulas obtenidas por goteo presentaron valores de 13.82 ± 0.18 y las atomizadas valores de 8.35 ± 0.40 , indicando que ambos métodos se encuentran en el rango del amarillo, debido a que valores negativos indican azul y positivos amarillo (Córdoba, 2014).

Los valores de ángulo matiz presentaron diferencia significativa ($P = 0.005$) entre ambos métodos, siendo de 86.95 ± 0.26 para las cápsulas obtenidas por goteo y de 88.52 ± 0.41 para las atomizadas, encontrándose ambas en el rango del amarillo, debido a que para determinar el tono, el ángulo matiz va de 0° (rojo), 90° (amarillo), 180° (verde) y 270° (azul). Los valores de cromos presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.001$), siendo de 13.84 ± 0.18 para las cápsulas obtenidas por goteo y de 8.35 ± 0.36 para las atomizadas, obteniéndose rangos con tendencia a menos saturación,

debido a que croma va de 0 (menos saturación) a 100 (colores saturados o puros). Con las diferencias en los valores calculados anteriormente se puede observar que empleando la misma composición para la elaboración de cápsulas por ambos métodos, hay un cambio significativo en el color de éstas, lo que indica un cambio en su estructura. El color calculado para las cápsulas de ambos métodos se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Análisis de color de las cápsulas obtenidas mediante goteo y atomización.

Parámetro	Goteo	Atomización
L*	69.76 ± 0.03 ^a	88.87 ± 0.08 ^b
a*	0.74 ± 0.07 ^b	0.21 ± 0.05 ^a
b*	13.82 ± 0.18 ^b	8.35 ± 0.40 ^a
Ángulo matiz	86.95 ± 0.26 ^a	88.52 ± 0.41 ^b
Croma	13.84 ± 0.18 ^b	8.35 ± 0.36 ^a
Color observado de las cápsulas		

Los datos incluyen la media ± la D.E. Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas.

6.3.3 Viabilidad

Los inóculos de *Lactobacillus plantarum* para su incorporación a la solución a encapsular fueron ajustados a una población inicial de 2.24×10^{10} UFC/g de muestra y se realizaron los análisis de viabilidad por conteo en placa en agar MRS para obtener la población después del proceso de encapsulación. Se observó que las cápsulas obtenidas por ambos métodos presentaron viabilidades para ser considerados como

productos probióticos (1.00×10^7 UFC/g). Sin embargo, se presentó diferencia significativa ($P \leq 0.001$) en la población después del proceso de encapsulación entre ambos métodos, siendo que las cápsulas obtenidas por atomización presentaron una viabilidad más alta que fue de $2.37 \times 10^9 \pm 4.5 \times 10^8$ UFC/g, mientras que las obtenidas por goteo fue de $3.32 \times 10^8 \pm 5.3 \times 10^7$ UFC/g, lo cual indica que tienen una reducción logarítmica menor del microorganismo con referente a su población inicial (Cuadro 10).

Cuadro 10. Reducción logarítmica de la viabilidad de las cápsulas con *L. plantarum* obtenidas por goteo y atomización.

Método	Población inicial (No) UFC/g	Población después del proceso (N) UFC/g	Reducción logarítmica de la población Log No/N
Goteo	$2.24 \times 10^{10} \pm 8.8 \times 10^{9a}$	$3.32 \times 10^8 \pm 5.3 \times 10^{7a}$	1.83
Atomización	$2.24 \times 10^{10} \pm 8.8 \times 10^{9a}$	$2.37 \times 10^9 \pm 4.5 \times 10^{8b}$	0.98

Los datos incluyen la media \pm la D.E. Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas.

Córdoba (2014) encapsuló *Lactobacillus plantarum* mediante esferificación, obteniendo reducciones logarítmicas entre 2.00 y 3.00 ciclos para sus distintas formulaciones. Por otro lado, Shoji *et al.* (2013), obtuvieron una reducción logarítmica de 0.7 ciclos al *encapsular L. acidophilus* con pectina y caseína por coacervación, secados mediante liofilización y mencionan que el secado mediante liofilización, al no emplear temperaturas altas, afecta en menor medida a los microorganismos que otros procesos. Es por ello que en el presente trabajo ambos métodos presentaron viabilidades altas y bajas reducciones logarítmicas, sin embargo, el proceso de coacervación por atomización presenta una reducción logarítmica de la población

menor, protegiendo así en mayor cantidad a los microorganismos, siendo éste más adecuado para encapsular a *L. plantarum*.

6.3.4 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación es una medida combinada entre la eficiencia de atrapamiento y la supervivencia de las células durante la encapsulación. Las eficiencias de encapsulación obtenidas en el presente trabajo fueron basadas en la concentración inicial de bacterias inoculadas dentro de la formulación para elaborar las cápsulas y la cantidad de éstas que se encontraron en las cápsulas elaboradas (Cuadro 10), calculándose mediante la Ecuación 3. Las eficiencias de encapsulación se presentan en el Cuadro 11.

Las eficiencias de encapsulación obtenidas en el presente trabajo son mayores a las obtenidas por Córdoba (2014) y por Fareez *et al.* (2015) al encapsular ambos una cepa de *L. plantarum*; el primero en gretina-pectina mediante esferificación y el segundo en alginato mediante extrusión, obteniendo eficiencias del 78% en ambos casos. Estas diferencias se deben a que la eficiencia de encapsulación va a depender del material de pared, de la técnica empleada para encapsular y de la formulación de la solución a encapsular, el proceso de coacervación tiene la ventaja de conferir altas eficiencias de encapsulación (Beindorff y Zuidam, 2010).

A pesar de que las eficiencias de ambos métodos fueron altas, la eficiencia de encapsulación presentada por el método de atomización fue de $90.7 \pm 0.7\%$, resultando mayor en comparación con el método de goteo que fue de $82.3 \pm 0.67\%$, con una diferencia significativa ($P \leq 0.001$) entre ambos, indicando un mayor atrapamiento de los microorganismos. Esto se debe a que el método de atomización disminuye el tamaño de las cápsulas (a micras), aumentando así el área superficial de éstas, lo que conlleva a un aumento en la velocidad de reacción, es decir en la gelificación iónica al ponerse en contacto el alginato de sodio con el cloruro de calcio. Gracias a esta rápida gelificación, los iones calcio forman rápidamente la redícula sólida de las cápsulas,

logrando un mayor atrapamiento de las células contenidas en la solución a encapsular, en comparación con la técnica de goteo, la cual produce cápsulas de mayor tamaño, y por consecuencia una velocidad de reacción más lenta.

Cuadro 11. Eficiencia de encapsulación de las cápsulas obtenidas por goteo y atomización.

Método	Eficiencia de Encapsulación (%)
Goteo	82.3 ± 0.67 ^a
Atomización	90.7 ± 0.70 ^b

Los datos incluyen la media ± la D.E. Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas.

6.3.5 Determinación de las Propiedades de flujo

Se determinaron las propiedades de flujo de las cápsulas obtenidas debido a que son parámetros físicos que proporcionan información sobre el comportamiento de los materiales, ya que las características físicas como el tamaño, forma y porosidad afectan las propiedades de flujo. En el Cuadro 12 se muestran las propiedades de flujo de las cápsulas desarrolladas por ambos métodos.

Los valores obtenidos para la densidad aparente presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.001$), siendo de 0.194 ± 0.002 para las cápsulas obtenidas por goteo y de 0.124 ± 0.001 para las atomizadas, esto podría deberse a su mayor contenido de humedad de acuerdo a lo mencionado en diversos estudios que explican que mientras más pesado sea el material o mayor contenido de humedad tenga, su densidad aparente será mayor, ya que un material pesado se acomodará más fácil en espacios entre las partículas, ocupando así menos espacio (Tonon *et al.*, 2010), en cambio una baja densidad aparente indica más aire entre partículas, y la necesidad de un mayor volumen de empaque (Lewis, 1987).

Los valores para la densidad compactada presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.001$), siendo de 0.209 ± 0.001 para las cápsulas obtenidas por goteo y de 0.166 ± 0.002 para las atomizadas, indicando que las segundas son más propensas a sufrir una fractura, debido a que se considera que una mayor diferencia entre la densidad aparente y la densidad compactada indica materiales que tienden a fracturarse.

La compresibilidad indica la capacidad que tienen las sustancias a compactarse, los valores presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.001$), siendo de 6.900 ± 0.809 para las cápsulas obtenidas por goteo y de 24.952 ± 1.220 para las atomizadas, en las que según la clasificación de fluidez de los materiales de acuerdo al porcentaje de compresibilidad sugerida por Aulton (2004), las cápsulas obtenidas por goteo presentan una excelente fluidez y las atomizadas una fluidez regular, debido a que menciona que porcentajes de 5-15% indican excelente fluidez, de 16-19% fluidez buena, 18-26% fluidez regular y 26-33 fluidez pobre.

El índice de Hausner es otra medida de la fluidez de los materiales, los valores presentaron de igual manera diferencia significativa ($P \leq 0.001$), siendo de 1.074 ± 0.009 para las cápsulas obtenidas por goteo y de 1.341 ± 0.011 para las atomizadas, en las que según la clasificación en base al índice de Hausner establecida por Carr (1965), las cápsulas obtenidas por goteo presentan una excelente fluidez, mientras que las obtenidas por atomización presentan una fluidez mala, debido a que valores de 1.0-1.3 indican fluidez de excelente a aceptable y de 1.3- 1.6 fluidez mala.

El ángulo de reposo también nos da una idea de la fluidez de los materiales, en el que las cápsulas obtenidas por atomización presentaron un valor de $35.390 \pm 0.970^\circ$, indicando una fluidez media de acuerdo a la clasificación reportada por Alavi y Causat (2005) donde ángulos de 25° - 30° indican alta fluidez, de 30° - 38° fluidez media y de 38° - 45° fluidez baja, mientras que en las obtenidas por goteo no fue posible la formación del cono, esto debido al tamaño de la partícula y a su alta fluidez, por lo que no se pudo realizar la prueba.

Cuadro 12. Propiedades de flujo de las cápsulas obtenidas por goteo y atomización.

Propiedad	Goteo	Atomización
Densidad aparente (g/cm ³)	0.194 ± 0.002 ^b	0.124 ± 0.001 ^a
Densidad compactada (g/cm ³)	0.209 ± 0.001 ^b	0.166 ± 0.002 ^a
Compresibilidad (%)	6.900 ± 0.809 ^a	24.952 ± 1.220 ^b
Índice de Hausner	1.074 ± 0.009 ^a	1.341 ± 0.011 ^b
Ángulo de reposo (°)	-	35.390 ± 1.69

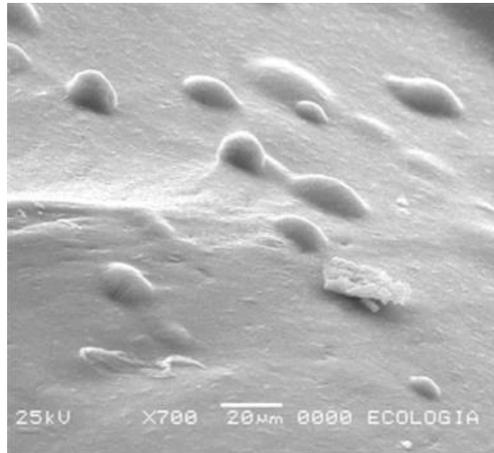
Los datos incluyen la media ± la D.E. Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas.

6.3.6 Micrografías en Microscopio Electrónico de Barrido

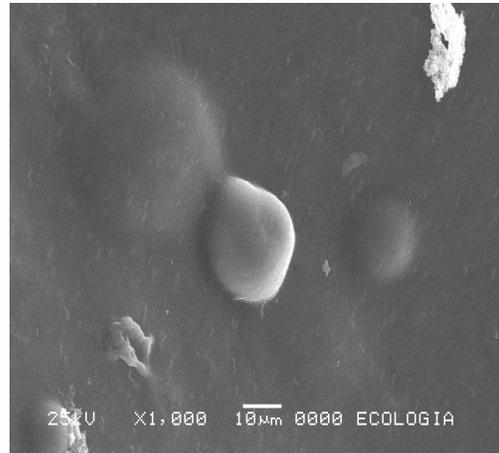
Las cápsulas con *L. plantarum* se observaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM) a 25 kV a diferentes aumentos para evaluar la microestructura de ambas cápsulas de alginato de calcio y observar las diferencias en éstas.

En las Figuras 7 y 8 se muestran las micrografías obtenidas para ambos métodos a 700 y 1000X, en las cuales se puede observar la diferencia en la estructura de ambas cápsulas, siendo que las cápsulas desarrolladas por atomización presentan una textura más rugosa en comparación con las obtenidas por goteo, las cuales presentan una textura más lisa. De igual manera, se observa una superficie más porosa en las cápsulas obtenidas por atomización.

Micrografías reportadas por Viveros-Contreras *et al.* (2013) muestran de igual manera que las cápsulas atomizadas presentan una textura con mayor rugosidad y una superficie más porosa que las cápsulas obtenidas por goteo. El aumento en la porosidad de las cápsulas obtenidas por atomización va a conllevar a un aumento en su capacidad de adsorción de humedad.

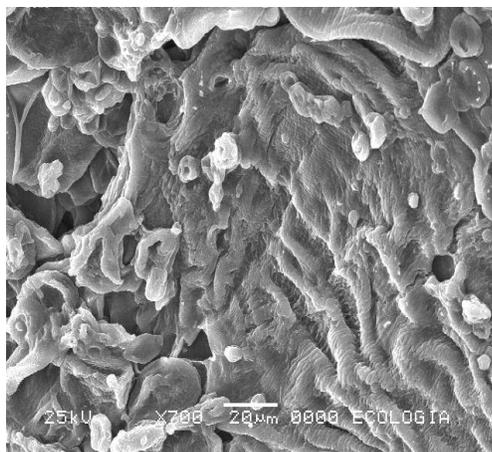


700X



1000X

Figura 7. Microestructura de las cápsulas de alginato de calcio obtenidas por goteo, secadas por liofilización



700X



1000X

Figura 8. Microestructura de las cápsulas de alginato de calcio obtenidas por atomización, secados por liofilización.

