



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

ENCAPSULACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN POLÍMEROS DE  
ALGINATO MEDIANTE TÉCNICA DE EXTRUSIÓN

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA  
MÉDICA

AUTORES: NICOLÁS CANALES JORQUERA Y NAYARET LÓPEZ GUZMÁN

PROFESORA GUÍA: T.M. DRA. VERÓNICA CARRASCO SÁNCHEZ

TALCA-CHILE

2021

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022



## ***Dedicatoria***

*Esta memoria se la dedicamos a nuestras familias, por el apoyo incondicional que nos han brindado durante toda nuestra vida, por no perder la esperanza y creer siempre en nosotros. A nuestros amigos por convertir todos estos años en momentos de diversión y risas. Por último, a nosotros mismos por lograrlo contra toda adversidad.*

### ***Agradecimientos***

*A nuestra profesora guía, la Dra. TM. Verónica Carrasco Sánchez, por su paciencia, tiempo y por motivarnos a seguir el camino de la investigación. A la Universidad de Talca, por ser sede de nuestro aprendizaje a lo largo de estos años. A nuestros profesores, quienes idearon nuevas técnicas educativas para asegurar y fortalecer nuestra formación superior a pesar de las condiciones sanitarias.*

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b>	7
<b>1. Introducción</b>	8
<b>2. Objetivos</b>	10
<b>3. Metodología de búsqueda y organización de la información</b>	11
<b>4. Marco teórico</b>	13
<b>4.1. Probióticos y su paso por el sistema gastrointestinal</b>	13
<b>4.2. Encapsulación de probióticos</b>	22
<b>4.3. Encapsulación de probióticos en alginato por técnica de extrusión</b>	24
<b>4.3.1 Alginato</b>	24
<b>4.3.2. Técnica de extrusión</b>	28
<b>4.4. Probióticos encapsulados en matrices de alginato por técnicas de extrusión y análisis de supervivencia en su paso por el SGI</b>	35
<b>4.5. Liberación de BAL encapsuladas en matrices de alginato</b>	48
<b>5. Conclusiones</b>	53
<b>6. Referencias bibliográficas</b>	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Valores de pH del sistema gastrointestinal.	15
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de tolerancia a los ácidos asociados con las membranas celulares y los sistemas de transporte de iones.	18
<b>Figura 3.</b> Posible disposición interna del material del núcleo encapsulado en una partícula de gel de alginato.	23
<b>Figura 4.</b> Estructura química del alginato y sus monómeros.	25
<b>Figura 5.</b> Dibujo esquemático y coordinación de calcio del "modelo de caja de huevos".	26
<b>Figura 6.</b> Estructura de una perla de alginato.	27
<b>Figura 7.</b> Morfología de superficie de una perla de alginato.	27
<b>Figura 8.</b> Dibujo esquemático de polimerización mediante método de extrusión simple.	29
<b>Figura 9.</b> Dibujo esquemático de los mecanismos modificados de extrusión.	31
<b>Figura 10.</b> Estructura de una perla de alginato.	32
<b>Figura 11.</b> Superficie de una perla de alginato.	33
<b>Figura 12.</b> Efectos de la concentración de alginato como agente encapsulante para mejorar la viabilidad de <i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF en condiciones gástricas simuladas	43

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1:</b> Diámetro de cápsulas de alginato reportado en la literatura de acuerdo con los diferentes métodos de extrusión.	34
<b>Tabla 2.</b> Número de células encapsuladas y libres después de la exposición a SGF y SIF.	41
<b>Tabla 3.</b> Efectos del material encapsulante y fluidos gástricos simulados en la supervivencia de probióticos.	51



## RESUMEN

Los probióticos son un grupo de bacterias ácido lácticas, Gram positivo, inmóviles y no formadoras de esporas, que se utilizan como tratamiento preventivo para algunos malestares del aparato gastrointestinal tales como estreñimiento, diarrea, acidez gástrica y reflujos gastroesofágicos. Son componentes exógenos del organismo que al colonizar el intestino grueso y mantener la microbiota traen beneficios para el ser humano. Se ha demostrado que para cumplir este rol deben ser consumidos en concentraciones específicas, según la normativa atinente chilena, esta corresponde a  $10^7$  UFC por gramo de producto terminado.

Debido a su naturaleza, la viabilidad de los probióticos se ve amenazada por los distintos mecanismos de defensa presentes en el tracto gastrointestinal, como la variación extrema de pH, que alcanza un valor cercano a 1 en el estómago, y las secreciones biliares, incluidas en el duodeno. Bajo esta problemática se han realizado estudios que demuestran que la encapsulación con polímeros, como el alginato que es de origen natural e inocuo para el organismo, otorgan un mayor nivel de protección y ayudan a mantener la viabilidad general de los probióticos. Por ello, el objetivo de esta revisión fue analizar los estudios reportados sobre gelificación de alginato, mediante la técnica de extrusión, para encapsular bacterias ácido lácticas probióticas y analizar cómo se ve influenciada la supervivencia celular.

Los resultados de distintos trabajos experimentales discutidos manifiestan un aumento en la viabilidad de células recubiertas con alginato por sobre las células libres, bajo todas las condiciones a las cuales fueron sometidas, sin embargo, la información sugiere que la utilización de otros componentes adicionales, como una segunda capa polimérica, mantendría aún más la viabilidad celular.

**Palabras clave:** Bacterias ácido lácticas, alginato, encapsulación, extrusión.

## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, se destaca la acción de los probióticos como forma de prevención y tratamiento de diversas enfermedades del aparato gastrointestinal. Estas enfermedades constituyen un problema creciente para la salud pública a nivel mundial, debido principalmente a los cambios de hábitos alimenticios que se ha desarrollado a lo largo de las últimas décadas en nuestra sociedad. Las enfermedades gastrointestinales representan un amplio espectro de dolencias, tales como, estreñimiento, diarrea, acidez gástrica, reflujos gastroesofágicos, náuseas, vómitos y pérdidas o aumentos de masa corporal, entre otras.

Probióticos se le denomina a un grupo de bacterias ácido lácticas que logran mantener la microbiota intestinal, sin embargo, estos deben ser incorporados a la dieta ya que son parte de los componentes exógenos del ambiente gastrointestinal. Además, para que cumplan su objetivo en el intestino grueso, estos deben alcanzar una concentración específica.

Debido a la composición del aparato digestivo, sus distintos valores de pH y la presencia de compuestos como los ácidos gástricos y secreciones biliares, consumir probióticos de forma directa resulta perjudicial para la viabilidad de estas bacterias, por lo cual, una de las alternativas que promueve la industria farmacéutica es encapsular, a través de una matriz polimérica, a los probióticos otorgándoles protección y de esta manera aumentar su sobrevivencia para lograr su objetivo a nivel intestinal.

Las matrices poliméricas utilizadas en este proceso pueden clasificarse, según su origen, en sintéticas y naturales, siendo estas últimas las de preferencia debido a su compatibilidad con el organismo. Entre todos los polímeros estudiados se destaca el alginato por sus cualidades no tóxicas, su facilidad de disolución y su bajo costo. Respecto a los

procesos de encapsulación se prioriza la metodología de encapsulación mediante extrusión debido a su simplicidad y bajo costo. También existen otros procesos como la emulsión y el secado por atomización, que, si bien tienen sus beneficios, requieren de un gasto mayor de recursos.

El objetivo de esta revisión bibliográfica es analizar estudios y reportes sobre la gelificación del alginato, mediante la técnica de extrusión, para los procesos de encapsulación de bacterias probióticas y cómo éstas permanecen viables ante la exposición a fluidos gastrointestinales simulados *in vitro*.

Para esto se realizó una revisión narrativa que integró artículos que documentan el paso de los probióticos libres por el sistema gastrointestinal, y sobre aquellos que hablan de la encapsulación de BAL probióticas en matrices poliméricas como el alginato. De esta manera se podrán discutir los datos reportados en cuanto a supervivencia de probióticos libres y encapsulados, permitiendo analizar las cualidades protectoras del alginato como agente encapsulante de manera que se pueda estimar una composición que entregue la mayor protección.

## **2. OBJETIVOS**

### **I. Objetivo general**

Revisar y analizar los estudios que han reportado la gelificación del alginato, mediante la técnica de extrusión, para la encapsulación de bacterias ácido lácticas probióticas y cómo la encapsulación afecta a la supervivencia de estas bacterias.

### **II. Objetivos específicos**

- i. Revisar antecedentes sobre los probióticos en general y analizar su paso por el sistema gastrointestinal.
- ii. Revisar la encapsulación de probióticos en perlas de alginato producidas mediante el método de extrusión.
- iii. Discutir sobre los datos reportados en cuanto a la supervivencia de probióticos encapsulados.

### 3. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN

#### 3.1. Estrategia de búsqueda

En primera instancia se realizó una búsqueda simple mediante la base de datos *Web of Science* (WOS) de artículos científicos históricos y de impacto relacionado a probióticos y también a alginato, dicha búsqueda se realizó en el idioma inglés. También se realizó la búsqueda de decretos, resoluciones o leyes vigentes en Chile respecto al uso de probióticos en productos farmacológicos orales o en alimentos, así como también la búsqueda de libros electrónicos atinentes a los temas ya mencionados. Posteriormente, se realizó una nueva búsqueda en la misma base de datos mencionada con anterioridad, sin embargo; dicha búsqueda fue de tipo avanzada configurándose por medio de las terminologías MeSH y booleanos, mediante la siguiente ecuación de búsqueda: “TS= (*Microencapsulation* OR *encapsulation*) AND TS= (*probiotic* OR *lactic acid bacteria*) AND TS= (*alginate*) AND TS =(*extrusion*)” de la cual se obtuvo un total de 71 artículos científicos. Se limitó la búsqueda al idioma inglés y por años, abarcando solo aquellos publicados desde el año 2015 a 2021, los que fueron localizados mediante el acceso remoto a la base de datos WOS disponible para alumnos, por medio de la plataforma de la biblioteca de la Universidad de Talca.

#### 3.2. Criterios de inclusión y exclusión

En la primera búsqueda se incluyeron todos los artículos relacionados a probióticos y a alginato, dando énfasis a otras revisiones bibliográficas y artículos históricos, no se limitó por años. En la segunda búsqueda, se incluyó todo tipo de artículos originales basados en los criterios de inclusión: encapsulación de probióticos en alginato mediante técnicas de

extrusión. Se excluyeron todos los artículos emitidos antes del año 2015, aquellos que no contaban con una metodología descrita para el método de extrusión y aquellos cuyos propósitos se encontraban fuera de los temas a demostrar en esta revisión bibliográfica en base a los objetivos planteados en el capítulo anterior, como el efecto de la solución entrecruzante en la viscosidad del polímero.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Probióticos y su paso por el sistema gastrointestinal

La historia de los probióticos se remonta a inicios del siglo XX, cuando los científicos Metchnikoff & Mitchell en el año 1910 reportaron la relación existente entre el alto consumo de leche fermentada y el aumento de la longevidad en una población de Bulgaria, sugiriendo que “la dependencia de los microbios intestinales hacia los alimentos permitía adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y reemplazar los microbios nocivos por microbios útiles” (1). Descubrimiento por el cual recibieron el premio nobel en el año 1907 (2). Durante ese mismo periodo, un médico pediatra francés llamado Henry Tissier observó que los niños que presentaban diarrea tenían una escasa cantidad de bacterias con morfología en forma de “Y” en sus heces, las cuales, por el contrario, se encontraban en abundancia en niños sanos, razón por lo que sugirió que dichas bacterias podrían ser administradas en pacientes con diarrea para de esta forma, restaurar la microbiota intestinal (3). Ya en el año 1965, el término “probiótico” fue utilizado por primera vez para describir bacterias del intestino, cuyos efectos resultaron ser beneficiosos para el huésped, tanto en prevención como tratamiento de enfermedades (4).

Actualmente, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas como parte de un alimento, confieren al huésped un beneficio para la salud (5).

Dentro de los objetivos que debe cumplir un microorganismo para ser considerado como probiótico se encuentran: colonizar temporalmente el intestino, tener la capacidad de

adherirse a las células epiteliales y generar una respuesta beneficiosa, no tóxica para el huésped. Asimismo, debe adaptarse a la microbiota intestinal de este, sin desplazar a los microorganismos nativos presentes (6).

Entre los efectos beneficiosos de los probióticos en el ser humano, se encuentra el alivio del malestar digestivo, la reducción de la duración de la diarrea, la regulación de la inmunidad intestinal, la mejora de los síntomas del síndrome del intestino irritable e incluso la protección ante eventos gástricos cancerígenos (7-9).

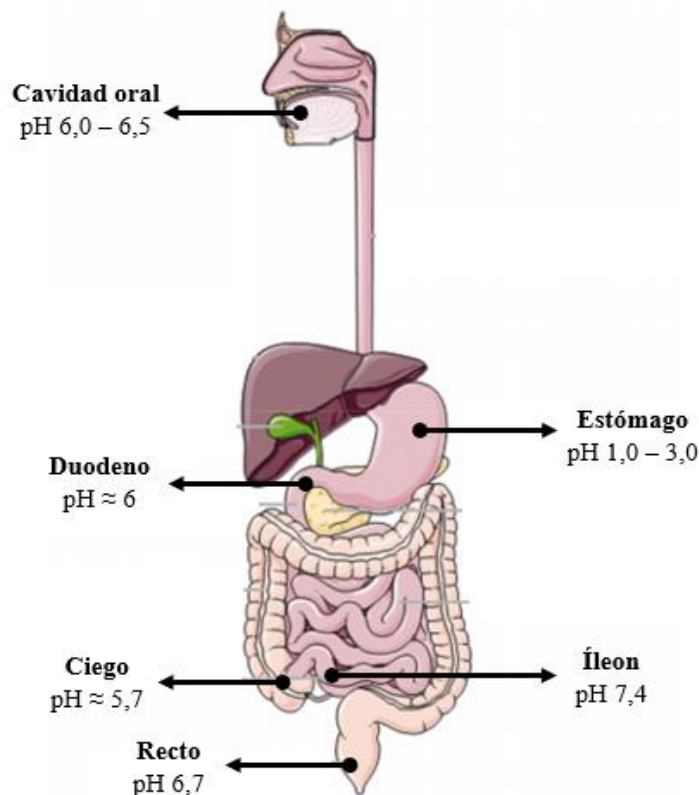
Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido consideradas microorganismos probióticos dado que numerosas investigaciones demuestran sus efectos beneficiosos para la salud humana, convirtiendo a estas bacterias en los microorganismos más importantes con actividad probiótica (10). Las BAL son bacterias Gram positivo, inmóviles y no formadoras de esporas. Comprenden alrededor de 20 géneros, entre los cuales se encuentran *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, siendo estos dos últimos los más utilizados en el área de los alimentos y los más estudiados (11).

Se han realizado diversas investigaciones para establecer las concentraciones en las que estos microorganismos deben ser consumidos para poder producir sus efectos benéficos en el organismo. Así, en Chile, el documento “Régimen de control sanitario para los productos en formas farmacéuticas orales, elaborados con *Lactobacillus spp.* y otros bacilos específicos” del Instituto de Salud Pública (ISP) establece que se requiere de un mínimo de  $10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de producto terminado (12, 13).

Sin embargo, la supervivencia de los probióticos se ve amenazada por los mecanismos de defensa que posee el propio aparato gastrointestinal, reduciendo la viabilidad de estos una vez ingeridos (14). Este fenómeno tiene lugar dada la existencia de ácidos,



enzimas, mucosas y otras barreras tanto físicas como químicas que dificultan la sobrevivencia de los probióticos en este conducto. Desde la boca hasta el colon, los compuestos se enfrentan a una variación de pH de un rango aproximado de 1 a 7 (Figura 1), un rango muy variado que supone la principal limitación en la supervivencia de microorganismos probióticos y su llegada en las concentraciones requeridas al intestino (15).



**Figura 1. Valores de pH del sistema gastrointestinal.** En la figura se muestran los valores de pH de los diferentes segmentos del aparato gastrointestinal. Elaboración Propia. Canales, N.; López N. 2021.

El tracto digestivo comienza con la cavidad oral, en ella, los niveles de pH están definidos por las secreciones de las glándulas salivales, estas participan en procesos bioquímicos y microbiológicos, además, brindan protección al esmalte dental. La secreción salival no estimulada tiene un pH que varía entre 6 y 6,5; debido al bicarbonato presente en

su composición. Cuando se estimula la secreción, aumenta la cantidad de este compuesto lo que genera un aumento de pH que varía entre 7,5 y 8 (16).

Luego de la ingestión de un probiótico, éste pasará rápidamente por el esófago alcanzando el estómago, en donde se espera ocurra la mayor pérdida de viabilidad de los microorganismos, pues en este lugar se encuentra la mayor concentración de ácidos, lo que además varía de acuerdo con la edad e ingestión de alimentos, razón por la cual el pH fluctúa entre 1 y 3 (17).

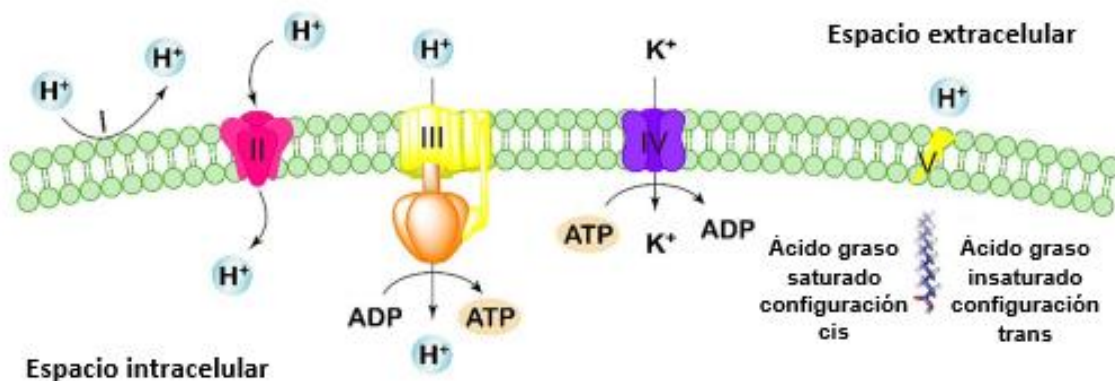
A continuación, estos ingresan al duodeno, en donde la acidez disminuye considerablemente alcanzando un nivel de pH cercano a 6. Este valor incrementa gradualmente a través del intestino delgado, alcanzando un valor de 7,4 en el íleon terminal. En esta sección se incluye un pool de proteínas proteolíticas y la secreción biliar. Las sales biliares son moléculas anfipáticas con actividad antimicrobiana que actúan como detergentes, producen daño a nivel de la membrana celular y en la estructura del ADN bacteriano (17, 18). A nivel de ciego ocurre una disminución de pH que alcanza valores cercanos a 5,7; sin embargo, estos aumentan nuevamente en el transcurso del intestino grueso, terminando con un pH 6,7 a nivel de recto (19).

A pesar de las condiciones adversas presentes en el sistema gastrointestinal, las BAL son microorganismos capaces de resistir a bajos niveles de pH. Se ha demostrado que cepas de *Lactobacillus sp.* son capaces de sobrevivir hasta 3 horas en pH 3 (gástrico), tiempo suficiente para llegar al sitio de acción en el intestino, considerando que la digestión a nivel estomacal tiene una duración aproximada de 2 horas (20). No obstante, cuando estas mismas cepas son expuestas a un pH 2, la viabilidad disminuye considerablemente, sobreviviendo tan solo durante 90 minutos en incubación, lo que puede conllevar una menor probabilidad de llegada al sitio de acción de los probióticos (21).

No se conoce con exactitud los mecanismos por los cuales las BAL son capaces de resistir a las condiciones ácidas del aparato gastrointestinal, sin embargo; este fenómeno se ha asociado a la homeostasis del pH y a bombas de protones (22).

Gracias a la producción de ácido láctico las BAL presentan un pH citoplasmático muy variante de 4,5-7,0; a este gradiente interno y externo al que se ven expuestas las células durante su paso por el sistema gastrointestinal, se le atribuye la capacidad de tolerancia a los ácidos, sin embargo; cuando el pH interno alcanza un valor umbral, las funciones celulares se inhiben y las células mueren (23, 24).

La homeostasis del pH consiste en la regulación del pH interno y externo (25) y es el resultado de interacciones entre múltiples sistemas de transporte, tal como se muestra en la Figura 2. Algunas bacterias mantienen un pH intracelular (pHi) relativamente estable y neutro en presencia de un pH extracelular (pHex) en constante cambio, no obstante; para lograr esto, deben consumir una alta cantidad de energía, lo que condiciona el crecimiento y multiplicación de las BAL (26). El pHi disminuye siempre que el pH del medio disminuya, sin embargo; el pHi siempre se mantiene en niveles más altos (27). Por ejemplo, se ha demostrado que *Streptococcus* generalmente acidifican el citoplasma desde un pH aproximado de 7,6 a 5,7 cuando el pHex es de 4,5 (28), mientras que *Lactobacillus*, por el contrario, toleran un pHi significativamente más ácido de 4,4 cuando el pHex es de 3,5 (23). A pesar de ello, una vez que el pHex alcanza un valor entre 1,0 y 2,5, el pHi disminuye drásticamente y se destruye la homeostasis del pH, lo que ocasiona daños en las proteínas y en el ADN, y las células finalmente mueren (27, 29).



**Figura 2. Mecanismos de tolerancia a los ácidos asociados con las membranas celulares y los sistemas de transporte de iones.** Las células microbianas mantienen la homeostasis del pH al restringir el flujo hacia adentro de protones a través de membranas celulares altamente impermeables (I) y modular el tamaño de los canales de membrana (II), desviando la afluencia de protones mediante la generación de gradientes quimiosmóticos a través de ATPasas de potasio (III), bombeando el exceso de protones salir del citoplasma a través de la bomba de protones (IV) y mantener la integridad y fluidez de las membranas celulares mediante la modulación de la composición de ácidos grasos (V). Tomado y adaptado de Guan, N. y Liu, L., (2020) (26).

Otro mecanismo por el cual las BAL pueden sobrevivir a condiciones adversas, tiene que ver con la capacidad de formar *biofilms*, los cuales constituyen una capa viscosa integrada por ADN, proteínas y polisacáridos. Este corresponde a la primera línea de defensa de las células y tiene la habilidad de soportar la disrupción ambiental. Se ha demostrado que la modificación de las propiedades físico-químicas del *biofilm* constituye una importante estrategia de supervivencia en muchos microorganismos.

Cuando las BAL se enfrentan a un ambiente con niveles bajos de pH, existe un aumento en la movilidad de la membrana y en la proporción de ácidos grasos insaturados, esto nos indica que un cambio en la fluidez del *biofilm*, en la distribución de ácidos grasos y

en la integridad de las células puede ser un potencial método utilizado por estas bacterias para mejorar su resistencia a los ambientes ácidos (22).

Otro de los mecanismos de resistencia descritos corresponde a la bomba de protones específicamente se hace referencia a la bomba  $F_1-F_0$  ATPasa que puede hidrolizar o sintetizar ATP intracelular a través de la proteína  $F_1$ , y transportar protones a través del complejo  $F_0$ . Esta bomba es un componente sustancial para la tolerancia de ácidos y su actividad está relacionada positivamente con la resistencia en BAL. Los niveles transcripcionales de ATP que codifican esta proteína en *L. acidophilus* se encontraron aumentados en un ambiente con bajo pH. De manera similar, en *L. rhamnosus* GG los niveles bajos de pH inducen la expresión de los genes de la bomba  $F_1-F_0$ -ATPasa. Las mutaciones de esta proteína llevan a una baja sobrevivencia de BAL en pH bajo (22).