6.3.7 Análisis de imagen

Se observó la morfología de las cápsulas con *L. plantarum* obtenidas por atomización y por goteo mediante microscopía electrónica de barrido a diferentes aumentos y por medio de análisis de imagen se determinaron los parámetros

morfométricos de las cápsulas con el software Image J 1.50i, convirtiéndola a código binario. En el Cuadro 13 se muestran los resultados obtenidos mediante análisis de imagen. El tamaño de las cápsulas obtenidas por goteo se encuentra en el rango de mm, a diferencia de las cápsulas atomizadas, cuyo tamaño es de μm . Para poder comparar los parámetros morfométricos de ambos métodos, se muestran los tamaños de ambas cápsulas en mm.

En todos los parámetros analizados se mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre ambas cápsulas, siendo de mucho mayor tamaño las obtenidas por goteo cuyo diámetro máximo fue de 2.970 ± 0.16 mm, en comparación con las de atomización que fue de $0.020 \pm 2.59 \times 10^{-3}$ mm, es decir 20 μm , siendo estas últimas microcápsulas. El parámetro circularidad, indica la forma de la partícula y oscila entre 1 (círculo perfecto) y 0 (forma elongada), las cápsulas obtenidas por goteo presentan un valor de 0.697 ± 0.06 mientras que las cápsulas atomizadas presentan una circularidad mayor de 0.868 ± 0.04 , mostrando así una forma más circular. Sohail *et al.* (2011) obtuvieron microcápsulas con *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* en una matriz de alginato mediante atomización con un tamaño de diámetro promedio de 35 μm , y cápsulas mediante extrusión con un tamaño de 2.0 mm, siendo estos valores similares a los obtenidos en este trabajo.

Cuadro 13. Área, perímetro, diámetro de Feret y circularidad de las cápsulas obtenidas por goteo y atomización.

Cápsulas	Área (mm^2)	Perímetro (mm)	Diámetro de Feret máximo (mm)	Diámetro de Feret mínimo (mm)	Circularidad
Goteo	4.850 ± 0.48^b	9.360 ± 0.52^b	2.970 ± 0.16^b	2.260 ± 0.17^b	0.697 ± 0.06^a
Atomización	$2.40 \times 10^{-4} \pm 3.10 \times 10^{-5a}$	$0.059 \pm 5.12 \times 10^{-3a}$	$0.020 \pm 2.59 \times 10^{-3a}$	$0.015 \pm 7.40 \times 10^{-4a}$	0.868 ± 0.04^b

Los datos incluyen la media \pm la D.E. Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas.

6.3.8 Evaluación de las cápsulas en condiciones gastrointestinales *in vitro*

Para ejercer beneficios a la salud, la concentración de bacterias probióticas debe ser mayor a 1×10^6 UFC/g o mL de muestra aproximadamente (Shah, 2000). Después de la administración de los probióticos, existe una considerable pérdida en su viabilidad al pasar a través del bajo pH del estómago y de las altas concentraciones de sales biliares del intestino (Charteris *et al.*, 1998). Esta pérdida de viabilidad se reduce mediante la encapsulación de las bacterias en una matriz polimérica. Por esta razón, se realizó una simulación de las condiciones del estómago y del intestino delgado, para conocer la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* libre y dentro de las cápsulas antes de llegar al intestino grueso y ser liberado. Los resultados para la digestión gástrica e intestinal *in vitro* se muestran en el Cuadro 14.

Los valores de pH del estómago varían entre 1 y 2.5 y el tiempo de tránsito es muy variable, comúnmente reportado entre 5 minutos y 2 horas (Evans *et al.*, 1988). Además de su acidez, el estómago contiene pepsina, una enzima proteolítica que rompe proteínas. Después de pasar a través del estómago, las cápsulas entran al intestino delgado, en el que el tiempo reportado varía entre 2 y 3 horas, con un pH de entre 6.15 y 7.8. Después de su tránsito por el intestino delgado, las cápsulas llegan al intestino grueso (Hauptmann *et al.*, 1998) donde los probióticos son liberados para ejercer los beneficios a la salud. El microorganismo libre y las cápsulas se incubaron con el jugo gástrico simulado a 37 °C con agitación continua a 50 rpm durante 2 horas. Después de este tiempo, tanto el microorganismo libre como las cápsulas fueron lavadas e incubadas con el jugo intestinal simulado a 37 °C con agitación continua a 150 rpm durante 2 horas. Los tiempos a los que se realizó el conteo en placa fueron 0, 60 y 120 minutos para la fase gástrica y a los 180 y 240 minutos para la fase intestinal.

Brusch y Zachia (2010) encontraron que *L. plantarum* encapsulado con una concentración inicial de 10.52 (log UFC/mL) al ser expuesto a condiciones gastrointestinales *in vitro* redujo su concentración a 7.50 (log UFC/mL), mientras que trabajos realizados por Mandal *et al.* (2006) muestran un descenso en la viabilidad de células libres de *L. casei* de 9.34 a 5.60 (log UFC/mL) cuando son expuestas a sales

biliares. En el presente trabajo se puede observar diferencia significativa ($P \leq 0.001$) entre la supervivencia de las células libres en comparación con las células encapsuladas durante todo el proceso de digestión, siendo la viabilidad de las células libres a las 4 horas de incubación de 4.68 ± 0.07 (log UFC/g), mostrando que la encapsulación en una matriz de alginato aumenta la viabilidad del microorganismo en comparación con el microorganismo libre, el cual presentó una reducción de casi seis ciclos logarítmicos. Sultana *et al.* (2000) muestran que la supervivencia de bacterias encapsuladas es mayor en cápsulas de alginato, por lo que ambas cápsulas obtuvieron valores para producir efectos benéficos a la salud. Sin embargo, se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.001$) entre la supervivencia de las células en las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización, siendo de 6.69 ± 0.16 (log UFC/g) para las primeras y de 7.77 ± 0.07 (log UFC/g) para las segundas, presentando éstas una mayor viabilidad durante todo el proceso digestivo.

Cuadro 14. Evaluación de *L. plantarum* libre y encapsulado en condiciones gastrointestinales *in vitro*.

Tiempo (min)	Células libres	Encapsulación	
		Goteo	Atomización
Inicial			
0	10.31 ± 0.21^{cD}	8.51 ± 0.07^{aD}	9.37 ± 0.08^{bD}
Digestión gástrica			
60	7.00 ± 0.08^{aC}	7.41 ± 0.05^{bC}	8.58 ± 0.11^{cC}
120	5.32 ± 0.03^{aB}	7.18 ± 0.12^{bB}	8.17 ± 0.15^{cB}
Digestión intestinal			
180	4.84 ± 0.11^{aA}	7.00 ± 0.09^{bB}	8.09 ± 0.06^{cB}
240	4.68 ± 0.07^{aA}	6.69 ± 0.16^{bA}	7.77 ± 0.07^{cA}

Los resultados son el logaritmo en base 10 de los conteos de las UFC/g. Los datos incluyen la media \pm la D.E. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre columnas. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre filas.

La Figura 9 muestra las micrografías obtenidas de las cápsulas de ambos métodos a los 0, 60 y 240 minutos en condiciones gastrointestinales *in vitro*. La morfología de las cápsulas durante las condiciones gastrointestinales no presentó un cambio aparente, sin embargo con el conteo en placa a estos mismos tiempos, se puede notar que hubo un decremento en la población de *L. plantarum* durante todo el proceso, siendo éste mayor para las cápsulas obtenidas por goteo.

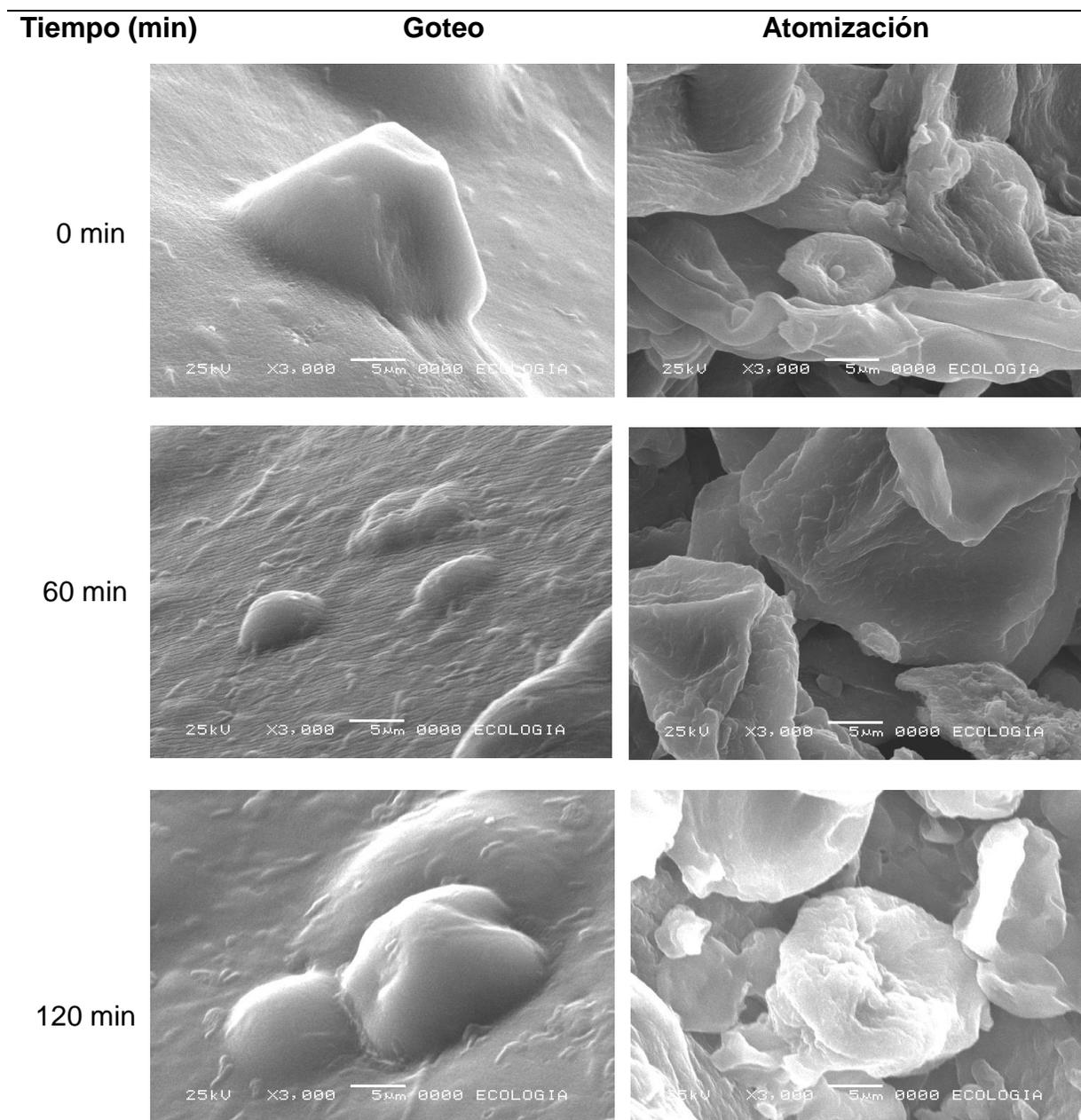


Figura 9. Micrografías de las cápsulas durante condiciones gastrointestinales *in vitro*.

6.4 Evaluación de la estabilidad mediante isothermas de adsorción, propiedades termodinámicas y almacenamiento

6.4.1 Isothermas de adsorción

En la Figura 10 se muestran las isothermas de adsorción de las cápsulas de alginato de calcio obtenidas por goteo y por atomización a 25 °C. Ambas isothermas presentan el comportamiento de las isothermas tipo II de acuerdo a la clasificación de Brunauer *et al.* (1940). Se observa que las cápsulas obtenidas por atomización presentan una mayor capacidad de adsorción de agua en comparación con las de goteo, indicando una modificación en la microestructura del alginato. Este cambio en la capacidad de adsorción se relaciona con lo expresado por Tsami *et al.* (1999) quienes indicaron que las diferencias en la capacidad de adsorción de humedad se explican por el aumento de la porosidad, dando como resultado una mayor capacidad de adsorción.

Las isothermas a 25 °C mostraron un cambio en la microestructura del alginato de calcio, por lo que se realizaron isothermas de adsorción a tres temperaturas para las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización para poder realizar los cálculos termodinámicos y así obtener la mínima entropía integral o punto de máxima estabilidad de las moléculas de agua adsorbidas en las cápsulas para conocer las óptimas condiciones de almacenamiento.

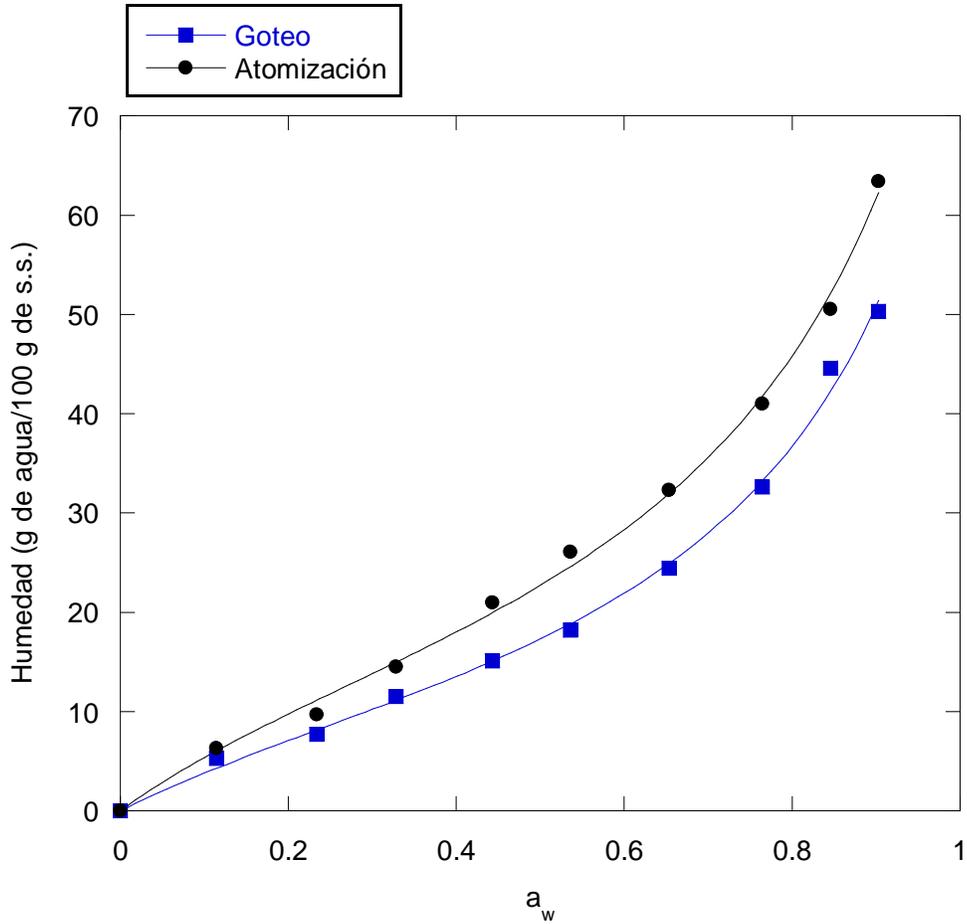


Figura 10. Isoterma de adsorción de humedad a 25 °C de las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización.

6.4.2 Modelamiento de isotermas de adsorción

Los datos experimentales de las isotermas de adsorción de vapor de agua se ajustaron al modelo de GAB, este modelo ha sido utilizado para describir el comportamiento de las isotermas de adsorción de alimentos. Las Figuras 11 y 12 muestran los puntos experimentales (símbolos) y los puntos ajustados (líneas continuas) de adsorción de vapor de agua a 15, 25 y 35 °C en las cápsulas de alginato de calcio obtenidas por atomización y goteo.

En las Figuras 11 y 12 se muestra que al incrementar la temperatura manteniendo el mismo valor de actividad de agua, la humedad adsorbida disminuye, debido a que la adsorción es un proceso exotérmico, en la cual de la energía que debe liberarse, una parte se utiliza en realizar el trabajo necesario para que la molécula se adsorba y el resto de la energía se libera en forma de calor y es la que produce los cambios de entropía en el agua adsorbida (Beristain y Azuara, 1990).

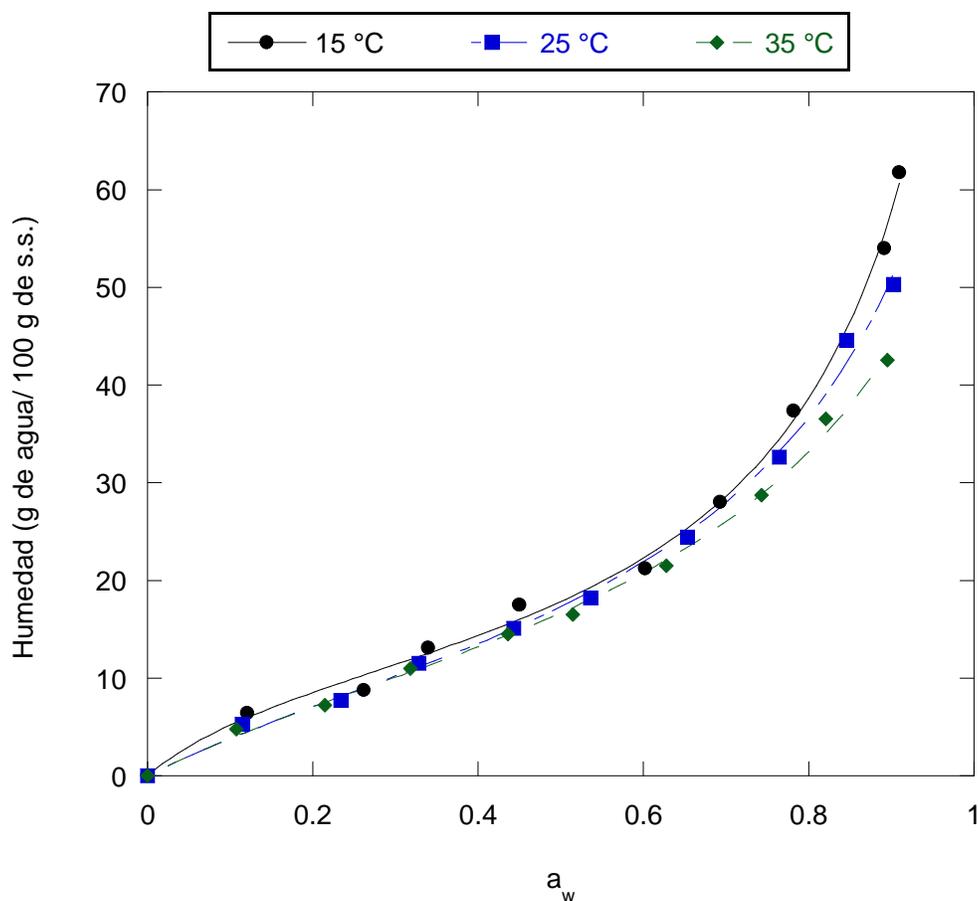


Figura 11. Isotherma de adsorción de humedad a 15, 25 y 35 °C de las cápsulas obtenidas por goteo.

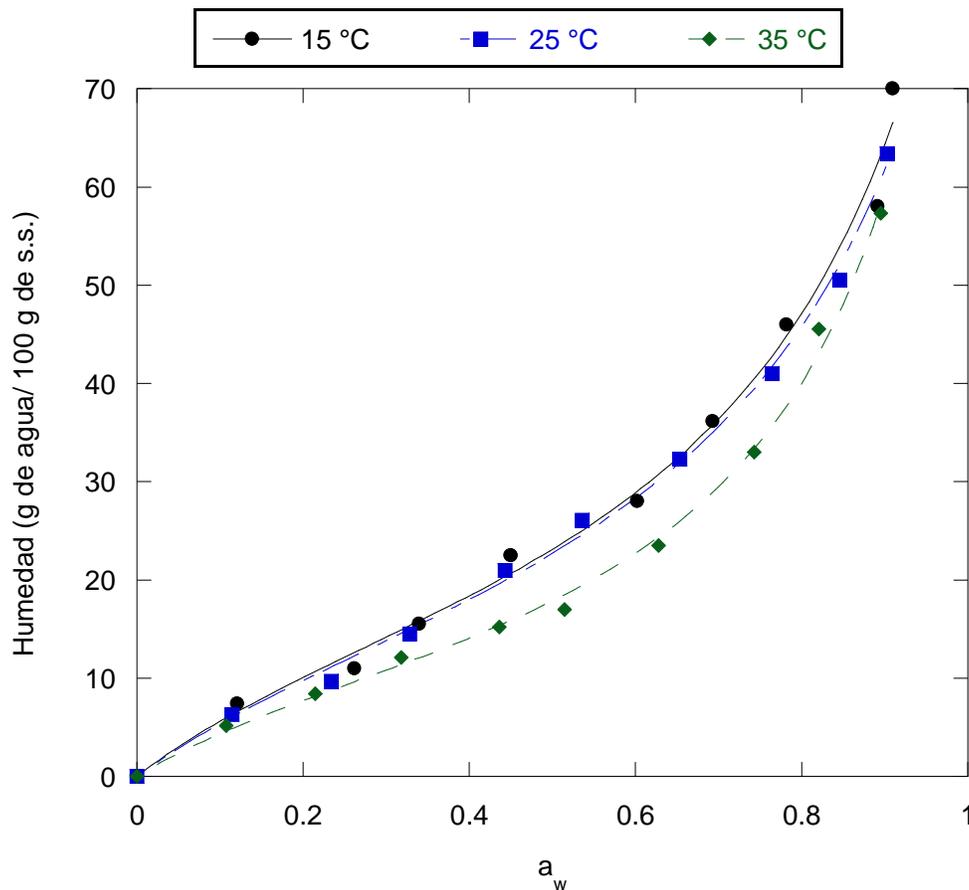


Figura 12. Isotherma de adsorción de humedad a 15, 25 y 35 °C de las cápsulas obtenidas por atomización.

En el Cuadro 15 se muestran los valores de K (constante energética), C (constante energética) y M_0 (monocapa) para las cápsulas obtenidas por atomización y por goteo. La R^2 indica el ajuste de la isoterma con la ecuación de GAB. Entre más pequeña sea la K, se indica que existen menos capas de agua interaccionando con la monocapa. A partir de la constante C es posible clasificar el tipo de fisisorción de acuerdo a Brunauer *et al.* (1940): Una $C > 2$ corresponde a las isotermas tipo I y II, esto significa que las fuerzas de atracción entre el adsorbato y el adsorbente son más grandes que las fuerzas de atracción entre las moléculas de agua. Cuando las fuerzas entre el adsorbato y el adsorbente son pequeñas $C < 2$ corresponden a una isoterma tipo III. Como se menciona anteriormente, las isotermas de ambas cápsulas pueden ser clasificadas como tipo II. Las cápsulas atomizadas tienen la mayor capacidad de adsorción de agua a 15 y 25 °C, lo que se puede observar debido a que el valor de la

monocapa es más alto en este tipo de cápsulas, esto puede deberse a un aumento en la porosidad del alginato de calcio atomizado.

Cuadro 15. Parámetros calculados con el modelo de GAB para las cápsulas obtenidas por goteo y atomización.

	Temperatura (°C)	Mo	C	K	R ²
Goteo	15	11.583	6.9882	0.8955	0.9985
	25	14.036	3.6373	0.8303	0.9982
	35	14.087	3.8902	0.7884	0.9987
Atomización	15	17.93	4.481	0.8235	0.9956
	25	18.237	4.2013	0.8092	0.9986
	35	12.574	4.6936	0.8885	0.9982

Los parámetros calculados mediante la ecuación de GAB son importantes debido a que nos dan una idea del comportamiento de los productos y de su capacidad de adsorción, sin embargo pueden presentar errores y no siempre corresponden con la verdadera estabilidad de los alimentos. Por esta razón, además de estas interpretaciones de uso frecuente, es posible obtener información aplicable en el control de la estabilidad de los alimentos, a partir de las propiedades termodinámicas integrales (Azuara y Beristain, 2007).

6.4.3 Propiedades termodinámicas

Para evaluar las propiedades termodinámicas se utilizaron los ajustes descritos con la ecuación de GAB, pero utilizando esta ecuación sólo como un modelo matemático aceptable; es decir, sin tomar en cuenta la interpretación física de cada uno de los parámetros de la ecuación de GAB. Las propiedades termodinámicas pueden

evaluarse utilizando cualquier modelo matemático que describa correctamente los resultados experimentales obtenidos al determinar las isothermas de sorción a diferentes temperaturas, pues los valores de la entalpía, energía libre de Gibbs y entropía no dependen de la teoría empleada para desarrollar estos modelos matemáticos, sino de las ecuaciones establecidas a partir de la Termodinámica Clásica. Por lo tanto, la veracidad de las propiedades termodinámicas dependerá de la exactitud de las mediciones experimentales de la humedad adsorbida por el alimento cuando se alcanza el equilibrio a una humedad relativa constante; y en consecuencia, de nuestra habilidad para ajustar estos datos experimentales utilizando un modelo matemático. Es importante resaltar que por esta razón, en muchas ocasiones la información que se obtiene interpretando físicamente los parámetros de GAB es diferente y de poca relevancia, comparada con las predicciones que proporciona una disciplina científica como la termodinámica.

Beristain y Azuara (1990) desarrollaron una metodología que permite establecer las mejores condiciones de almacenamiento para diversos materiales de humedad conocida. En el presente trabajo se evaluaron las propiedades termodinámicas integrales a partir de las isothermas de adsorción de las cápsulas.

6.4.3.1 Entalpía Integral (ΔH_{INT})

Las Figuras 13 y 14 muestran la variación de la entalpía integral de las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización con respecto a la a_w . Con la entalpía integral es posible predecir la cantidad de calor que se necesita desprender de los alimentos para poder adsorber una determinada cantidad de agua y la variación de la entalpía indica hasta qué grado la interacción agua-alimento es mayor que la interacción entre las moléculas de agua (Azuara y Beristain, 1990).

Se puede observar que la entalpía integral es mayor en las cápsulas obtenidas por goteo, lo que indica que éstas liberan mayor cantidad de energía al adsorber moléculas en la matriz. Esto puede deberse a que estas cápsulas tienen una mayor interacción energética con el agua a bajas a_w , mientras que en las cápsulas atomizadas

las moléculas de agua se encuentran atrapadas en microporos y por lo tanto no pueden interactuar con la superficie (Bonilla, 2010), además de que la energía se encuentra repartida de forma más homogénea a medida que aumenta la a_w debido a que el llenado de microporos se alcanza a a_w mayores.

Se puede notar que en la curva de entalpía integral para las cápsulas obtenidas por goteo, el punto de máxima entalpía integral se encuentra a a_w bajas, lo que indica que a bajas a_w fueron llenados los sitios más activos, mientras que en la curva para las cápsulas atomizadas, el punto de máxima entalpía integral se encuentra a a_w mayores, indicando que conforme se va incrementando la a_w las moléculas de agua tienen acceso a sitios de mayor energía de interacción. Esta diferencia puede deberse al cambio en su microestructura. Posteriormente se observa una caída gradual de la entalpía integral a mayores contenidos de humedad, debido a que una vez llenos los sitios activos, ocurre una interacción de las moléculas de vapor de agua con los sitios menos favorables y comienza la formación de multicapas (Bonilla, 2010).

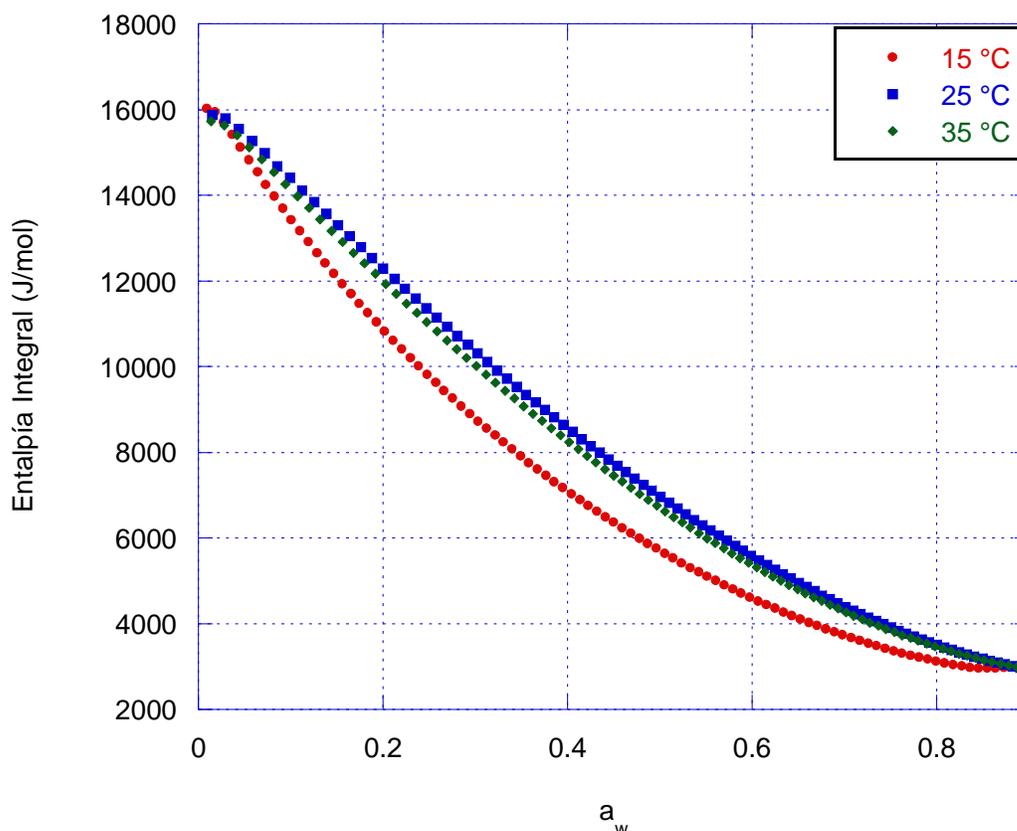


Figura 13. Variación de la entalpía integral con la a_w para cápsulas obtenidas por goteo.