Se ha evidenciado también, que cuando el pH citoplasmático disminuye, los mecanismos que protegen las moléculas biológicas mayores como el DNA se activan. Por ejemplo, la expresión del gen *uvrA* (que codifica la subunidad A del complejo exinucleasa ABX ultravioleta, que implica un mecanismo de reparación mediante escisión de nucleótidos) en *L. helveticus*, es inducida significativamente durante la adaptación de la cepa a un medio ácido. De manera similar, la radiación ultravioleta moderada (que activa la expresión del gen) mejoró la tolerancia a los ácidos en *Lactococcus lactis subespecie lactis*. Por lo tanto, se puede concluir que el gen *uvrA* y la reparación de nucleótidos por escisión cumplen funciones vitales en el proceso de reparación de ADN dañado por ácidos y le garantizan a la cepa una adaptación favorable frente a medios acidificados (22).

También existen procesos de neutralización, los que consisten en la producción de sustancias alcalinas como la urea, la arginina y el amonio, las cuales se encargan de neutralizar el ácido del ambiente. La ureasa por ejemplo que hidroliza la urea en dióxido de carbono y amonio, y el sistema arginina dihidrolasa que cataliza la conversión de arginina en

ornitina, amonio y dióxido de carbono. Este sistema presente en las BAL se conforma de 3 enzimas codificadas por el operón arcABC (30).

Realizando un estudio comparativo respecto a *Lactobacillus casei* Zhang, se observó que en su variante ácido-resistente ocurrió un aumento en los niveles intracelulares de aspartato y arginina en un ambiente acidificado. Durante este tipo de estrés el aspartato genera un flujo de metabolitos en vía de la biosíntesis de arginina. Eso indica que estas moléculas están relacionadas con la regulación de la resistencia contra ácidos en algunas cepas (22).

Otro sistema enzimático de resistencia es la fermentación maloláctica, realizada por miembros del género *Lactobacillus*, consiste en la descarboxilación de L-malato en L-ácido láctico, el dióxido de carbono liberado ayuda a neutralizar los protones del medio disminuyendo su concentración. Se ha demostrado que este proceso aumenta la sobrevivencia de *L. casei* en ambientes con pH 2,5 cuando se añade una cantidad de 30 mM de malato (22, 31).

Una vez que los probióticos alcanzan el duodeno, se ven enfrentados a la secreción biliar, esta es considerada como un importante factor protector del sistema digestivo frente a microorganismos exógenos, contiene de ácidos biliares conjugados, los que facilitan la digestión y absorción de lípidos mediante su emulsificación, y ácidos biliares libres, que se encargan de inhibir el crecimiento de diversos microbios (32). Su acción antimicrobiana se manifiesta al inducir daño en la membrana, mal plegamiento de las proteínas y daño en el ADN por *shock* oxidativo y una baja en el pH intracelular (33).

Es por ello por lo que, la tolerancia a estas sales se define como una propiedad necesaria para la sobrevivencia de las BAL, pues determina si podrán resistir su paso por el

intestino delgado y llegar al intestino grueso, en donde cumplirán su rol como probióticos (32).

Existen mecanismos de tolerancia a las sales biliares en respuesta a los diversos efectos que tienen estas sustancias en las células. Los ácidos biliares no conjugados como el ácido cólico pueden acumularse pasivamente en el citoplasma ya que pueden cruzar libremente la bicapa lipídica, esto lleva a una reducción del pH intracelular causando fuga de ciertos iones y componentes celulares, lo que tiene como resultado la muerte celular. Para combatirlos, las células tolerantes a la bilis tienen bombas de eflujo por extrusión para los ácidos biliares, además; en respuesta a los altos requerimientos energéticos que significan una situación de estrés, estas son capaces de modificar su metabolismo de azúcares, con el objetivo de producir más energía, y su estado *redox* (33).

Otros mecanismos de resistencia descritos para BAL se relacionan directamente con los niveles de pH intracelular alterados frente a la acción de sales biliares, el estudio de Sánchez y col., (2006) concluye que las cepas de *Bifidobacterium animalis* son capaces de tolerar estas condiciones al alterar sus patrones de fermentación de carbohidratos con la finalidad de producir ATP para lograr un flujo constante de protones al exterior de la célula a través de la bomba  $F_1-F_0$  ATPasa, de esta manera se regula el pH citoplasmático y se atenúa el daño celular (34).

A pesar de la existencia de estos mecanismos, se ha demostrado que resulta necesario reforzar su protección durante el paso por el sistema gastrointestinal, para garantizar un efecto beneficioso en el organismo que los consume.

Es por esto por lo que la encapsulación de BAL en matrices poliméricas supone una estrategia para mejorar la viabilidad de estos microorganismos, asegurando su llegada en las

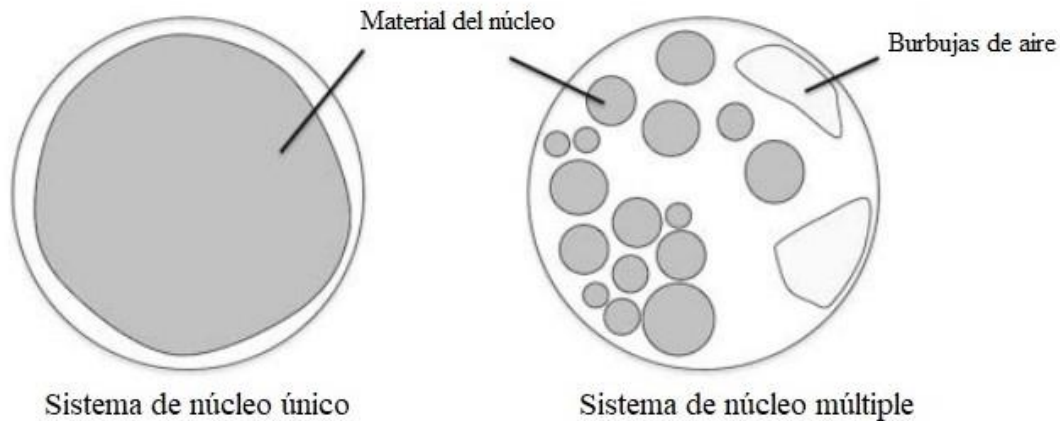
concentraciones suficientes para desencadenar su acción (35, 36). Esta es una alternativa que se viene aplicando hace bastantes años en materias de investigación, sin embargo; aún se requiere de muchos estudios para encontrar la mejor manera de proteger a los probióticos del ambiente externo y a la vez permitir su llegada al intestino.

## **4.2. Encapsulación de probióticos**

La encapsulación se define como la tecnología de empaquetamiento de sólidos, líquidos y gaseosos con materiales de recubrimiento de distinta naturaleza, para dar lugar a un producto sólido generalmente llamado cápsula o microcápsula, las que se describen como una membrana semipermeable, esférica, delgada y fuerte, con un diámetro que varía desde un par de micrómetros hasta milímetros (37), siendo capaces de liberar su contenido de manera controlada bajo la influencia de condiciones específicas (38). Para llevar a cabo este proceso es de suma importancia contar con una matriz polimérica, la cual debe cumplir con ciertos criterios como: no ser reactiva, no ser tóxica, ser biodegradable, biocompatible y altamente estable, de manera que proteja de manera íntegra al microorganismo del ambiente (39).

Las cápsulas pueden tener una forma redondeada o irregular, describiéndose superficies lisas o rugosas (40), además pueden estar constituidas por una membrana simple o poseer uno o varios núcleos como se observa en la Figura 3. También puede estar compuesta por una mezcla de uno o más polímeros o conformada por una matriz polimérica y recubierta de un material encapsulante distinto. Además de estas características, una de las más importantes es la insolubilidad en agua, puesto que deben mantener su estructura cuando son integradas en los alimentos como medio de protección probiótica frente a las condiciones del sistema gastrointestinal, todo esto sin evitar la liberación de los microorganismos (41).





**Figura 3. Posible disposición interna del material del núcleo encapsulado en una partícula de gel de alginato.** Tomado y adaptado de Ching y col., (2017) (42).

Actualmente, debido a la necesidad de mantener la viabilidad de los microorganismos probióticos, se han desarrollado diversos estudios para establecer qué materiales de encapsulación resultan ser los más adecuados para proteger y resistir las condiciones adversas de un sistema gastrointestinal.

Estas matrices poliméricas, también llamadas hidrogeles son redes hidrofílicas tridimensionales capaces de absorber grandes cantidades de agua, fluidos biológicos o moléculas. Estos polímeros pueden clasificarse dentro de dos grandes grupos; los polímeros sintéticos y los naturales, siendo una de las principales ventajas en el uso de soportes de tipo natural, la compatibilidad que existe entre el material y los tejidos fisiológicos (43). Desde el punto de vista de su naturaleza química pueden clasificarse como polímeros químicos reticulados a través de enlaces covalentes o iónicos y polímeros físicos, formados por interacciones físicas (44).

Hasta el momento las matrices poliméricas naturales que han sido estudiadas son quitosán, carragenán, celulosa, goma xantán, goma gellan y alginato, siendo este último por

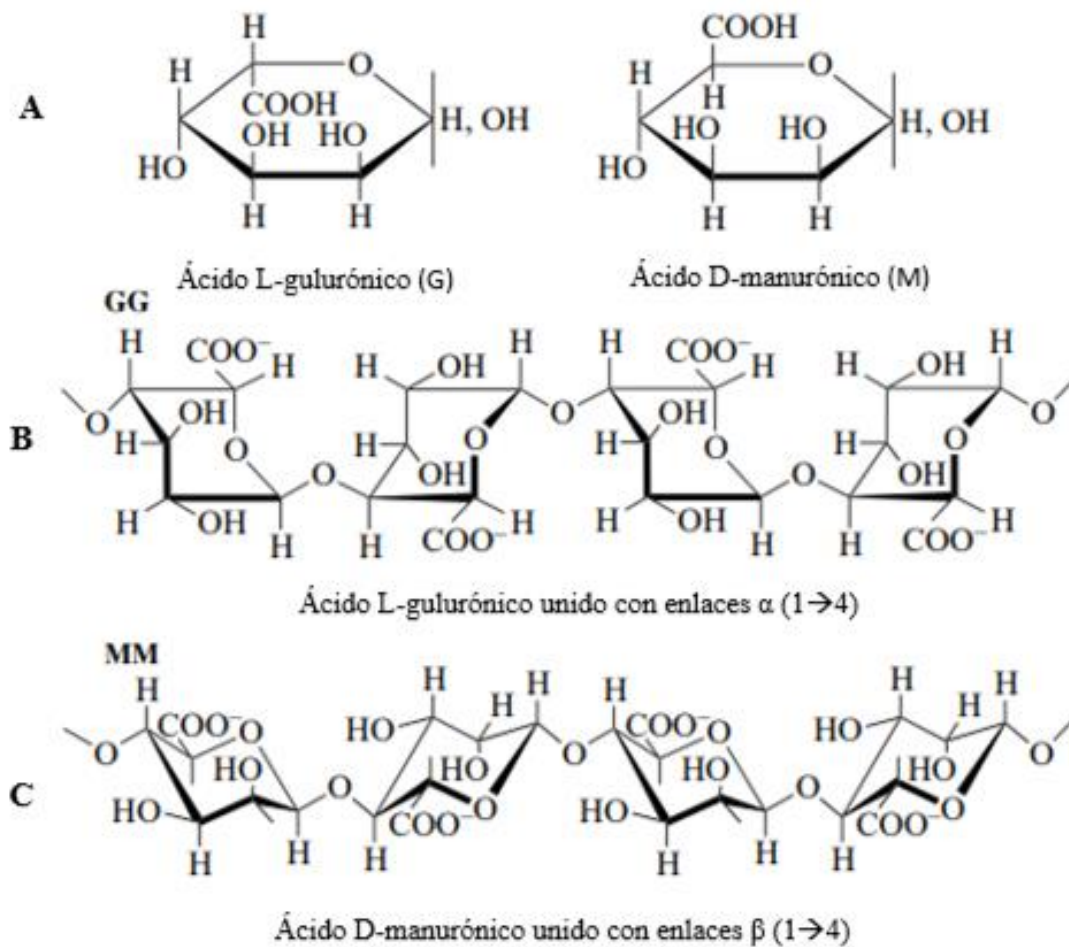
sus características no tóxicas, biocompatibles y con propiedades de entrecruzarse fácilmente con metales divalentes, el que ha sido más estudiado (45).