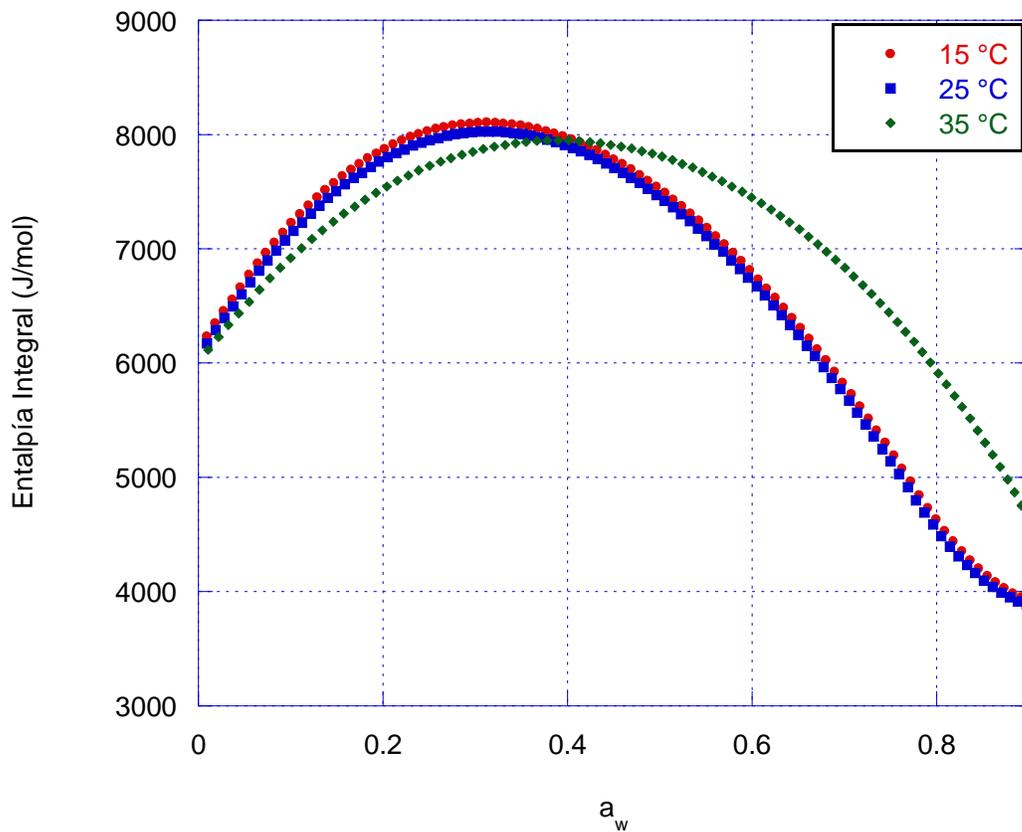


Figura 14. Variación de la entalpía integral con la a_w para cápsulas obtenidas por atomización.

6.4.3.2 Entropía Integral (ΔS_{INT})

En las Figuras 15 y 16 se muestran las variaciones de entropía integral y diferencial de las cápsulas obtenidas por goteo y atomizadas, en función de la humedad de las cápsulas. La entropía diferencial representa la suma algebraica de la entropía integral a un nivel de hidratación, más el cambio en el orden o desorden después de que una molécula de agua es adsorbida en el sistema. En las gráficas se puede apreciar una intersección entre los dos tipos de entropías, punto que indica el valor de la mínima entropía integral, la cual corresponde al mejor acomodo de las moléculas de agua, debido a que la entropía integral indica el grado de orden-desorden de las moléculas de agua adsorbidas en el sistema alimenticio (Beristain *et al.*, 2002).

Se puede observar que en la medida en que las cápsulas adsorben humedad, disminuye la entropía hasta el mínimo. Lo cual se considera como condición de máxima estabilidad, ya que es en donde más ordenadas se encuentran las moléculas de agua con respecto a las cápsulas, lo que está relacionado con la mayor estabilidad física, química y microbiológica del alimento (Beristain y Azuara, 1990).

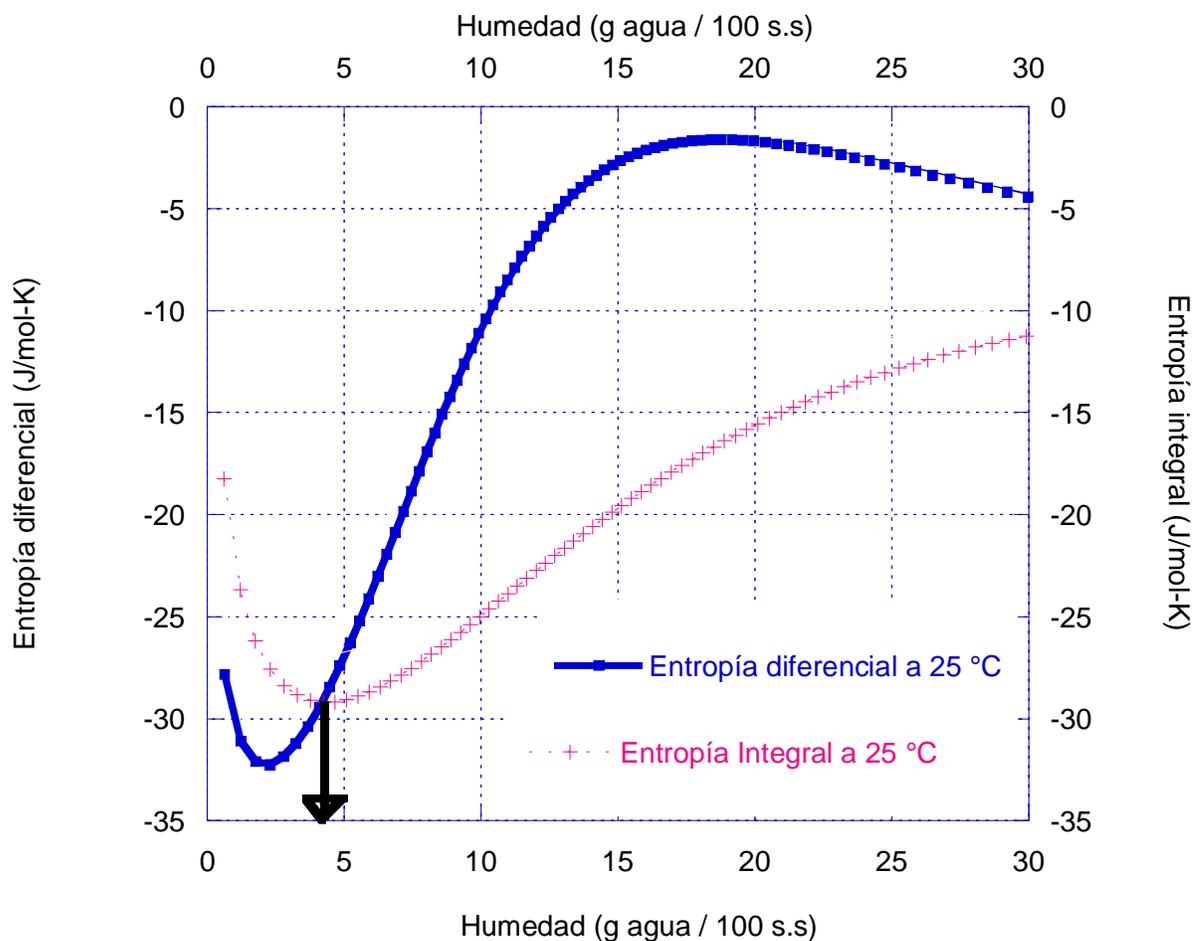


Figura 15. Variación de la entropía diferencial e integral con la humedad a 25 °C para cápsulas obtenidas por goteo.

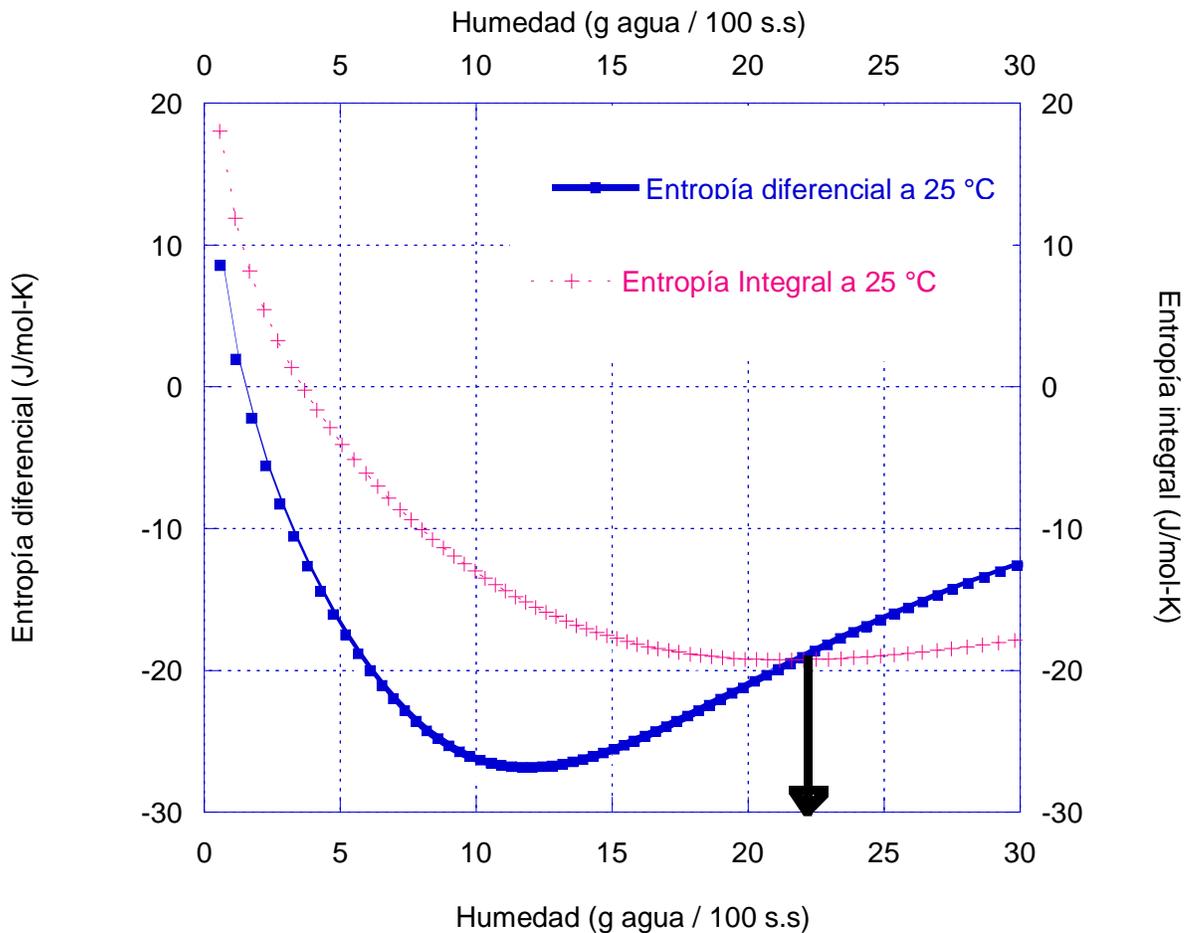


Figura 16. Variación de la entropía diferencial e integral con la humedad a 25 °C para cápsulas obtenidas por atomización.

Para las cápsulas obtenidas por goteo, la mínima entropía integral a 25 °C se presentó en 4.3 g de agua/100 g de s.s. ($\approx 0.12 a_w$) y para las cápsulas atomizadas en 22.5 g de agua/100 g de s.s. ($\approx 0.53 a_w$). Cabe mencionar que aunque el valor de intersección es único, existe una zona de máxima estabilidad en la cual la entropía integral no varía visiblemente con la humedad. Esta zona se considera el punto de máxima estabilidad en el área de alimentos, en el que el agua se encuentra en su máximo orden sobre la superficie del material y existen enlaces fuertes entre el adsorbato y el adsorbente, y en donde las reacciones de deterioro son mínimas (Beristain y Azuara, 1990; Nunes y Rotstein, 1991).

En las Figuras 17 y 18 se muestra la variación de la entropía integral de las cápsulas obtenidas por goteo y atomizadas con respecto a la a_w .

Esta zona de mínima variación es mayor para las cápsulas atomizadas que para las cápsulas por goteo. Se encontró que existe una zona de mayor estabilidad para las tres temperaturas, en donde las cápsulas atomizadas son más estables a a_w más altas que las cápsulas por goteo, encontrando su mínima entropía integral en una zona de a_w de 0.46-0.60 (Figura 18), mientras que en las cápsulas por goteo tienen su mínima entropía integral y mayor estabilidad en una zona de a_w de 0.11-0.14 (Figura 17). Las cápsulas atomizadas van a ser más estables en humedades relativas mayores sin presentar reacciones de deterioro.

Azuara y Beristain (2006) sugirieron que al controlar la microestructura a nivel nanométrico de los alimentos aumentando el número de microporos, podrían conservar productos con altos contenidos de humedad sin que el agua tome parte en las reacciones de deterioro. Por lo que la mínima entropía integral de las cápsulas atomizadas se desplazó a una zona de mayor actividad de agua, debido a la presencia de cavidades en el orden de los microporos.

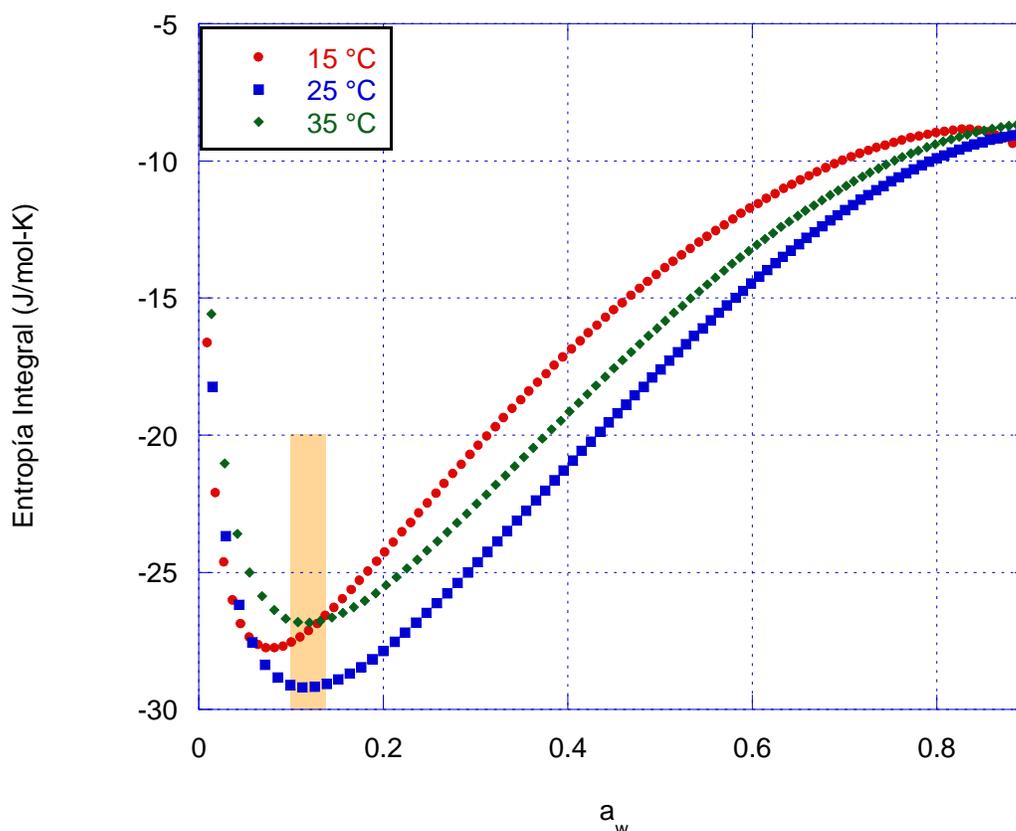


Figura 17. Variación de la entropía integral con la a_w de cápsulas obtenidas por goteo.

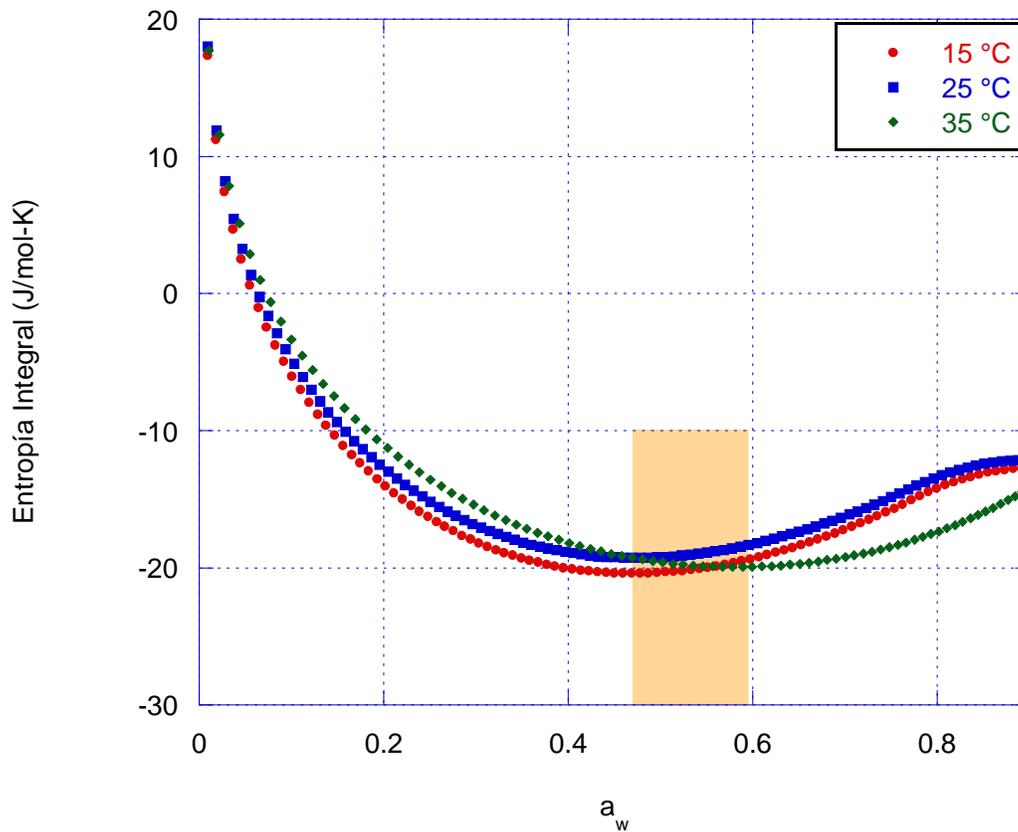


Figura 18. Variación de la entropía integral con la a_w de cápsulas obtenidas por atomización.

Pascual (2010), evaluó la mínima entropía integral en diferentes sistemas alimentarios nanoestructurados, demostrando que la estabilidad física y química está relacionada con la mínima entropía integral o mejor disposición de las moléculas de agua adsorbida en la superficie de los alimentos. Por esta razón, se almacenaron las cápsulas a las a_w correspondientes a la mínima entropía de cada método, para demostrar que la mayor viabilidad de *L. plantarum* está relacionada con la zona de mínima entropía integral.

6.4.4 Volumen de microporos

En la Figura 19 se muestran los ajustes para calcular la humedad correspondiente al volumen de microporos, a partir del modelo de Dubinin – Radushkevich para las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización a 25 °C. Se

muestra linealidad en la región de bajas a_w y se va perdiendo a a_w mayores. Esta pérdida de linealidad en el ajuste indica el llenado del volumen de los microporos disponibles (Fletcher y Thomas, 2000). En la Figura 19 se puede observar que las cápsulas que tienen mayor cantidad de microporos disponibles son las obtenidas por atomización, indicando un cambio en su microestructura y su mayor capacidad de adsorber agua sin que se encuentre libre para reacciones de deterioro.

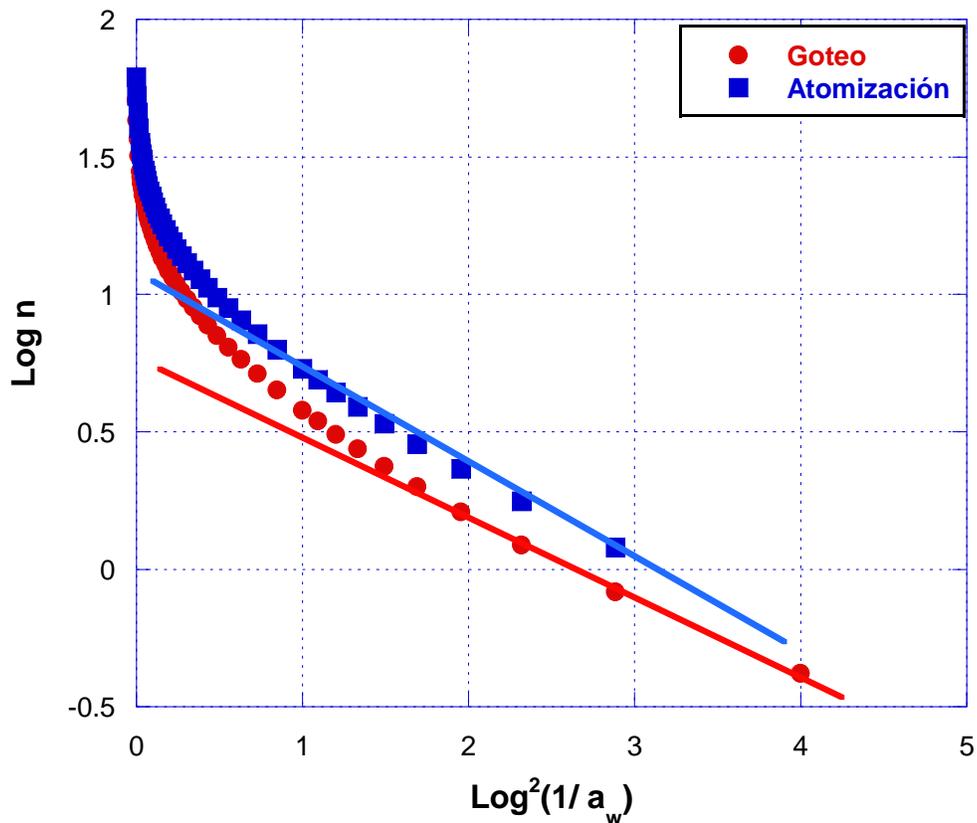


Figura 19. Ajuste del modelo de Dubinin-Radushkevich para calcular el volumen de microporos para las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización a 25 °C.

En el Cuadro 16 se muestran los valores para la constante B, la humedad correspondiente al volumen de microporos y la humedad calculada en la mínima entropía integral para las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización. Los valores del contenido de humedad correspondiente al volumen de microporos y la mínima

entropía integral fueron similares. La humedad correspondiente al volumen de microporos para las cápsulas obtenidas por goteo fue de 5.65 g de agua/100 g de ss., que corresponde a una a_w de 0.16, la cual es similar a la zona de mínima entropía integral que se encontró a a_w de 0.11 a 0.14. La humedad correspondiente al volumen de microporos para las cápsulas obtenidas por atomización fue de 18.56 g de agua/100 g de ss., que corresponde a una a_w de 0.43, valor cercano a la zona de mínima entropía integral que se encontró a a_w de 0.46 a 0.60.

Cuadro 16. Parámetros del modelo de Dubinin – Radushkevich para las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización.

Método	n_0 (g de agua/100 g de ss.)	B	R^2	Humedad en la mínima (ΔS_{int}) _T (g de agua/100 g ss.)
Goteo	5.65 ($a_w = 0.160$)	0.2844	0.998	4.30 ($a_w = 0.110-0.140$)
Atomización	18.56 ($a_w = 0.430$)	0.4657	0.982	22.50 ($a_w = 0.460-0.600$)

Azuara y Beristain (2006) indicaron que la adsorción de gases y vapores en materiales con microporos difiere de la adsorción en materiales con poros grandes, ya que dentro de los microporos las moléculas de agua se adsorben ordenadamente disminuyendo su entropía integral y que ésta es similar a la humedad correspondiente al volumen de microporos, punto en el que el alimento es más estable.

6.4.5 Almacenamiento

Se realizó la evaluación de la viabilidad de *L. plantarum* encapsulado mediante goteo y atomización durante 60 días a 25 °C, a las a_w correspondientes a la mínima entropía integral de cada cápsula y a una a_w distinta a la mínima entropía. Las cápsulas obtenidas por goteo se almacenaron a a_w de 0.115, 0.329 y 0.536, mientras que las obtenidas por atomización a a_w de 0.115, 0.536 y 0.765. Se realizó el análisis de viabilidad a los 15, 30 y 60 días mediante cuenta en placa en Agar MRS descrito en la sección de viabilidad (Ver anexos). Los resultados de ésta durante el almacenamiento se muestran como porcentaje de supervivencia en el Cuadro 17.

Se puede observar que en las cápsulas obtenidas por goteo el valor máximo de supervivencia de *L. plantarum* tanto a los 15 como a los 30 y 60 días de almacenamiento fue a actividades de agua de 0.115 (a_w correspondiente a la mínima entropía integral), siendo a los 15 días de $86.4 \pm 1.1\%$, a los 30 días de $80.8 \pm 1.1\%$ y a los 60 días de $77.8 \pm 0.3\%$, mientras que en las cápsulas obtenidas por atomización el valor máximo de supervivencia se encontró a actividades de agua de 0.536 (a_w correspondiente a la mínima entropía integral), siendo a los 15 días de $90.6 \pm 1.1\%$, a los 30 días de $84.0 \pm 0.97\%$ y a los 60 días de $81.7 \pm 0.5\%$. Las cápsulas que mostraron una mayor supervivencia de *L. plantarum* a los 60 días de almacenamiento fueron las obtenidas por atomización almacenadas a a_w de 0.536, indicando que confieren un mayor efecto protector que las cápsulas obtenidas por goteo. Comparando en el Cuadro 17 los valores de supervivencia de *L. plantarum* en ambas cápsulas, se observa que la viabilidad en las cápsulas obtenidas por goteo presenta diferencia significativa ($P \leq 0.001$) entre todas las a_w (0.115, 0.329 y 0.536) tanto a los 15 como a los 30 y 60 días de almacenamiento. De igual manera, se observa que la viabilidad en las cápsulas obtenidas por atomización presentó diferencia significativa ($P \leq 0.001$) entre todas las a_w (0.115, 0.536 y 0.765). La mayor viabilidad del microorganismo en las a_w correspondientes a la mínima entropía integral se puede explicar debido a que ésta es la zona donde más ordenadas se encuentran las moléculas de agua, lo que está relacionado con la mayor estabilidad física, química y microbiológica del alimento (Beristain y Azuara, 1990).