### **4.3. Encapsulación de probióticos en alginato por técnica de extrusión**

#### **4.3.1. Alginato**

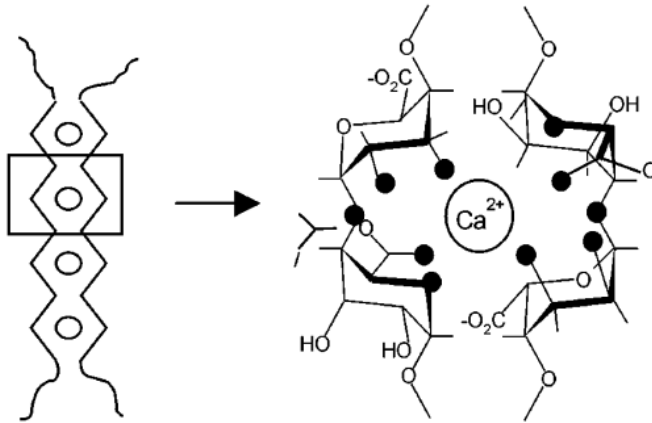
El alginato es un copolímero lineal polisacárido de origen natural, extraído a partir de algas marinas pardas de la clase *Phaeophyceae*, géneros *Macrocystis*, *Laminaria*, *Ascophyllum*, *Alaria*, *Ecklonia*, *Eisenia*, *Nereocystis*, *Sargassum*, *Cystoseira*, y *Fucus*. Sin embargo, solo dos especies, *Macrocystis porifera* y *Ascophyllum nodosum*, son las que proporcionan la mayor parte de la producción de este polímero (46). Además de ser extraído de algas, también es producido por ciertas bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas*, las que son capaces de sintetizar ácido algínico de manera extracelular como exopolisacárido (47).

El alginato es utilizado ampliamente en la industria de alimentos como agente encapsulante. Este polímero está compuesto por dos unidades monoméricas, que son el ácido D-manurónico (M) y ácido L-gulurónico (G) que se distribuyen en secciones constituyendo bloques de tipo G (-GGG-), tipo M (-MMM-) o heteropolímeros en los que los bloques M y G se alternan (-MGMG-) (48). Los bloques MM y MG se unen mediante enlaces glucosídicos de tipo  $\beta$ 1-4; mientras que los enlaces glucosídicos entre los bloques GG y MG son de tipo  $\alpha$ 1-4 (Figura 4) (46). Tanto la distribución de sus monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen de los grupos carboxílicos confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido de G (49).



**Figura 4. Estructura química del alginato y sus monómeros.** A) monómeros G y M. B) GG unidos por enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) C) MM unidos por enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Tomado y adaptado de Khotimchenko y col., (2001) (46).

El alginato es capaz de gelificar independientemente de la temperatura, lo que se puede lograr mediante dos métodos: reticulación iónica o precipitación por ácidos dando lugar a geles iónicos y geles ácidos respectivamente. El gel de alginato formado por reticulación iónica ocurre por medio de la unión del alginato con cationes divalentes, en donde el ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es el más empleado. La afinidad entre ellos está estrechamente relacionada con la cantidad de bloques G que contenga la solución de alginato (42). La visualización de la estructura física de esta reticulación es denominada modelo “caja de huevos” (Figura 5) (50).



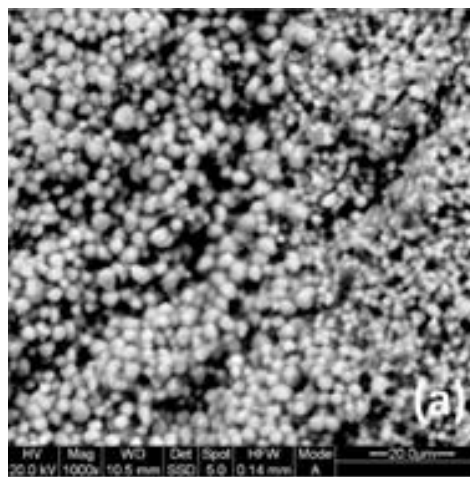
**Figura 5. Dibujo esquemático y coordinación de calcio del "modelo de caja de huevos".**

Se describe para el par de cadenas de guluronato en zonas de unión de Alginato de calcio. Los círculos negros representan el átomo de oxígeno involucrado en la coordinación del ion calcio. Tomado de Braccini, I. y Perez, S., (2001) (51).

La gelificación y reticulación del alginato conduce a hidrogeles con formas de perlas, las que pueden observarse fácilmente si el tamaño de ésta lo permite, sin embargo; es posible visualizar su características y morfología mediante microscopía electrónica de barrido, tal como se muestra en las Figuras 6 y 7.



**Figura 6. Estructura de una perla de alginato.** En la figura se muestra la estructura general de una perla de alginato puro con las células de *B. animalis subs. lactis* (BB-12) encapsuladas. Fotografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido. Tomado de Frakolaki y col., (2020). (40).



**Figura 7. Morfología de superficie de una perla de alginato.** En la figura se muestra la morfología de la superficie de una perla de alginato puro con las células *B. animalis subs. lactis* (BB-12) encapsuladas. Fotografía obtenida a través de microscopía electrónica de barrido. Tomado de Frakolaki y col., (2020) (40).

Por otra parte, los geles ácidos de alginato se forman cuando el pH de la solución desciende por debajo de la constante de disociación ( $pK_a$ ) del polímero, lo que reduce la repulsión electrostática entre las cadenas de polímero de alginato, permitiendo la unión por medio de enlaces de hidrógeno (52), esta situación puede darse de dos formas: de manera rápida o lenta. La disminución rápida del pH genera una precipitación de las moléculas de alginato formando agregados, mientras que una disminución progresiva permite formar geles en masa. Al igual que en los geles iónicos, la fuerza del gel está correlacionada con el contenido de bloques G en la cadena del polímero (42).

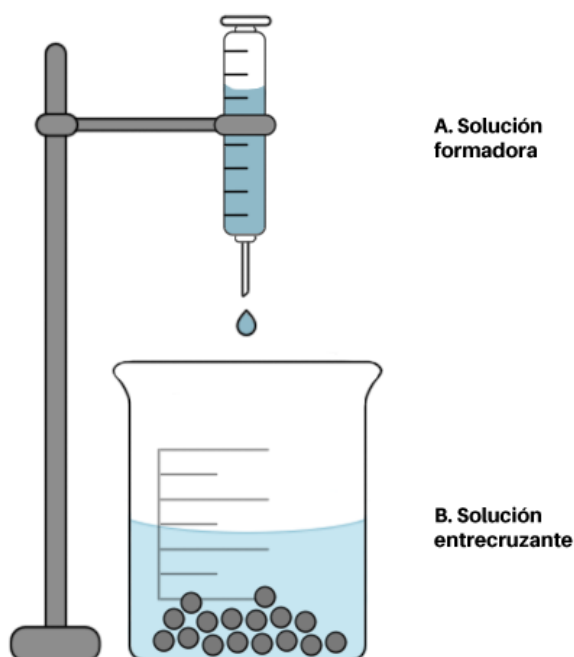
Este polímero ha sido ampliamente utilizado para la encapsulación de probióticos, con el objetivo de proteger a estas células de las adversas condiciones del tracto digestivo y para ello la técnica más utilizada para la gelificación de alginato ha sido la extrusión.

#### **4.3.2. Técnica de extrusión**

Existen diversas técnicas para la encapsulación de productos por medio de polímeros, y la elección de una de estas técnicas dependerá del material de encapsulación y de las propiedades físico-químicas que éste posea, además también dependerá del material o compuesto a encapsular considerando su aplicación final de tal manera de asegurar la biodisponibilidad de este. Asimismo, factores como la facilidad en la realización de la técnica y sus costos también son importantes al momento de elegir (53). Es por esto por lo que cuando la matriz polimérica corresponde a alginato y éste se pretende utilizar en la industria alimentaria para la encapsulación de productos bioactivos como las BAL, las posibilidades se reducen únicamente a tres mecanismos: encapsulación mediante secado por atomización, extrusión y emulsión, siendo estas últimas las más utilizadas en investigación (54).

La extrusión es la más ampliamente utilizada debido a su simplicidad, una de sus principales ventajas es su bajo costo en comparación con la emulsificación, la cual es más cara porque requiere materias primas adicionales como aceite vegetal y emulsionantes para estabilizar la emulsión (55).

La técnica de encapsulación mediante extrusión implica la combinación de las células bacterianas con una solución polimérica, cuyo resultado es liberado gota a gota a través de una jeringa o boquilla en una solución que contiene un agente entrecruzante, usualmente  $\text{CaCl}_2$  (55). Posteriormente se produce la gelificación de las gotas, lo que conduce a la formación de perlas poliméricas (Figura 8). El tamaño y la forma de las gotas dependen del diámetro de la jeringa y de la distancia entre la jeringa y la solución gelificante (54).



**Figura 8. Dibujo esquemático de polimerización mediante método de extrusión simple.**

A. solución formadora: dispuesta en la jeringa y compuesta por una solución polimérica y el principio activo. B. Solución entrecruzante: dispuesta en el vaso de precipitado y compuesta con solución, usualmente  $\text{CaCl}_2$  que permite la gelificación y formación de las perlas. Elaboración Propia. Canales, N.; López, N., 2021.

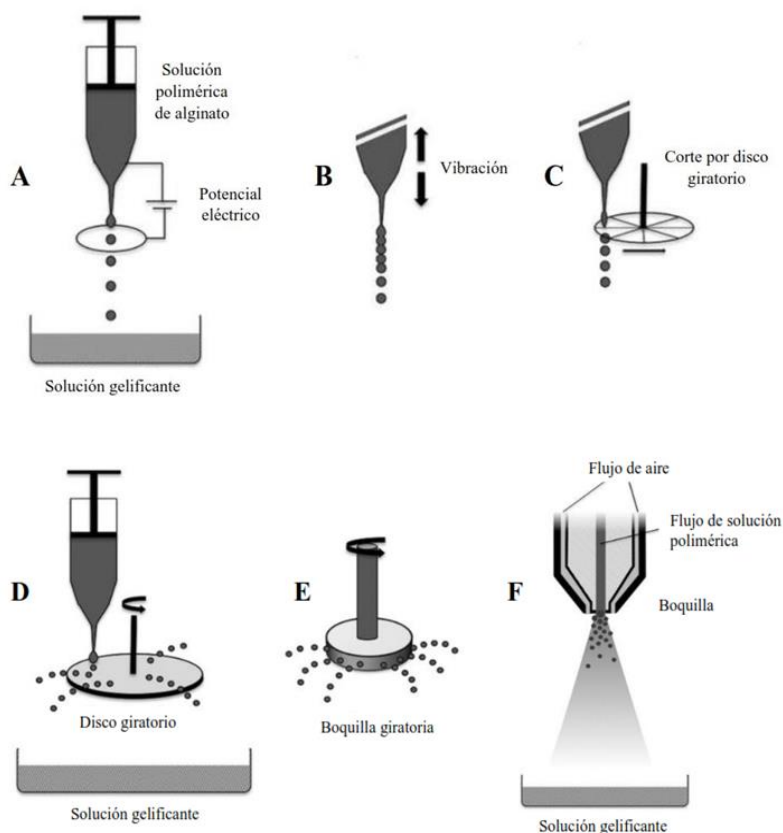
El método al ser simple, involucra condiciones que no ponen en riesgo la viabilidad celular, no obstante, al igual que cualquier técnica, la polimerización por extrusión cuenta con ciertas desventajas debido a que se trata de un proceso lento, en donde la formación de perlas o cápsulas a gran escala es ineficiente, asimismo, no existe la posibilidad de obtener microesferas de tamaño menor a 1000  $\mu\text{m}$  y además para la formación de éstas se requiere una solución polimérica de alginato de viscosidad moderada o baja, aunado a esto el procedimiento debe estar correctamente estandarizado en cuanto a la distancia desde donde se extruye las gotas de la solución de alginato y BAL, teniendo en cuenta una velocidad constante de goteo (42).