Jiménez *et al.* (2015) mostraron que la supervivencia de *L. paracasei* encapsulado disminuyó más rápidamente a a_w mayores a 0.536, las cuales son consideradas como críticas para mantener a salvo a los microorganismos y mencionaron que las cápsulas muestran una mayor viabilidad del microorganismo cuando el proceso de adsorción es controlado por la entropía, donde la movilidad de las moléculas de agua está limitada por la microestructura de las cápsulas. En el presente trabajo, se mostró que las cápsulas obtenidas por goteo presentaron la mayor viabilidad a a_w bajas (0.115), mientras que a a_w de 0.329 en adelante la viabilidad disminuyó notablemente, a diferencia de las cápsulas obtenidas por atomización que la presentaron a una a_w más alta (0.536). Sin embargo, a a_w de 0.115 la viabilidad no se ve muy afectada, posiblemente debido a que a bajas a_w los microorganismos acumulan solutos intercelulares conocidos como solutos compatibles por no interferir con sus funciones metabólicas vitales, cuyo propósito es crear condiciones isosmóticas a través de la membrana celular y así mantener su turgencia (Brown y Simpson, 1972), mientras que a a_w de 0.765 la viabilidad disminuyó considerablemente, debido a un mayor daño en las células provocado probablemente por la movilidad del agua dentro de la cápsula. Los valores de viabilidad más altos en las cápsulas obtenidas por atomización a una a_w mayor se puede deber a la modificación de la microestructura, aumentando el número de microporos, los cuales permitieron un mayor orden de las moléculas de agua proporcionando una mayor estabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento.

Cuadro 17. Porcentaje de supervivencia de *L. plantarum* en las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización durante el almacenamiento a 25 °C a diferentes a_w .

	Goteo			Atomización		
a_w	0.115	0.329	0.536	0.115	0.536	0.765
0 días	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^α	100.0 ^α	100.0 ^α
15 días	86.4 ± 1.1 ^c	81.9 ± 0.3 ^b	75.9 ± 1.8 ^a	86.7 ± 1.7 ^β	90.6 ± 1.1 ^γ	76.8 ± 1.8 ^α
30 días	80.8 ± 1.1 ^c	74.8 ± 1.0 ^b	67.5 ± 0.5 ^a	80.4 ± 0.7 ^β	84.0 ± 1.0 ^γ	65.7 ± 1.6 ^α
60 días	77.8 ± 0.3 ^c	60.5 ± 0.6 ^b	47.9 ± 0.9 ^a	74.2 ± 0.5 ^β	81.7 ± 0.5 ^γ	58.3 ± 1.6 ^α

Los datos incluyen la media ± la D.E. Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas por cada método.

Existen diversos estudios en los que se relaciona la mayor estabilidad de los productos durante el almacenamiento con la zona de mínima entropía integral, como es el caso del presente trabajo. Estudios reportados por Viveros-Contreras *et al.* (2014) muestran el valor máximo de retención de ácido ascórbico encapsulado durante el almacenamiento en las a_w correspondientes a la mínima entropía integral, siendo ésta a a_w de 0.234 para las cápsulas obtenidas por goteo y a 0.765 para las cápsulas obtenidas por atomización, por otro lado Pascual *et al.* (2010) obtuvieron la mayor protección de carotenoides encapsulados durante el almacenamiento de igual manera en las a_w correspondientes a la mínima entropía integral.

La temperatura de almacenamiento también es importante para la supervivencia de los microorganismos, el almacenamiento de probióticos a bajas temperaturas asegura una más larga vida de anaquel y una alta retención en el conteo celular al final de los 30 días de almacenamiento de acuerdo con lo reportado en investigaciones previas (Corcoran *et al.*, 2004). Peredo *et al.* (2016) encontraron que la temperatura de

22 °C afectó la viabilidad de *L. plantarum* en mayor medida, mientras que la temperatura de 4 °C favoreció la viabilidad hasta al final del almacenamiento. Sin embargo, en el presente trabajo se determinó la viabilidad del microorganismo en las cápsulas a 25 °C, que es la temperatura considerada como temperatura ambiente y su relación con diferentes a_w , debido a que estudios termodinámicos mostraron que la a_w es crítica para la supervivencia microbiana durante el almacenamiento, y que la mayor supervivencia se exhibe cuando es controlada por la entropía (Jiménez *et al.*, 2015).

7 CONCLUSIONES

- ✓ Las cápsulas obtenidas por el método de coacervación mediante atomización presentaron una viabilidad mayor de 2.37×10^9 UFC/g en comparación con el método de goteo que fue de 3.32×10^8 UFC/g, obteniéndose una menor reducción logarítmica del microorganismo, la cual fue de 0.98 ciclos.
- ✓ La eficiencia de encapsulación fue mayor en el método de atomización, la cual fue del 90.7%, en comparación con el método de goteo que fue de 82.3%, siendo el más conveniente para la encapsulación de *L. plantarum*.
- ✓ Las cápsulas obtenidas por atomización presentaron mejores propiedades fisicoquímicas, teniendo valores más bajos de humedad y a_w , así como un menor tiempo de disolución y una mayor higroscopicidad que indica una mayor capacidad de adsorción de humedad.
- ✓ Las propiedades de flujo fueron mejores para las cápsulas obtenidas por goteo, sin embargo son elegidas las obtenidas por atomización como las más adecuadas debido a la mayor supervivencia de *L. plantarum* en éstas.
- ✓ Las micrografías obtenidas por microscopio electrónico de barrido muestran una superficie mucho más porosa en las cápsulas obtenidas por atomización, lo que indica un cambio en su microestructura.
- ✓ *L. plantarum* encapsulado tuvo una supervivencia significativamente mayor al *L. plantarum* libre de 4.69 log UFC/g durante las condiciones gastrointestinales *in vitro*. Tanto las cápsulas obtenidas por goteo como por atomización conservaron viabilidades para ejercer beneficios a la salud, sin embargo las obtenidas por atomización confirieron una mayor protección durante las condiciones simuladas, siendo de 7.77 log UFC/g.

- ✓ Mediante las isotermas de adsorción de humedad, se observa que las cápsulas obtenidas por atomización presentaron una mayor capacidad de adsorción de agua, lo cual indica una modificación en la microestructura del alginato.
- ✓ A través de la curva de entalpía integral se mostró que las cápsulas obtenidas por goteo presentan su punto de máxima entalpía a bajas a_w en las cuales fueron llenados los sitios más activos, mientras que para las obtenidas por atomización se encuentra a mayores a_w , indicando que conforme se va incrementando la a_w , las moléculas de agua tienen acceso a sitios más activos.
- ✓ La mínima entropía integral o punto de máxima estabilidad para las cápsulas obtenidas por goteo se presentó en 4.3 g de agua/ 100 g de ss., que corresponde a una zona de a_w de 0.110-0.140, mientras que para las obtenidas por atomización se presentó en 22.5 g de agua/ 100 g de ss. que corresponde a a_w de 0.460-0.600, por lo que estas últimas serán más estables a a_w más altas, sin que el agua tome parte en reacciones de deterioro.
- ✓ Durante 60 días de almacenamiento se pudo observar que el valor máximo de supervivencia para las cápsulas obtenidas por goteo se presentó a a_w de 0.115, mientras que para las cápsulas obtenidas por atomización se presentó a a_w de 0.536, ambas correspondientes a la mínima entropía integral y a la humedad correspondiente al volumen de microporos, siendo éstas las condiciones óptimas para su almacenamiento.
- ✓ Las cápsulas que mostraron la mayor viabilidad de *L. plantarum* durante el almacenamiento por 60 días fueron las obtenidas por atomización almacenadas a una a_w de 0.536.
- ✓ Las cápsulas obtenidas por coacervación mediante atomización obtuvieron las mejores propiedades fisicoquímicas y confirieron el mayor efecto protector a *L. plantarum* durante el proceso de encapsulación, las condiciones gastrointestinales *in vitro* y durante el almacenamiento.

8 BIBLIOGRAFÍA

Abdullah, M. Z., Guan, L.C., Lim, K.C. y Karim, A.A., 2004. The applications of computer vision system and tomographic radar imaging for assessing physical properties of food. Ed. Elsevier. Journal of Food Engineering, 61: 125-135.

Adelantado, C., 2006. Evaluation of the inhibitory activity of lactic acid bacteria strains isolated from natural sources. Presentación al 20th International ICFMH Symposium food safety and food biotechnology: diversity and global impact. Bologna (Italia).

Aguilera, J.M., 2005. Why food microstructure? Journal of Food Engineering. 67: 3-11.

Alavi, S. y Caussat, B., 2005. Experimental study on fluidization of micronized powders. Powder Technology, 157: 114-120.

Anal, A. y Singh, H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Food Science & Technology 18: 240-251.

Annan, N., Borza, A. y Hansen, L., 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703 T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food Research International 41: 184-193.

AOAC, 2003. Métodos de análisis de la asociación oficial de química analítica para determinar humedad, fibra, cenizas, grasa y proteína 32: 1, 2, 5 y 14. U.S.A.

Augustin, M. y Hemar, Y., 2009. Nano-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. Chemical Society Reviews 38: 902-912.

Azuara, E. y Beristain, C., 2006. Enthalpic and entropic mechanisms related to water sorption of yogurt. Drying Technology 24: 1501-1507.

Azuara, E. y Beristain, C., 2007. Estudio termodinámico y cinético de la adsorción de agua en proteína de suero de leche. Revista Mexicana de Ingeniería Química 3: 359-365.

Beindorff, C. y Zuidam, N., 2010. Microencapsulation of Fish Oil. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer Science & Business Media. 161-182 p.

Beristain, C. y Azuara, E., 1990. Estabilidad máxima en productos deshidratados. Ciencia 41: 229-236.

Beristain, C.I., Azuara, E. y Vernon-Carter, E.J., 2002. Thermodynamic analysis of the sorption process of mesquite gum. Chemistry Engineering Communications 189: 115-123.

Bonilla, E. 2010. Análisis termodinámico de microencapsulados con diferentes biopolímeros obtenidos por secado por aspersión para establecer las condiciones de máxima estabilidad durante su almacenamiento. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.

Brown, A.D. y Simpson, J.R., 1972. Water relations of sugar-tolerant yeast: the role of intracellular polyols. Journal of General Microbiology, 72(3): 589-591.

Brunauer, S., Deming, L.S., Deming, W.S. y Teller, E., 1940. On a theory the Van der Waals adsorption of gases. Journal American Chemical Society, 62: 1723-1732.

Brusch, B.G. y Záchia, A.M.A., 2011. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. Journal of Food Engineering, 103: 123-128.

Canani, R., 2007. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. BMJ. 335-340 p.

Candela, M., 2008. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. International Journey Food Microbiology 125: 286-292.

- Carr, R.L., 1965.** Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering*, 72: 163-168.
- Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L. y Collins, J., 1998.** Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 84: 759-768.
- Chatterjee, A., Bhattacharya, A. y Kandwal, A., 2011.** Probiotics in periodontal health and disease. *Journal of Indian Society of Periodontology* 15: 23-28.
- Chaudhry, Q., 2008.** Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives & Contaminants: Part A* , 25(3): 241-258.
- Chen, L., Remondetto, G. y Subirade, M., 2006.** Food protein based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology* 17: 272-283.
- Choi, M., Briancon, S., Andrieu, J. y Fessi, H., 2004.** Effect of freeze-drying process conditions on the stability of nanoparticles. *Drying Technology* 22: 335-346.
- Claesson, M., Van Sinderen, D. y O'Toole, P., 2008.** *Lactobacillus phylogenomics*-towards a reclassification of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2945-2954.
- Collado, M., Meriluoto, J. y Salminen, S., 2007.** Role of commercial probiotics strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology* 45: 454-460.
- Cooper, J. y Gunn, C., 1986.** Powder flow and compaction. Tutorial pharmacy. New Delhi: CBS publishers and distributors. 211-233 p.
- Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. y Stanton, C., 2004.** Comparative survival of probiotic *Lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology* 96:1024-1039.

De Vrese, M., 2009. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. American Journal for Clinical Nutrition 73: 4218-4298.

De Vries, M., Vaughan, E., Kleerebezem, M. y de Vos, W., 2006. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human gastrointestinal tract. International Dairy Journal 16: 1018-1028.

Desai, K. y Park, H., 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. Drying Technology 23: 1361-1394.

Dilnawaz, P., Shakeel, M., Ziyaurrahman, A. y Tabreez, S., 2011. A review on probiotics. International Research Journal of Pharmacy 2: 26-33.

Doherty, S., 2011. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. Food Hydrocolloids 25: 1604–1617.

Dominguez, I., Azuara, E., Vernon-Carter, E. y Beristain, C., 2007. Thermodynamic analysis of the effect of water activity on the stability of macadamia nut. Journal of Food Engineering 81: 566-571.

Evans, D., Pye, G., Bramley, R., Clark, A., Dyson, T. y Hardcastle, J., 1988. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human-subjects. Gut 29: 1035-1041.

Ezhilarasi, P., Karthik, P., Chhanwal, N. y Anandharamakrishnan, C., 2013. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. Food and Bioprocess Technology, 6(3): 628-647.

Fang, Z. y Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols a review. Trends Food Science Technology 21(5):10-23.

FAO/WHO., 2010. FAO/WHO Expert Meeting on the Application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potential Food Safety Implications: Meeting Report. Roma.

FAO/WHO, 2006. Probiotics in food-Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. [En línea] Disponible en: www.ftp.fao.org [Último acceso: 20 Febrero 2015].

Fareez, I.M., Lim, S.M., Mishra, R.K. y Ramasamy, K., 2015. Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. International Journal of Biological Macromolecules 72: 1419-1428.

Figura, L. y Teixeira, A.A., 2007. Food Physics: Physical Properties- Measurement and Applications. Springer Science & Business Media. 550 p.

Fritzen-Freire, C.B., Prudencio, E.S., Amboni, R.D.M.C., Pinto, S.S., Negro-Murakami, A.N. y Murakami, F.S., 2012. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. Food Research International 45: 306-312.

Fletcher, A.J. y Thomas, K.M., 2000. Compensation Effect for the Kinetics of Adsorption /Desorption of Gases/Vapors on Microporous Carbon Materials. Langmuir. 16: 6253 – 6266.

Fuchs, M., 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. Journal of Food Engineering 75(1): 27-35.

Gago, J.A.M., 2009. Nanociencia y nanotecnología: Entre la ciencia ficción del presente y la tecnología del futuro. FECYT. Madrid, España.

Garti, D.N. y McClements J., 2012. Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and nutraceuticals. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Elsevier. 640 p.

Georgieva, R., 2009. Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. International Dairy Journal 19: 696-702.

Ghosh, S., 2006. Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective. In: Functional Coatings: by Polymer Microencapsulation. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Belgium. 1-28 p.

Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo J.V., Rastall, R.A. y Roberfroid, M.B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17: 259-275.

Giraffa, G., 2010. Importance of *Lactobacilli* in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology* 161: 480-487.

González, A.G.G., 2009. Intercambio Iónico en Geles de Alginato de Calcio. Protocolo de Tesis. Instituto Tecnológico de Durango, México.

Grajek, W., Olejnik, A. y Sip, A., 2005. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Journal Acta Biochimica Polonica* 52: 665-671.

Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C. y Thom, D., 1973. Biological Interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*, 32: 195–198.

Guevara, N.A., 2009. Optimización de las condiciones de secado por atomización para encapsular *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus casei* y mejorar su viabilidad. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla. México.

Guterres, S., 2009. Spray drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: A brief overview. *Brazilian Journal of Physics* 39: 205-209.

Halasz, A., 2009. Lactic Acid Bacteria. Food Quality and Standards. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).

Hauptmann, I.A., Hauptmann, L., Press, A.G., Fuchs, B., Fuchs, M., Ewe, K. y Ramadori, G., 1998. Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 12: 673-678.

Hayes, G., 1987. Food engineering data handbook. New York: John Wiley & Sons.

Heidebach, T., Först, P. y Kulozik, U., 2012. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52: 291–311.

Huang, Q., Yu, H. y Ru, Q., 2010. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science* 75: R50-R57.

Jayalalitha, V., Balasundaram, B. y Palanidorai, R., 2012. In vitro assessment of microencapsulated probiotic beads. *International Journal of Agriculture: Research and Review* 2: 1-6.

Jiménez, M., Flores-Andrade, E., Pascual-Pineda, L.A. y Beristain, C.I., 2015. Effect of water activity on the stability of *Lactobacillus paracasei* capsules. *Food Science and Technology* 60: 346-351.

Jin, Y., 2007. Microencapsulation of Marine Lipids as a Vehicle for Functional Food Delivery. *Marine Nutraceuticals and Functional Foods*. Londres: CRC Press. 115-155 p.

Kailasapathy, K., 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 3: 39-48.

Katouzi, S., Majd, A., Fallahian, F. y Bernard, F., 2011. Encapsulation of shoot tips in alginate beads containing salicylic acid for cold preservation and plant regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Australian Journal Of Crop Science* 5.

Kekkonen, R., 2007. The effect of probiotics on respiratory infections and gastrointestinal symptoms during training in marathon runners. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 17 (4): 352–363.

Krasaekoopt, W., 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 14: 737-743.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H., 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal* 13: 3-13.

Krokida, M. y Maroulis, Z., 2000. Quality changes during of food materials. In: A.S. Mujumdar, editor. *Drying Technology in Agriculture and Food Sciences*. USA: Science Publishes. Inc. Enfield. 61–106.

Labuza, T., Kaanane, A. y Chen, J., 1985. Effect of temperature on the moisture sorption isotherms and water activity shift of two dehydrated food. *Journal of food Science* 50: 358-391.

Lanchman, L. y Kanig, J., 2013. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy: 4th Edition.* CBS Publishers and Distributors. 420 p.

Landi, H., 2011. Gut feeling (World probiotics market and gut or digestive health launches). *Beverage World* 130 (1): 44-45.

Lang, K., McCune, T. y Steinberg, M., 1981. Proximity equilibration cell for rapid determination of sorption isotherms. *Journal Food Science* 46: 936-938.

Leclercq, S., Harlander, K. y Reineccius, G., 2009. Formation and characterization of microcapsules by complex coacervation with liquid or solid aroma cores. *Flavour and PrAGRance Journal* 24: 17-24.

Lewis, M. J., 1987. *Physical Properties of Foods and Food Processing Systems.* Chichester, UK: Ellis Horwood Ltd. P 51-64.

Li, H., 2008. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 346: 160-168.

Lisboa, F., Andrade, J. y Oliveira, M., 2009. Encapsulation of probiotic for food application- a review. In *Abstracts of the 14th European Congress on Biotechnology Barcelona.* *New Biotechnology* 25: 186.

Lotfipour, F., Mirzaeei, S. y Maghsoodi, M., 2012. Preparation and Characterization of Alginate and Psyllium Beads Containing *Lactobacillus acidophilus*. *The Scientific World Journal.* 2012(2012): 1-8.

Luyer, M., 2005. Strain specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. *Infection and Immunity* 73(6): 3686-3692.

Luykx, D., Peters, R., Van, R. y Bouwmeester, H., 2008. A review of analytical methods for the identification and characterization of nano delivery systems in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 8231-8247.

Lyhs, U., Korkeala, H. y Björkroth, J., 2002. Characterization of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout using ribotyping. *International Journal Food Microbiology* 72: 147-153.

Madureira, A., 2011. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International* 44: 465–470.

Makarova, K., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Journal Proceedings of the National Academy of Sciences* 42: 15611-15616.

Mandal, S., Puniya, A. y Singh, K., 2006. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *L. casei* NCDC-298. *International Dairy Journal* 16: 1190-1195.

Mathara, J., 2008. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya.. *Current Microbiology* 56: 315-321.

Mattilia-Sandholm, T., 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 12: 173-182.

McClements, D., Decker, E., Park, Y. y Weiss, J., 2009. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 49: 577-606.

Medina, C., 2007. Nanoparticles: Pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology* 150: 552-558.

Mokarram, R., Mortazavi, S., Najafi, M. y Shahidi, F., 2009. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International* 42: 1040-1045.

Mortazavian, A., Razavi, S., Ehsani, M. y Sohrabvandi, S., 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology* 5 (1): 1-18.

Mukadam, M., 2015. Probiotics in Aquaculture. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 2 (6): 45-47.

Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F. y Coppola, R., 2012. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 182–186.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B., 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. 1806-1815 p.

Nunes, R. y Rotstein, E., 1991. Thermodynamics of the water foodstuff equilibrium. *Drying Technology* 9: 841-856.

Ortega-Rivas, E., 2003. Review and research trends in food powder processing. *Powder Handling & Processing*, 15(1): 18-25.

Pagnini, C., 2010. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Journal Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 454-459.

Parvez, S., Malik, K., Ah Kang, S. y Kim, H., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1171-1185.

Parzanese, M., Alimentos argentinos. Tecnologías para la Industria Alimentaria. Microencapsulación. [En línea] Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_20_Microencapsulacion.pdf [Último acceso: 20 Febrero 2015].

Pascual-Pineda, L., Flores-Andrade, E., Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J., Beristain, C., Gutiérrez López. y Azuara, E., 2014. Micropores and Their Relationship with Carotenoids Stability: A New Tool to Study Preservation of Solid Foods. *Food Bioprocess Technology* 7: 1160-1170.

Pascual-Pineda, L.A. 2010. Caracterización de nanoestructuras con diferente geometría: uso potencial en alimentos. Instituto Politécnico Nacional, Tesis Doctoral.

Peña V., Salinas, M. y Ríos, S.R., 2006. Contenido de antocianinas totales y actividad antioxidante en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración. Ed. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Revista Chapingo-Horticultura 12:159-163

Peredo, A.G., Beristain, C.I., Pascual, L.A., Azuara, E. y Jiménez, M., 2016. The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria. Food Science and Technology 73: 191-196.

Peredo-Lovillo, A., 2014. Enriquecimiento de una pasta de aceituna con bacterias potencialmente probióticas encapsuladas con alginato y prebióticos. Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana (Instituto de Ciencias Básicas). México.

Prieto, G.F., Otazo, S.E.M., Gordillo, M.A.J., Méndez, M.M.A. y Sánchez J.F., 2007. Síntesis de arsenoalginato de calcio para eliminación de iones arseniatos en aguas contaminadas. DYNA, 74(153): 167-179.

Priya, A., Raichur, A. y Vijayalakshmi, S., 2011. Enhanced Survival of *Probiotic Lactobacillus acidophilus* by Encapsulation with Nanostructured Polyelectrolyte Layers through Layer-by-Layer Approach. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(21):11838-45.

Ramos, C. y Fuentes., 2005. Probiotics and biotherapy. Recent Research Developments in Microbiology 9: 97-127.

Rao, J. y McClements, D., 2012. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. Food Hydrocolloids 29: 326-334.

Rashidi, L. y Khosravi-Darani, K., 2011. The applications of nanotechnology in food Industry. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 51: 723-730.

Sabikhi, L., Babu, R., K, T. D. y Kapila, S., 2010. Resistance of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to Processing Treatments and Simulated Gut Conditions. Food Bioprocess Technology 3: 586-593.

Saglowicz, L. y Leser, M., 2010. Delivery systems for liquid food products. Current Opinion in Colloids & Interfaces 15: 61-72.

Sanders, M., Gibson, G., Gill, H. y Guarn, 2007. Probiotics: their potential to impact human health. Council for agricultural science and tecnolochy. 36 p.

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

Saulnier, D., Spinler, J., Gibson, G. y Versalovic, J., 2009. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. Current Opinion in Biotechnology 20: 135-141.

Sayrfa, N. y Mohammed, A., 2010. Enhancement of probiotics survival by microencapsulation with alginate and prebiotics. Benefits and Challenges of Probiotics and Microencapsulation. Biotechnology Journal 6: 13-18.

Schmitt, C. y Turgeon, S., 2011. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. Advances in Colloid and Interface Science 167: 63-67.

Shah, D., Shah, Y. y Rampradhan, M., 1997. Development and Evaluation of controlled release diltiazem hydrochloride microparticles using cross-linked poly (vinyl alcohol). Drug Development and Industrial Pharmacy 23(6): 567-574.

Shah , N. P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science, 83(4): 894-907.

Shoji, A.S., Oliveira, A.C., Balieiro, J.C., Freitas, O., Thomazini, M., Heinemann, R.J.B., Okuro,P.K. y Favaro-Trindade, C.S., 2013. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. Food and Bioproducts Processing 91: 83-88.

Snowane, C. y Bhatia, K., 2000. Characterization of pore size distributions of mesoporous materials from adsorption isotherms. *Journal of Physical Chemistry* 104: 9099-9110.

Soccol, C., 2010. The Potential of probiotics: a review. *Journal Food Technology and Biotechnology* 3: 206-228.

Sohail, A., 2011. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology* 145: 162-168.

Solanki., 2013. Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. *BioMed Research International*. 1-21 p.

Souza, C., 2013. Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides. *Food Hydrocoll* 30: 375-381.

Sultana, K., 2010. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* 62: 47-55.

Taneja, A. y Singh, H., 2012. Challenges for the delivery of long-chain n-3 fatty acids in functional foods. *Food Science Technology* 3: 105-123.

Tonon, R.V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P. y Hubinger, M.D. 2009. Physicochemical and morphological characterization of açai (*Euterpe oleraceae Mart.*) produced with different carrier agents. *International Journal of food Science and Technology* 44: 1950-1958.

Tonon, R. V., Brabet, C. y Hubinger, M, D., 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray dried açai (*Euterpe oleraceae Mart.*) juice powder produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43: 907-914.

Tsami, E., Krokida, M.K. y Drouzas, A.E., 1999. Effect of drying method on the sorption characteristics of model fruit powders. *Journal Food Engineering*, 38: 381-392.

Van den Berg, C., 1984. Desorption of water activity of foods for engineering purposes by means of the GAB model of sorption. *Engineering and Foods*. McKenna B.M.

Viveros-Contreras, R., Téllez, M.D., Perea, F.M., Alamilla, B.L., Cornejo, M.M., Beristain, G.C., Azuara, N.E. y Gutiérrez, L.G., 2013. Encapsulation of ascorbic acid into calcium alginate matrices through coacervation coupled to freeze-drying. *Revista de Ingeniería Química* 12: 29-39.

Wandrey, C., Bartkowiak, A. y Harding, S.E., 2010. Materials for Encapsulation. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. New York. 31-100 p.

Weiss, J., 2008. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics* 3: 145-154.

Weiss, J., Takhistov, P. y McClements, J., 2006. Functional materials in food nanotechnology. *Food Science* 71(9): R107-R116.

Wexler, A., 1976. Vapor pressure formulation for water in range 0 to 100 °C. *Journal of research of the national bureau of standards. Physics and Chemistry* 80: 775-785.

Zhang, K., 2012. Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 89: 61-66.

9 ANEXOS

9.1 Agar y caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe)

Se utilizó agar y caldo MRS para *Lactobacillus* BD Difco™ con la siguiente composición:

Ingredientes	Cantidad g/L
Proteasa pectona No. 3	10.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	20.0
Polisorbato 80	1.0
Citrato de amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2.0
Agar*	15.0

*El caldo consta de los mismos ingredientes sin el agar.

pH final 6.5 ± 0.2 .

9.2 Buffer PBS

Ingredientes	Cantidad g/L
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	0.854
KH ₂ HPO ₄	0.541
Agua destilada	c.s.p. 1 L*

*Cantidad suficiente para 1 litro.

pH final 7.0 ± 0.2

9.3 Micrografías de las cápsulas obtenidas por goteo y atomización

Se realizaron micrografías mediante microscopio electrónico de barrido a 25 kV para las cápsulas obtenidas por goteo y atomización. Las Figuras 20 y 21 muestran la morfología de ambas cápsulas a 350X y 3000X, donde se pueden apreciar las diferencias en su estructura.

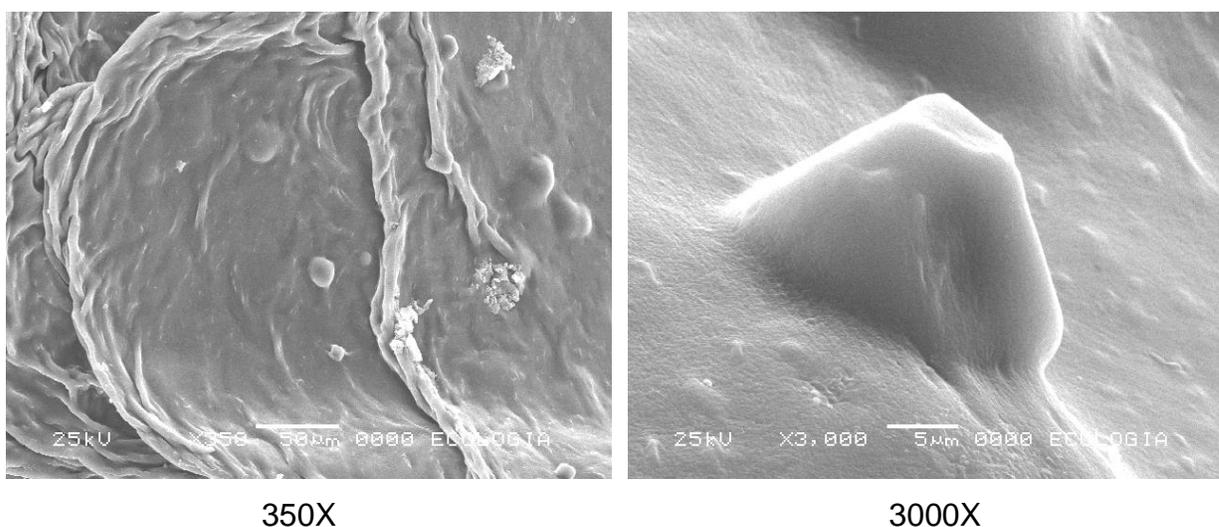


Figura 20. Microestructura de las cápsulas de alginato de calcio obtenidas por goteo, secadas por liofilización.