De acuerdo con el estudio realizado por Frakolaki y col., (2020) que tenía como objetivo definir los efectos de diversos agentes encapsulantes en la morfología de las perlas poliméricas y en la viabilidad de las células de *B. animalis subs. lactis* (BB-12), al utilizar alginato de sodio, de manera individual o en una mezcla con otro agente, y someterlo a la técnica de extrusión simple, se generan perlas poliméricas que tienen un diámetro promedio de entre 2-3 mm (40).

Debido a que la principal limitación de la técnica de extrusión simple es la imposibilidad de producir cápsulas de tamaño micrométrico, se han desarrollado diversas modificaciones para subsanar estas problemáticas. De esta manera surgen tres nuevas transformaciones en la metodología: extrusión por ruptura de chorro, por disco giratorio y finalmente extrusión por atomización (41). La primera de estas nuevas formas de extrusión se basa en la disposición laminar y constante de un chorro de solución polimérica por medio de una jeringa, el chorro es dividido en gotas más pequeñas gracias a atomización electrostática (Figura 9A), por medio de vibraciones (Figura 9B) o por un disco cuya finalidad es cortar el chorro de polímero (Figura 9C), permitiendo la caída de gotas más pequeñas a la solución gelificante. Por otra parte, existe la extrusión mediante disco giratorio en donde se dispone de un disco que gira a altas velocidades y cuya fuerza centrífuga permite la división de la solución polimérica en cientos de gotas de pequeño tamaño (Figura 9D), de

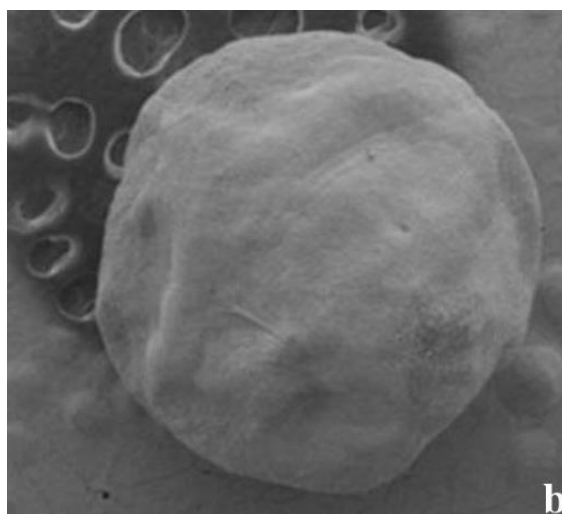


la misma forma puede existir una boquilla giratoria en lugar de un disco (Figura 9E). Finalmente, se dispone de la extrusión por atomización, variante que se basa en la disposición de un flujo de solución polimérica la cual es incidida por un alto flujo de aire, acción que conduce a la formación de pequeñas gotas de polímero y con ello la producción de cápsulas de tamaño micrométrico al entrar en contacto con la solución gelificante o entrecruzante (Figura 9F) (42, 56).

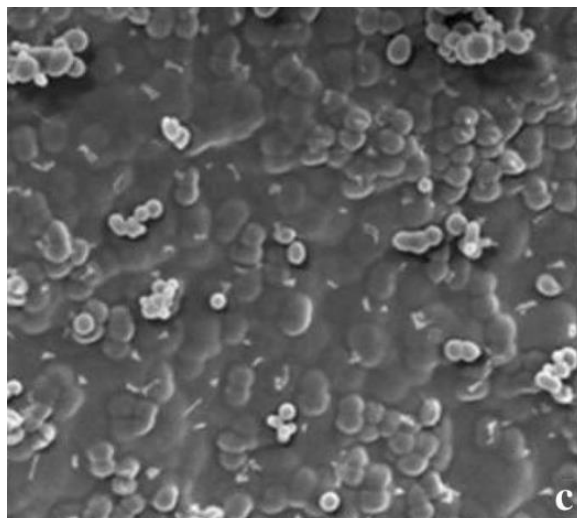


**Figura 9. Dibujo esquemático de los mecanismos modificados de extrusión.** A. Extrusión mediante atomización electrostática. B. Extrusión mediante vibración. C. Extrusión de corte por disco giratorio. D. Extrusión por disco giratorio. E. Extrusión por boquilla giratoria. F. Extrusión mediante atomización. Tomado y adaptado de Ching y col., (2017) (42).

En el estudio realizado por Kiran y col., (2015) y de acuerdo con el análisis morfológico de las cápsulas, se observó que estas eran uniformemente esféricas y de color blanco opaco (Figura 10). La estructura externa de las cápsulas reportadas se caracterizaron por poseer una superficie rugosa con un gran número células bacterianas (Figura 11) y cuyo diámetro variaba entre 1500 y 2000  $\mu\text{m}$  (57). Tamaños similares fueron reportado por Phoem y col., (2015), estudio en donde se obtuvieron perlas de alginato de sodio con *E. americana* mediante extrusión simple con diámetros de 1650 a 2050  $\mu\text{m}$  (58), estos resultados indican que el diámetro de las cápsulas poliméricas alcanzado mediante extrusión simple suele ser mayor a 1000  $\mu\text{m}$ .



**Figura 10. Estructura de una perla de alginato.** En la figura se muestra la estructura general de una perla de alginato puro con las células OZF encapsuladas. Fotografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido. Tomado de Kiran y col. (2015) (57, 58).



**Figura 11. Superficie de una perla de alginato.** En la figura se muestra la superficie de una perla de alginato puro con las células OZF encapsuladas. Fotografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido. Tomado de Kiran y col. (2015) (57).

Sin embargo; las cápsulas formadas mediante las diferentes metodologías de extrusión modificada pueden llegar a alcanzar tamaños menores a 500  $\mu\text{m}$  (41). La investigación realizada por Silva y col., (2016) ha demostrado que la técnica de extrusión por ruptura de chorro permite obtener perlas de alginato de sodio de menor tamaño, sin embargo; cuando éstas se encuentran húmedas poseen un tamaño que varía entre 1370 y 1480  $\mu\text{m}$ , diámetro que disminuye considerablemente hasta alcanzar un tamaño entre 710 y 860  $\mu\text{m}$  cuando las cápsulas se encuentran secas (59). Debido al secado, las perlas pierden agua, lo que ocasiona una disminución de tamaño, situación que también se ha evidenciado en el estudio realizado por Eckert y col., (2018) en donde mediante el método de extrusión por ruptura de chorro se obtuvieron perlas de alginato con un tamaño cercano a 160  $\mu\text{m}$ , el cual disminuyó a 100  $\mu\text{m}$  tras el secado (60).

El método de extrusión por disco giratorio es escasamente utilizado, sin embargo; se ha reportado en la literatura, la investigación realizada por Zhou y col., (2018) utilizó un sistema de procesamiento de partículas ultrafinas cuya metodología de extrusión

correspondió a un disco giratorio, sistema con el cual obtuvieron microcápsulas de pequeño tamaño (20-100  $\mu\text{m}$ ) posterior al secado por liofilización (61).

La técnica de extrusión por atomización se ha utilizado en investigación. Se han reportado diámetros de  $97,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$  en perlas de alginato y alginato-quitosán, así como también diámetros levemente inferiores con una media de  $72 \mu\text{m}$  en microcápsulas de alginato con aceite de girasol (62, 63). En la Tabla 1 se muestran los diferentes tamaños de perlas de alginato alcanzados por las diferentes técnicas reportadas en la literatura.

**Tabla 1:** Diámetro de cápsulas de alginato reportado en la literatura de acuerdo con los diferentes métodos de extrusión.

<b>Método de extrusión</b>	<b>Material de encapsulación</b>	<b>Tamaño de las cápsulas (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Referencias</b>
Extrusión simple	Alginato de sodio	1500-2000	(57)
	Alginato de sodio con extracto de <i>E. americana</i>	1650- 2050	(58)
Extrusión por ruptura de chorro	Alginato de sodio	710-860	(59)
	Alginato de sodio con pectina	100	(60)

---

Extrusión por disco giratorio	Alginato de sodio	20-100	(61)
Extrusión por atomización	Alginato de sodio y Alginato-quitosán	97,1 ± 0,4	(62)
	Alginato de sodio con aceite de girasol	$\bar{x} = 72,04$	(63)

---

Fuente: Elaboración propia

#### **4.4. Probióticos encapsulados en matrices de alginato por técnicas de extrusión y análisis de supervivencia en su paso por el SGI**

Se ha evidenciado que la exposición de probióticos encapsulados en perlas de alginato a fluidos gástricos e intestinales, si bien aumenta la viabilidad celular con respecto a células libres, no es suficiente para alcanzar las concentraciones en el sitio de acción. Un estudio realizado por Frakolaki y col., (2020) sugiere que la red porosa de las perlas compuestas de alginato se comporta como un escudo débil para las células probióticas BB-12 frente a la exposición a fluidos gástricos simulados (FGS) durante un tiempo de 90 minutos a pH 2 y a fluidos intestinales simulados (FIS) durante 30 minutos a pH 5, ambos a una temperatura constante de 37 °C, esto ocurre debido a que el alginato pierde su resistencia mecánica a través del tiempo, además de llevar a la pérdida del material encapsulado desde el núcleo hacia el exterior durante el almacenamiento, lo que finalmente reduce su efecto protector (40). Esta situación supone una limitación y a la vez un desafío a resolver en términos de investigación.

Debido a todas las problemáticas antes expuestas, es que a continuación se analizarán críticamente los estudios sobre la supervivencia de probióticos encapsulados mediante técnicas de extrusión en matrices de alginato y se revisará aquellos estudios de liberación de estos microorganismos en condiciones simuladas de un sistema gastrointestinal.

Un estudio llevado a cabo por Zeashan y col., (2020), que tenía como objetivo evaluar la viabilidad y estabilidad de probióticos libres y encapsulados bajo condiciones gastrointestinales simuladas, utilizó una cepa de *Lactobacillus acidophilus* y la sometió a encapsulación con alginato de sodio al 2%, un aislado de proteína de soya al 2% y una combinación de ambos en razón 1:1. Se realizaron dos diseños experimentales, uno que evaluaba la resistencia a los medios ácidos y otro que evaluaba la resistencia de las perlas en dos compartimentos simulados del sistema gastrointestinal (64).

En primer lugar, se evaluó la viabilidad de las perlas poliméricas tras ser sometidas a niveles de pH 2,3 y 6,5 durante una incubación de 3 horas a 37 °C. Los resultados muestran que a pH 2, la encapsulación con alginato aumenta la viabilidad de  $2,3 \pm 0,12$  log CFU a  $6,1 \pm 0,31$  log CFU, respecto a las células libres. Lo mismo ocurre a pH 3 donde los valores suben de  $3,5 \pm 0,18$  log CFU a  $6,9 \pm 0,35$  log CFU. En segundo lugar, se evaluó la viabilidad de las perlas poliméricas tras ser sometidas a dos compartimentos que simulaban el ambiente gástrico, con un jugo de pH 2,5 y otro que simulaba el ambiente intestinal, con un jugo de pH 7,5; que además incluía sales biliares. En este caso el ensayo se realizó a 37 °C por un tiempo de 100 minutos, evaluando la viabilidad cada 25 minutos. Los resultados indican que, en un ambiente gástrico al minuto 100, la encapsulación con alginato aumenta la viabilidad de  $3,5 \pm 0,18$  log CFU a  $7,05 \pm 0,35$  log CFU, respecto a las células libres. Lo mismo ocurre en un ambiente intestinal, donde los valores aumentan de  $3,5 \pm 0,18$  log CFU a  $7,05 \pm 0,35$  log CFU (64).

Respecto a la encapsulación con un aislado de proteína de soya, los resultados eran levemente mayores a los de alginato en todos los ensayos, sin embargo, ambos eran menores a los obtenidos tras utilizar una combinación de alginato y proteína de soya. Esta sugiere que la eficacia del alginato puede ser mejorada al utilizar otro compuesto encapsulante en conjunto (64).

Estudios han indicado que la encapsulación de probióticos puede ser mejorada aún más al introducir sustancias prebióticas (almidón resistente, inulina o fructooligosacáridos) o crioprotectores (glicerol) en la mezcla encapsulante (40), así como también se pueden usar mezclas de alginato y otros polímeros (65).

La supervivencia de las bacterias probióticas durante su paso por el SGI depende en gran medida de la cepa, es por esto por lo que, una de las principales consideraciones es seleccionar el microorganismo adecuado. Asimismo, es de gran importancia poder generar los criterios adecuados para la selección del o los materiales encapsulantes y concentración de estos (66).

Los estudios de supervivencia se realizan en condiciones fisiológicas simuladas, en donde se expone a las BAL encapsuladas principalmente a soluciones gástricas con pepsina y cloruro de sodio ajustadas a pH 1-3 con ácido clorhídrico (HCl), así también, se exponen a soluciones intestinales en donde el principal componente son las sales biliares y pancreatina ajustando el pH en rangos entre 7,4-7,5 (57, 67).

Para analizar el número de bacterias viables generalmente se realiza un recuento bacteriano por medio de la técnica de siembra en placa. Esto se lleva a cabo tomando una muestra inicial de los probióticos encapsulados o no encapsulados y tomando alícuotas a través del tiempo de exposición de los probióticos y/o al final del ensayo, el recuento de

Unidades formadoras de colonias permite calcular el porcentaje de supervivencia alcanzada (57, 67, 68).

Se ha demostrado, por ejemplo, que *Lactobacillus ramosus* microencapsulados en una matriz de alginato han mantenido su viabilidad por más de 48 horas a un pH 2, mientras que por el contrario, las células libres sin encapsular fueron inactivadas, aun encontrándose en las mismas condiciones (69). Asimismo, microorganismos probióticos como *Lactobacillus gasseri* y *Bifidobacterium bifidum* encapsulados en una matriz de alginato recubiertos con otro tipo de polímero como el quitosán (polímero polisacárido de origen natural) mejora la viabilidad celular al enfrentarlas a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal (70). De la misma manera se ha demostrado que bacterias ácido lácticas microencapsuladas en una matriz de alginato suplementado con glucosa y con recubrimiento de quitosán obtuvieron una mejora significativa de la viabilidad celular en condiciones simuladas de un sistema gastrointestinal *in vitro*, en donde las células bacterianas se expusieron a bajos niveles de pH durante un período de 2 horas, en comparación con la viabilidad de células no encapsuladas y de células encapsuladas pero sin recubrimiento de quitosán bajo condiciones de ensayo similares (71).

Iyer y Kailasapathy (2005) encontraron que las células probióticas *L. acidophilus* CSCC 2400 co-encapsuladas con quitosán y almidón poseen una mayor supervivencia frente a una incubación en ácido y sales biliares durante 3 horas a pH 2, en comparación a la misma cepa encapsulada en alginato solo, los autores asumieron que los granos de almidón insolubles en agua podrían bloquear los poros de las cápsulas y, por lo tanto, reducir la difusión del ácido en la red, lo que permite una mejora en la supervivencia (72).

Un estudio realizado *in vivo* de la supervivencia de la levadura *Saccharomyces boulardii* en microcápsulas de alginato con y sin recubrimiento de quitosán indicó que el 13,3% de la levadura no recubierta y el 9% de la levadura recubierta ingerida eran viables en



las heces de rata después de 6 horas de administración de las cápsulas, mientras que solo el 2% de las células libres sobrevivían. El mismo estudio *in vitro* no obtuvo resultados estadísticamente significativos en cuanto a la supervivencia de la levadura recubierta y no recubierta, por lo que el estudio concluyó que el recubrimiento de microesferas con quitosano no proporciona ningún beneficio adicional para la sobrevivencia del microorganismo (73). No obstante, un estudio realizado por Lee y col., (2019) demostró que *L. acidophilus* encapsulados en alginato (ALG), alginato-quitosán (ALG-CHI) y células libres no presentan una disminución en la viabilidad cuando son expuesta a fluidos salivales simulados durante 2 minutos a 37 °C y con un pH neutro (7,0), sin embargo; al ser expuestas a FGS durante tiempos de 1 y 2 horas, a 37 °C y a pH 1,5; la supervivencia de los probióticos encapsulados en ALG, ALG-CHI y células libres disminuyó aunque no con significancia estadística, no obstante; tras 120 minutos de incubación hubo un descenso significativo en la viabilidad de células libres con una tasa de sólo 46,5% mientras que las células encapsuladas con alginato y alginato-quitosán mostraron 63% y 81,6% de supervivencia, respectivamente (62).

Resultados similares fueron reportados por Chavarri y col., (2010), en donde la supervivencia celular después de la exposición a FGS (pH 2) durante 5 min fue del 95%, 94%, 78% y 66% de la población inicial dispuesta en las cápsulas de alginato recubiertas de quitosano con *B. bifidum*, *L. gasseri*, *L. gasseri* libre y *B. bifidum* libre, respectivamente. Tras 120 minutos de exposición, solo las células de *B. bifidum* y *L. gasseri* encapsuladas fueron resistentes al medio ácido, manteniendo su concentración en más de  $10^7$  UFC/mL. No obstante, la viabilidad de las células libres de *B. bifidum* y *L. gasseri* se redujo considerablemente al ser expuestos a FIS a pH 6 durante 120 minutos, sin embargo; la célula más susceptible a la solución de sales biliares fue *B. bifidum*, por el contrario, la supervivencia de las bacterias microencapsuladas después de la exposición a FIS durante 120 minutos fue del 98,86% y el 96,72% de la población inicial encontrada en *L. gasseri* y *B. bifidum* encapsulados con alginato y recubrimiento con quitosán, respectivamente (70), sugiriendo que las microesferas de alginato recubiertas de quitosán son más efectivas para proteger las bacterias probióticas de las sales biliares presentes en los fluidos intestinales, el efecto protector de este polímero sucede debido a una reacción de intercambio iónico cuando

las perlas absorben la sal biliar (74), por lo que la difusión de la sal biliar en las perlas puede ser limitada, lo que evita la interacción de los probióticos encapsulados con la sal biliar. El quitosán, forma una membrana semipermeable alrededor de un polímero cargado negativamente como el alginato. Esta membrana no se disuelve en presencia de quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  o agentes antigelizantes y, por lo tanto, mejora la estabilidad del gel y proporciona una barrera a la liberación celular (75).

La segunda fase del estudio realizado por Lee y col., (2019) permitió evaluar la supervivencia de las combinaciones ALG y ALG-CHI durante una exposición la fase gástrica simulada, en las condiciones anteriormente mencionadas, con tiempos de 0, 1 y 2 hrs. y también la fase intestinal simulada frente a un pH 6,5 en diferentes tiempos (0, 2 y 4 hrs.), los resultados de esta parte del estudio permitieron corroborar que las tasas de supervivencia del probiótico *L. acidophilus* son mayores cuando este es encapsulado en una matriz polimérica de ALG-CHI y es expuesto a FGS y FIS durante tiempos diferentes (62), tal como se muestra en la Tabla 2. Este estudio contradice los resultados obtenidos para el estudio *in vivo* de *S. boulardii* en heces de rata.

**Tabla 2.** Número de células encapsuladas y libres después de la exposición a SGF y SIF.

Fase gástrica (h)	Fase intestinal (h)	Células libres (Log UFC/g)	Células encapsuladas (Log UFC/g)	
			Alginato	Alginato/Quitósán
0	0	9.44 ± 0.56 <sup>Aa</sup>	9.24 ± 0.67 <sup>Aa</sup>	9.25 ± 0.58 <sup>Aa</sup>
		(100%)*	(100%)	(100%)
		<hr/>		
1	0	7.21 ± 1.13 <sup>Ba</sup>	7.86 ± 0.79 <sup>Ba</sup>	7.98 ± 0.75 <sup>Ba</sup>
		(76.4%)	(85.1%)	(86.3%)
	2	5.44 ± 0.40 <sup>Ca</sup>	6.18 ± 0.91 <sup>Ca</sup>	6.46 ± 0.51 <sup>CDa</sup>
<hr/>				
2	0	4.32 ± 0.42 <sup>CDc</sup>	5.93 ± 0.66 <sup>Cb</sup>	7.53 ± 0.83 <sup>BCa</sup>
		(45.7%)	(64.2%)	(81.4%)
	2	2.96 ± 0.42 <sup>Db</sup>	3.78 ± 0.96 <sup>Dab</sup>	4.50 ± 0.30 <sup>Ea</sup>
<hr/>				

4	$2.31 \pm 0.86^{\text{Db}}$	$3.45 \pm 0.30^{\text{Dab}}$	$3.79 \pm 0.61^{\text{Ea}}$
	(24.4%)	(37.3%)	(40.9%)

---

A-E Letras diferentes dentro del mismo tratamiento (células encapsuladas y libres) son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

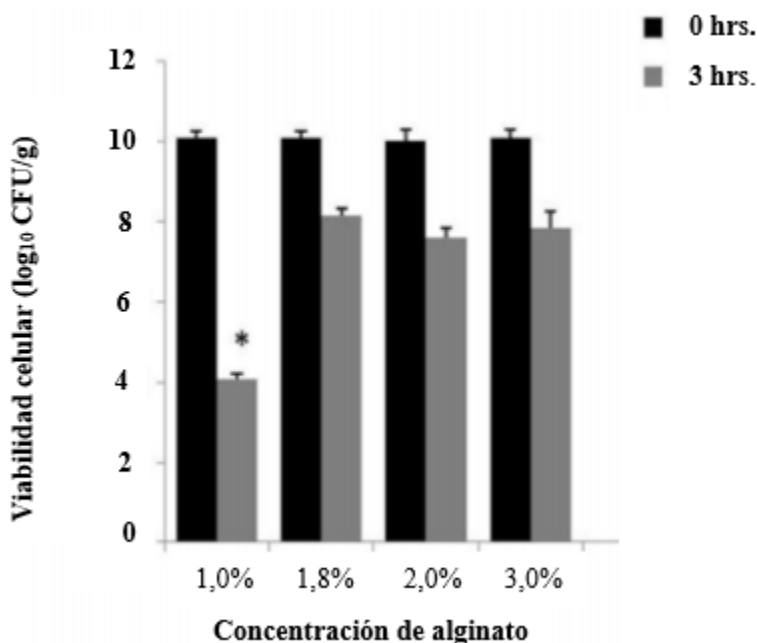
a-c Letras diferentes con el mismo tiempo de exposición son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

\* El porcentaje entre paréntesis significa la tasa de supervivencia en comparación con el número inicial de células. Tomado y adaptado de Lee y col., 2019 (62).

Se ha descrito en la literatura una concentración óptima de polímero encapsulante para la supervivencia de los probióticos en condiciones gástricas, esta se compone de alginato de sodio al 3%, pues ha demostrado ser eficiente en la mantención de la sobrevivencia de los probióticos (66). No obstante, estudios realizados por Haghshenas y col., (2015) reportan una tasa de supervivencia cercana a 37% al someter a bajos niveles de pH cepas de *L. plantarum* 15HN en matrices de alginato a diferentes concentraciones. De las concentraciones utilizadas las que proporcionaron mejores tasas de supervivencia estuvieron compuestas por alginato al 2%, alginato al 1,5% más *Psyllium* al 0,5% y alginato al 1,5% más fenogreco al 0,5% respectivamente (67). Por otro lado, también se han reportado tasas de supervivencia superiores al 58% en formulaciones compuestas por alginato y *Psyllium* en diferentes proporciones como agentes encapsulante de *L. acidophilus*, esto luego de su exposición a ácidos durante 2 horas (76).

Resultados similares a los anteriormente descritos obtuvo Kiran y col., (2015) cuyo estudio tenía como objetivo conocer los efectos de la concentración alginato, del cloruro de sodio y el tiempo de gelificación en la mejoría de la estabilidad de las cápsulas en condiciones de un SGI simulado. Como resultados se obtuvo que la viabilidad de las células encapsuladas

y sometidas a pH 2 durante 3 horas, mejoró significativamente al utilizar una concentración al 1,8% de alginato de sodio, mientras que una concentración al 0,75% condujo a la falta de uniformidad de las cápsulas y la concentración de alginato superior al 2% provocó el bloqueo de la boquilla utilizada para el método de extrusión, por el contrario, las células no encapsuladas presentaron una pérdida total de la viabilidad (Figura 12) (57).