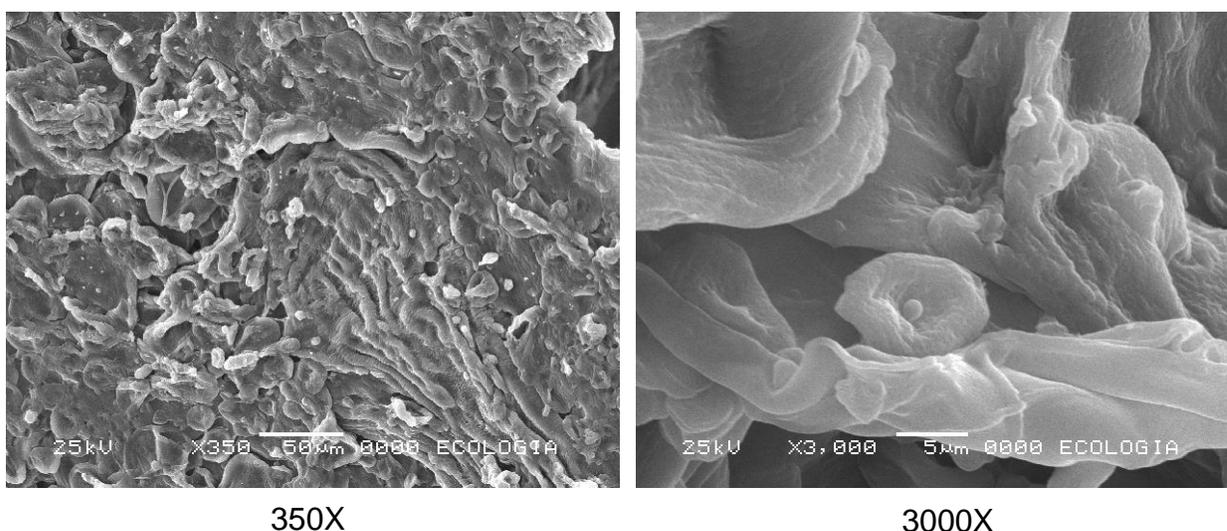


Figura 21. Microestructura de las cápsulas de alginato de calcio obtenidas por atomización, secadas por liofilización.

9.4 Micrografías de las cápsulas en condiciones gastrointestinales *in vitro*.

Las figuras 22 y 23 muestran las micrografías obtenidas de las cápsulas de ambos métodos a los 0, 60 y 240 minutos en condiciones gastrointestinales *in vitro*.

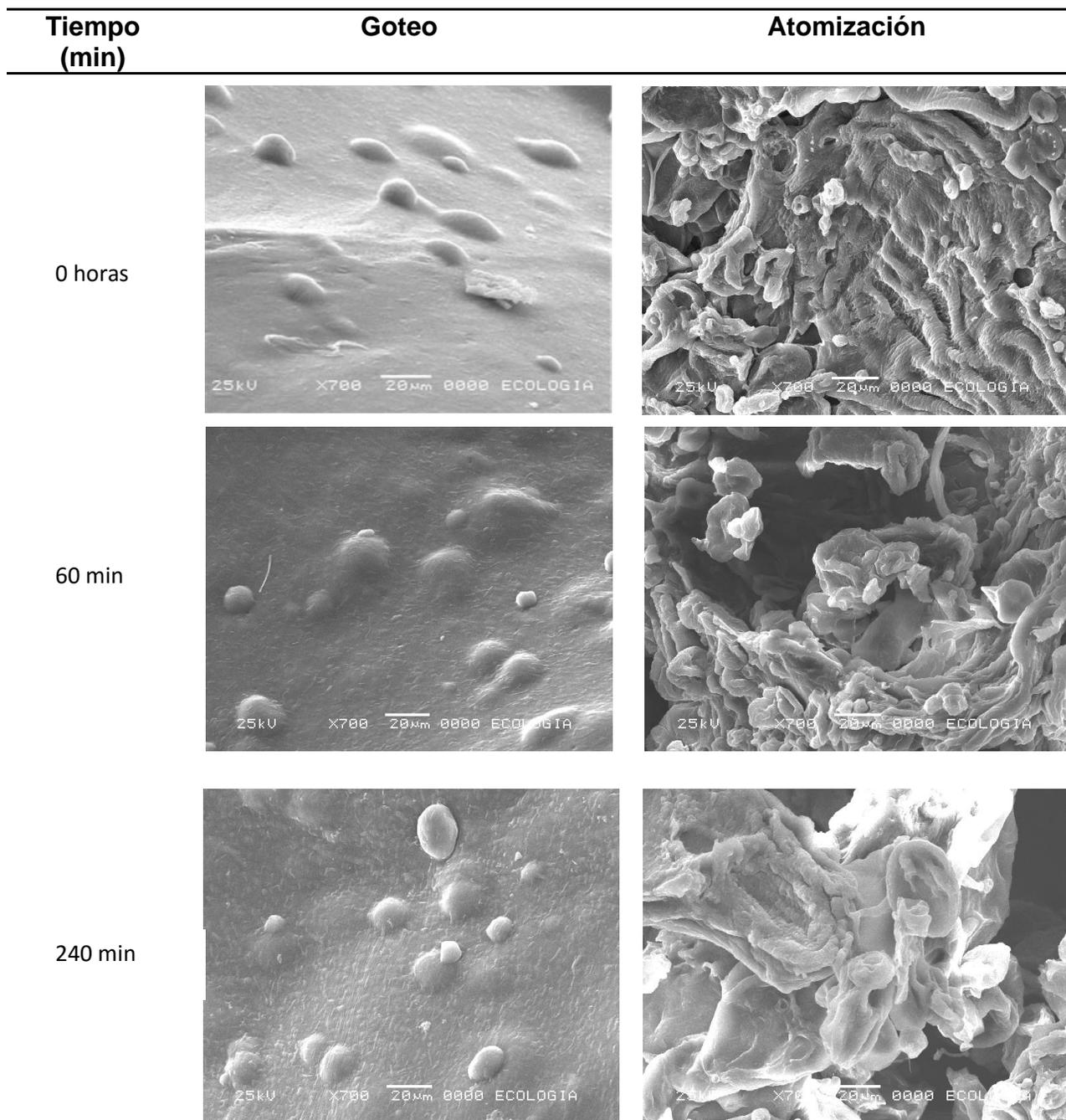


Figura 22. Micrografías a 700X de las cápsulas obtenidas mediante goteo y atomización durante las condiciones gastrointestinales *in vitro*.

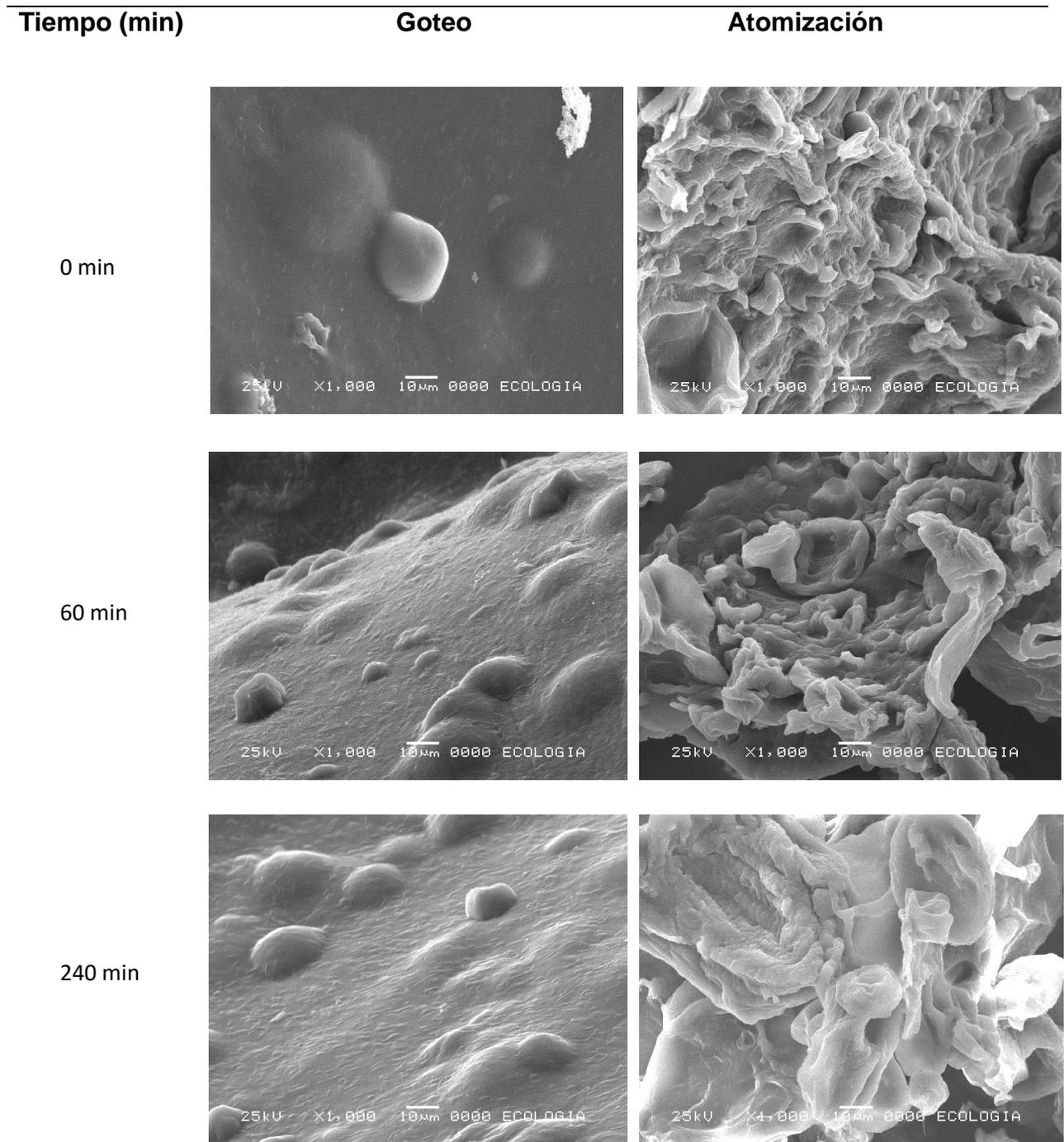


Figura 23. Micrografías a 1000X de las cápsulas obtenidas mediante goteo y atomización durante las condiciones gastrointestinales *in vitro*.

9.5 Viabilidad de *L. plantarum* durante el almacenamiento

En el Cuadro 18 se muestra la viabilidad de *L. plantarum* expresada en UFC/g de las cápsulas obtenidas por goteo y atomización durante el almacenamiento por 60 días a una temperatura de 25 °C y almacenadas a distintas a_w .

Cuadro 18. UFC/g de *L. plantarum* en las cápsulas obtenidas por goteo y por atomización durante el almacenamiento a 25 °C a distintas a_w .

	Goteo			Atomización		
a_w	0.115	0.329	0.536	0.115	0.536	0.765
0 días	3.32×10^8 $\pm 5.3 \times 10^{7a}$	3.32×10^8 $\pm 5.3 \times 10^{7a}$	3.32×10^8 $\pm 5.3 \times 10^{7a}$	2.37×10^9 $\pm 4.5 \times 10^{8\alpha}$	2.37×10^9 $\pm 4.5 \times 10^{8\alpha}$	2.37×10^9 $\pm 4.5 \times 10^{8\alpha}$
15 días	2.33×10^7 $\pm 5.7 \times 10^{6c}$	9.33×10^6 $\pm 5.7 \times 10^{5b}$	3.00×10^6 $\pm 1.0 \times 10^{6a}$	1.40×10^8 $\pm 5.3 \times 10^{7\beta}$	3.16×10^8 $\pm 7.6 \times 10^{7\gamma}$	1.66×10^7 $\pm 5.7 \times 10^{6\alpha}$
30 días	7.66×10^6 $\pm 1.5 \times 10^{6a}$	2.40×10^6 $\pm 5.3 \times 10^{5b}$	5.66×10^5 $\pm 5.8 \times 10^{4b}$	3.50×10^7 $\pm 5.0 \times 10^{6\beta}$	7.56×10^7 $\pm 1.5 \times 10^{7\gamma}$	1.50×10^6 $\pm 5.0 \times 10^{5\alpha}$
60 días	4.20×10^6 $\pm 2.6 \times 10^{5a}$	1.43×10^5 $\pm 1.5 \times 10^{4b}$	1.46×10^4 $\pm 5.0 \times 10^{3c}$	9.00×10^6 $\pm 1.0 \times 10^{6\beta}$	4.56×10^7 $\pm 5.1 \times 10^{6\gamma}$	3.00×10^5 $\pm 1.0 \times 10^{5\alpha}$

Los datos incluyen la media \pm la D.E. Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas por cada método.

9.6 Constancia Congreso Nacional de Avances en Alimentación y Biotecnología

I CONGRESO NACIONAL DE AVANCES EN ALIMENTACIÓN Y BIOTECNOLOGÍA 2016

Facultad de Ingeniería Química de Universidad Autónoma de Yucatán
Colegio Mexicano de Nutriólogos, Capítulo Yucatán

Otorgan la Presente

C O N S T A N C I A

A: Ortiz, F.M., Azuara, E., Beristain C.I., Pascual L.A., Jiménez, M.

Por su participación como EXPOSITOR en la modalidad: CARTEL en el 1er Congreso Nacional de Avances en Alimentación y Biotecnología, realizado en la ciudad de Mérida, Yucatán del 27 al 29 de enero de 2016, con la ponencia:

Encapsulación de Lactobacillus plantarum en alginato.

Merida, Yucatán, México a 29 de enero de 2016

Marcela Zamudio Maya
Dra. Marcela Zamudio Maya
Directora de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán

LN. María José Rodríguez Velázquez, NC
LN. María José Rodríguez Velázquez, NC
Presidenta del Colegio Mexicano de Nutriólogos Capítulo Yucatán

Dra. María Rubi Segura Campos
Dra. María Rubi Segura Campos
Presidenta de CONABI 2016