**Figura 12. Efectos de la concentración de alginato como agente encapsulante para mejorar la viabilidad de *Pediococcus pentosaceus* OZF en condiciones gástricas simuladas.** (pH 2,0 durante 3 h; \*P < 0,05). Tomado y adaptado de Kiran, y col., (2015). (57).

Resultados semejantes se obtuvieron en otro estudio, en donde las tasas de supervivencia de *E. durans* IW3 encapsuladas en alginato al 1%, 1,5% y 2% fueron de 76%, 78% y 84%, respectivamente, resultados que indican que el alto porcentaje de alginato (2%) es capaz de mantener la capacidad de supervivencia de los probióticos de mejor forma que el bajo porcentaje (1%) (77). No obstante, estudios realizados por López y col., (2017)

sugieren que mayores recuentos de células viables de *L. rhamnosus* se obtienen a menores concentraciones de alginato, de esta forma concentraciones al 1% p/v de alginato permiten obtener mayores recuentos bacterianos posterior al almacenamiento mayor a 120 días, lo que está dado principalmente por el aumento de la viscosidad del polímero lo que dificulta el trabajo de encapsulación (78). Esta discrepancia entre los resultados de ambas investigaciones puede estar dada por la naturaleza de la investigación, si bien una evalúa la viabilidad de bacterias posterior a la exposición a condiciones simuladas del SGI, la segunda permite conocer las concentraciones adecuadas para el almacenamiento de probióticos encapsulados durante un tiempo prolongado, situación que también conlleva una pérdida de microorganismos. Por otra parte, la cepa utilizada como bioactivo en la investigación realizada por Nami y col., (2016) correspondió al probiótico *E. durans* IW3, del cual se describe en la literatura que presentan una baja viabilidad celular en condiciones de exposición severa a ácidos y sales biliares, por lo que se puede inferir que la utilización de alginato como agente encapsulante en concentraciones cercanas al 2% pueden mejorar significativamente la supervivencia celular bajo condiciones de ensayo (77) en contraste con los resultados descritos en la literatura para el microorganismo probiótico *L. rhamnosus* utilizado en la investigación realizada por Lopes y col., (2017), el cual evidencia una adaptabilidad óptima en condiciones de bajo pH y en presencia de sales biliares (78, 79).

Además de las concentraciones de alginato, se debe tener en cuenta otros parámetros en la mantención de la viabilidad bacteriana, factores como la suplementación con agentes proteicos, lipídicos o carbohidratos, las condiciones de almacenamiento de las cápsulas, así como también el recubrimiento de estas perlas de alginato con una segunda capa de otro polímero, pueden conllevar a una mejora en la supervivencia probiótica en mayor o menor medida.

Uno de los diversos estudios de encapsulación realizados demuestra la efectividad en la utilización de alginato como agente encapsulante respecto a probióticos libres, sin embargo; destacan la importancia en el recubrimiento de éstas con una segunda capa de

biopolímero, un ejemplo de ello es la investigación realizada por Varankovich y col., (2017) en donde se evaluó la supervivencia de dos tipos de especies probióticas: *L. rhamnosus* y *L. helveticus*, las cuales fueron encapsuladas en alginato y suplementadas con proteínas de guisante (PA), así como también se encapsularon en alginato, suplementadas con proteína de guisante y recubiertas con quitosán (PAC). Estas perlas poliméricas fueron expuestas a condiciones de un ambiente gástrico simulado. Tanto las cápsulas PA y PAC con las especies bacterianas encapsuladas fueron sometidas a fluidos estomacales simulados durante 2 horas y posteriormente se expusieron a líquidos intestinales simulados durante un periodo de 3 horas. Los resultados fueron concluyentes, las microcápsulas de PAC proporcionaron una protección significativamente mejor, con una disminución en los recuentos viables de solo 0,7 log UFC/g en comparación con una disminución de 1,5 log UFC/g en las microcápsulas de PA después de la prueba (80).

Por otro lado, Liao y col., (2019) demostraron la efectividad en la coencapsulación de probióticos con oligosacáridos, para ello encapsularon la cepa probiótica *Lactobacillus fermentum* L7 en perlas de alginato solo y perlas de alginato con los oligosacáridos: galactooligosacáridos (GEC), isomaltooligosacáridos (IEC), fructooligosacáridos (FEC) y xilooligosacáridos (XEC). Posteriormente, sometieron las diferentes cápsulas y las células libres durante 120 minutos en FGS a pH 2,5 y luego durante 120 minutos a pH 7,4. Los resultados indicaron una disminución sucesiva en la supervivencia de las células libres tras la exposición a los fluidos gastrointestinales, mientras que se obtuvo una supervivencia mayor de probióticos en las cápsulas de alginato solo tras una exposición de 4 horas, no obstante, la supervivencia de las células encapsuladas con los oligosacáridos fue marcadamente mayor, demostrándose una mejor capacidad protectora en la composición de alginato y FEC, seguido de XEC, IEC y finalmente GEC, respectivamente (81).

La mayoría de los oligosacáridos se hidrolizan en la parte superior del tracto gastrointestinal, sin embargo, algunos oligosacáridos presentan propiedades fisicoquímicas específicas y resisten al proceso digestivo, alcanzando el colon en donde pueden ser

metabolizados por las bacterias probióticas presentes, entre ellas *Lactobacillus* (82, 83). Por lo que, además de la función de protección, los oligosacáridos atrapados en la pared de la cápsula también podrían proporcionar fuentes de carbono selectivas para *Lactobacillus* e incluso promover la proliferación de las células de la cepa L7 (84, 85).

Resultados similares obtuvieron Wu y Zhang, (2018) en su estudio en el cual evaluaron los efectos de la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en cápsulas compuestas de alginato alginato y arabinóxilano (86), oligosacárido compuesto de xilosa y arabinosa, que además puede tener fracciones más bajas de manosa, galactosa, glucosa y ácidos ferúlico, glucurónico y fítico (87). Al exponer la cepa bacteriana a FGS a pH 2 durante 60 y 120 minutos y a FIS pH 6,8 durante 4 horas, se evidenció una notable mejora tanto en la eficiencia de la encapsulación como en la resistencia a las sales biliares por parte de las células (88), lo que se sustenta en la mayor resistencia a la hidrólisis ácida por parte de este oligosacárido, lo que le confiere mayores ventajas respecto a otros como la inulina (89).

De la misma manera, se evaluó la viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG libres y encapsuladas en cuatro distintas formulaciones: alginato de calcio, alginato con poli-L-lisina, alginato de calcio suplementado con prebiótico isomaltooligosacárido (IMO) y alginato de calcio con IMO, las formulaciones fueron sometidas a FGS a pH 2 durante un tiempo máximo de 2 horas y luego a FIS a pH 6,8. Se observó que la viabilidad de las células libres y las encapsuladas en las distintas formulaciones disminuyeron a lo largo de la digestión gastrointestinal con las viabilidades más bajas presentadas por las células libres, puesto que posterior a una incubación durante una hora en FIS ya no se observaron células viables (90), lo que demostró que *L. rhamnosus* GG tenían una alta sensibilidad hacia la condición gastrointestinal simulada (91, 92). Por el contrario, todas las células probióticas encapsuladas en las diferentes formulaciones tuvieron una tasa de supervivencia mayor a las células libres, sin embargo; se evidenció que estas formulaciones, las perlas de alginato solo sin prebiótico es la menos efectiva para mejorar la tolerancia al ácido de la cepa probiótica, lo que puede explicarse por la superficie porosa de las cápsulas de alginato que permiten que



el FGS logre ingresar a las cápsulas, afectando la supervivencia de las células (90, 93). La formulación de alginato y poli-L-lisina presentó una tasa de supervivencia mayor respecto a alginato solo, lo que indica que la presencia de recubrimiento con poli-L-lisina en las perlas puede preservar la viabilidad de las células bacterianas en fluidos gástricos, puesto que la adición de la lisina permite reducir la porosidad de las cápsulas de alginato lo que aumenta la integridad física de la matriz encapsulante (94, 95). Las formulaciones de alginato-IMO mantuvo la supervivencia en al menos un 70%, lo que permite evidenciar que el isomaltooligosacárido es capaz de proteger a la cepa de *L. rhamnosus* GG tras la incubación en FGS, ya que puede servir como fuente de carbono para las cepas bacterianas (90), lo que también ha sido demostrado por otros estudios (29, 96).

Las condiciones de almacenamiento de las perlas también influye en los ensayos de viabilidad, pues se ha demostrado que posterior a un almacenamiento de 9 semanas a diferentes temperaturas, a distintas condiciones atmosféricas (con y sin vacío) y ulterior a un ensayo bajo las mismas condiciones gástricas simuladas *in vitro*, mencionadas con anterioridad, la viabilidad celular con un almacenamiento a 4 °C es significativamente mejor en relación al almacenamiento a temperatura ambiente, con pérdidas en los recuentos de células viables de 1,3 y 1,9 log UFC/g con y sin vacío, respectivamente (80). Bajo estas mismas condiciones la adición de un recubrimiento de quitosán a las microcápsulas conduce a una viabilidad celular significativamente mejorada, en donde diversos estudios han reportado que no se observan pérdidas en los recuentos de células viables después del tratamiento con jugos gástrico e intestinales simulados en muestras almacenadas a diferentes temperaturas o condiciones atmosféricas (80, 97).

En una segunda parte del estudio realizado por Kiran y col., (2015) cuyo objetivo era encontrar el polímero más apropiado como material encapsulante, se evaluó y comparó la viabilidad de las células OZF luego de ser encapsuladas en alginato, recubiertas con distintos biopolímeros y sometidas al sistema gastrointestinal simulado *in vitro*. Las combinaciones resultantes correspondieron a: Alginato (ALG), alginato con lactulosa (LAC), doble capa de

alginato, alginato con suero, alginato con poli-L-lisina, siendo estos últimos dos reforzados con una tercera capa de alginato de sodio al 0,1%, y finalmente alginato con quitosán (57).

Respecto a las cápsulas no recubiertas, las células OZF libres perdieron su viabilidad completamente mientras que la encapsulación con alginato elevó este valor de 0 a  $5,05 \pm 0,11$  log. La adición de LAC a las cápsulas de alginato aumentó la viabilidad en  $1,1 \pm 0,17$  log. Respecto a las cápsulas recubiertas, las formadas por alginato con suero y alginato con poli-L-lisina, presentaron valores de  $6,45 \pm 0,11$  y  $6,65 \pm 0,25$ ; respectivamente. Sin embargo, se destaca la utilización de quitosán debido a la baja pérdida de viabilidad, de alrededor de 1,4 log, y demostrando proveer una mejor protección para las células OZF que el alginato, el suero y la poli-L-lisina (57).

#### **4.5. Liberación de BAL encapsuladas en matrices de alginato**

En las matrices poliméricas basadas en alginato la liberación del producto encapsulado o principio activo es liberado mediante difusión o erosión desde el núcleo hacia el exterior. La difusión se torna más fácil para aquellos agentes de bajos pesos moleculares, los que pueden difundir libremente disminuyendo la eficiencia en la encapsulación, mientras que la liberación mediante erosión ocurre cuando existe una desintegración en la superficie de la cápsula, lo cual puede estar dado por diferentes situaciones (42).

La desintegración de geles de alginato puede ocurrir a pH alto o en presencia de quelantes de cationes como EDTA y citrato, cuando esto sucede la matriz de alginato se hincha debido a la disociación de la matriz de gel causada por el intercambio iónico del catión gelificante con iones de  $\text{Na}^{2+}$  del medio ambiente (98). Los materiales del núcleo se liberan a medida que el gel se hincha debido a la reducción de la densidad de reticulación, esta liberación ocurre rápidamente a medida que la matriz de gel se erosiona (99).

Para la evaluación de la tasa de liberación de bacterias probióticas desde perlas de alginato se deben incubar las perlas en una solución, dependiendo del estudio, esta puede ser un tampón, soluciones gástricas o intestinales simuladas, todo bajo ciertas condiciones de pH, temperatura y agitación, para luego tomar muestras de la solución y realizar un conteo de las unidades bacterianas liberadas, este proceso generalmente se realiza por medio de la metodología de vertido en placa (67, 77, 100).

Un estudio realizado por Nami y col., (2017) indicó que los probióticos *E. durans* IW3 fueron liberados a mayor velocidad cuando éstos se encontraban encapsulados en una matriz de alginato con goma arábiga o en una matriz de alginato con extracto de *Psyllium* y eran expuestos a FIS, esto se evidenció en la aparición de células liberadas transcurridos 60 minutos desde la exposición, en comparación con la liberación de los probióticos encapsulados únicamente en alginato, cuya liberación se evidenció transcurridos 90 minutos bajo las mismas condiciones (77). Esta situación de rápida liberación de células en cápsulas de alginato con goma arábiga y alginato con extracto de *Psyllium* puede deberse a erosión por hinchamiento.

Otra investigación realizada por Kaewland y col., (2017) estudió la capacidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsuladas en alginato con proteína aislada de cacahuete de bambara (BGPI) para liberarse de las cápsulas cuando éstas eran expuestas a FIS a pH 7 durante un total de 4 horas. Después de 30 min de exposición, se liberaron ~6,4 log UFC/mL de células viables y continuaron alcanzando ~8,0 log UFC/mL durante un período de 4 horas (101). La liberación de células probióticas de las cápsulas en FIS puede explicarse por el aumento en la degradación de las cápsulas probióticas debido a la presencia de  $\text{NaHCO}_3$  y pancreatina. Se ha evidenciado que el  $\text{Na}^+$  de  $\text{NaHCO}_3$  es capaz de actuar como un agente anti-gelificante que causa la interrupción en la red de alginato-calcio, mientras que la enzima proteasa podría hidrolizar parcialmente BGPI y provocar la ruptura de la cápsula, lo que ocasiona la mayor liberación de probióticos desde la matriz polimérica (75).

Según Barros y col., (2015) al someter *L. casei* liofilizadas encapsuladas en perlas poliméricas conformadas por alginato-lactosa recubiertas mediante el sistema de recubrimiento entérico seco Acryl-Eze® a una fase con FGS a pH 1,8 durante 2 horas, los probióticos son retenidos en la matriz, sin embargo; cuando estos son transferidos a FIS a pH 7, se produce un desintegración de la esfera dando una liberación explosiva de células viables después de 1 hora, para luego aumentar lenta y moderadamente durante las siguientes 3 horas. Lo que indica que la liberación de microorganismos probióticos sucede en el paso desde el entorno gástrico al entorno intestinal sin afectar la viabilidad de estas. No obstante, cuando *L. casei* se encuentra sin recubrimiento esta evidencia los mismos patrones de liberación respecto de las recubiertas, sin embargo; no protege totalmente las células, evidenciando una pérdida de la viabilidad celular durante el tránsito gastrointestinal (102).

Tal como se evidenció en la presente revisión bibliográfica, la encapsulación con alginato permite proteger a las BAL del pH ácido presente en los fluidos gástricos y de la acción de las sales biliares presentes en los fluidos intestinales, sin embargo; la viabilidad en muchas ocasiones no alcanza las concentraciones adecuadas para asegurar la llegada de los probióticos a nivel intestinal, por lo que se sugiere el recubrimiento con otro polímero o el uso de prebióticos. A continuación, se presenta en la Tabla 3 los efectos del material encapsulante y fluidos gástricos simulados en la supervivencia de probióticos reportados por diferentes autores.

**Tabla 3.** Efectos del material encapsulante y fluidos gástricos simulados en la supervivencia de probióticos.

BAL encapsulada	Metodología de extrusión	Material de encapsulación	Tamaño de cápsulas ( $\mu\text{m}$ )	pH		% Supervivencia*	Referencias
				FGS	FIS		
<i>L. acidophilus</i>	Extrusión por ruptura de chorro	Alginato (1,5%) con isomaltooligosacárido (3,0%)	622,00 $\pm$ 87,4	2	7,5	60,92	(103)
<i>L. acidophilus</i>	Extrusión por atomización	Alginato de sodio (1%), quitosán (0,4%) y almidón	70,4	1,8	7,5	64	(104)
<i>L. casei shirota</i>	Extrusión simple	Alginato de sodio 0,5%	1290 $\pm$ 320	2	7,2	78,97	(105)
		Alginato de sodio 1%	1340 $\pm$ 280			80,80	
		Alginato de sodio 1,5%	1500 $\pm$ 260			80,79	
		Alginato de sodio 2%	1560 $\pm$ 280			82,80	
		Alginato de sodio 2,5%	1630 $\pm$ 300			84,91	
		Alginato de sodio 3%	1790 $\pm$ 270			80,03	
<i>L. rhamnosus</i>	Extrusión por ruptura de chorro	Alginato con extracto de poroto negro	715,44 $\pm$ 13,05	2	7,4	79,88 $\pm$ 0,71	(106)
<i>L. plantarum</i>	Extrusión simple	Alginato de sodio y leche desnatada	1553	2,5	7,5	83,25	(107)

		Alginato de sodio y dextrina	1583			67,36	
		Alginato de sodio y quitosán	1492			80,96	
		Alginato de sodio y proteína de suero desnaturalizada	1635			62,52	
<b><i>L. plantarum</i></b>	Extrusión simple	Alginato de sodio (2%)	1860	3	7	89,6	(108)

\*Porcentaje de supervivencia tras la exposición a FGS y posteriormente a FIS.

Fuente: Elaboración propia.

## 5. CONCLUSIONES

Los probióticos presentan mecanismos que les otorgan cierto nivel de tolerancia a medios ácidos y a la acción de sales biliares, sin embargo, su larga exposición a estos ambientes durante el proceso de digestión significa una sobrecarga y trae como consecuencia el daño de biomoléculas importantes para la sobrevivencia de las células bacterianas, como el ADN. Con la finalidad de protegerlos, se han realizado estudios de encapsulación en alginato, los cuales han demostrado mejorar la sobrevivencia de los probióticos hasta llegar a su sitio de acción.

La técnica de extrusión es una metodología simple que con ciertas modificaciones permite generar perlas poliméricas con las características morfológicas requeridas para su utilización en los procesos de encapsulación de probióticos, todo esto por un bajo costo.

Los estudios analizados sugieren que la encapsulación con alginato es insuficiente para la protección de los probióticos debido a sus propias características, una medida correctiva planteada es la utilización de otros polímeros, naturales e inocuos para el ser humano, en combinación con el alginato, esto permite mantener la viabilidad de las células a través del sistema gastrointestinal y a la vez, que estas sean liberadas de manera adecuada.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Elie M. The prolongation of life; optimistic studies. . 1 ed. New York & London G.P. Putnam's Sons; 1908.
2. Kaufmann SHE. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nature Immunology*. 2008;9(7):705-12.
3. Ozen M, Dinleyici EC. The history of probiotics: the untold story. *Beneficial Microbes*. 2015;6(2):159-65.
4. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 1965;147(3659):747-8.
5. FAO, OMS. Probiotics in Food, Health and Nutritional Properties and guidelines for evaluation. Roma; 2006. Contract No.: 92-5-105513-0.
6. Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. *American Journal of Gastroenterology*. 2000;95(1 Suppl):S2-4.
7. Abdolalipour E, Mahooti M, Salehzadeh A, Torabi A, Mohebbi SR, Gorji A, et al. Evaluation of the antitumor immune responses of probiotic *Bifidobacterium bifidum* in human papillomavirus-induced tumor model. *Microbial Pathogenesis*. 2020;145:104207.
8. De Champs C, Maroncle N, Balestrino D, Rich C, Forestier C. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a Probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(3):1270-3.
9. Rowland I, Capurso L, Collins K, Cummings J, Delzenne N, Goulet O, et al. Current level of consensus on probiotic science--report of an expert meeting--London, 23 November 2009. *Gut Microbes*. 2010;1(6):436-9.
10. Heredia-Castro PY, Hernandez-Mendoza A, Gonzalez-Cordova AF, Vallejo-Cordova B. Bacteriocins of lactic acid bacteria: mechanisms of action and antimicrobial activity against pathogens in cheese. *Interciencia*. 2017;42(6):340-6.
11. Parra-Huertas R. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2010;8:93-105.



12. Define régimen de control sanitario para productos en formas farmacéuticas orales, elaborados con *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. y otros bacilos específicos, (2018).
13. Nualkaekul S, Cook MT, Khutoryanskiy VV, Charalampopoulos D. Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Research International*. 2013;53(1):304-11.
14. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001;73(2):386S-92S.
15. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*. 2012;162(1):56-67.
16. Gésime Oviedo JM, Merino Lavado RL, Briceño Caveda EN. Influencia del PH en las relaciones microbianas de la cavidad bucal. Revisión bibliográfica. *Acta Odontológica Venezolana*. 2014; 52. Available from: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2014/2/art-21/>.
17. Pawar VK, Meher JG, Singh Y, Chaurasia M, Reddy BS, Chourasia MK. Targeting of gastrointestinal tract for amended delivery of protein/peptide therapeutics: Strategies and industrial perspectives. *Journal of Controlled Release*. 2014;196:168-83.
18. Merritt ME, Donaldson JR. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *Journal of Medical Microbiology*. 2009;58(12):1533-41.
19. Fallingborg J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish Medical Bulletin*. 1999;46(3):183-96.
20. Malagelada JR, Longstreth GF, Summerskill WHJ, Go VLW. Measurement of gastric functions during digestion of ordinary solid meals in man. *Gastroenterology*. 1976;70(2):203-10.
21. Fernandez MF, Boris S, Barbes C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 2003;94(3):449-55.
22. Wang C, Cui YH, Qu XJ. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Archives of Microbiology*. 2018;200(2):195-201.
23. Kashket ER. Bioenergetics of lactic-acid bacteria - cytoplasmic pH and osmotolerance. *Fems Microbiology Letters*. 1987;46(3):233-44.

24. Hutkins RW, Nannen NL. PpH homeostasis in lactic-acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 1993;76(8):2354-65.
25. Baker-Austin C, Dopson M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends In Microbiology*. 2007;15(4):165-71.
26. Guan NZ, Liu L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020;104(1):51-65.
27. Wu CD, Zhang J, Chen W, Wang M, Du GC, Chen J. A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;93(2):707-22.
28. Bender GR, Thibodeau EA, Marquis RE. Reduction of acidurance of streptococcal growth and glycolysis by fluoride and gramicidin. *Journal of Dental Research*. 1985;64(2):90-5.
29. Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(6):3060-7.
30. Arena ME, de Nadra MCM, Munoz R. The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: structural and functional study of the arcABC genes. *Gene*. 2002;301(1-2):61-6.
31. Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V, Steele JL. Physiological and Transcriptional Response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress. *Journal of Bacteriology*. 2010;192(9):2445-58.
32. Kurdi P, Kawanishi K, Mizutani K, Yokota A. Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(5):1979-86.
33. Amund OD. Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 2016;62(9):715-25.
34. Sanchez B, Reyes-Gavilan CGD, Margolles A. The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance. *Environmental Microbiology*. 2006;8(10):1825-33.

35. Corbo MR, Bevilacqua A, Gallo M, Speranza B, Sinigaglia M. Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*: Performances and in vivo applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2013;18:196-201.
36. de Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkema J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 2010;20(4):292-302.
37. Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 2007;18(5):240-51.
38. Champagne CP, Fustier P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007;18(2):184-90.
39. Chantawongvuti R, Veerajetbodithat J, Jaturapiree P, Muangnapoh C. Immobilization of *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 on Loofa Sponge Coated with Chitosan for Lactic Acid Fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010;20(1):110-6.
40. Frakolaki G, Giannou V, Topakas E, Tzia C. Effect of various encapsulating agents on the beads' morphology and the viability of cells during BB-12 encapsulation through extrusion. *Journal of Food Engineering*. 2021;294:10.
41. Ramos PE, Cerqueira MA, Teixeira JA, Vicente AA. Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018;58(11):1864-77.
42. Ching SH, Bansal N, Bhandari B. Alginate gel particles-A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017;57(6):1133-52.
43. Hunt JA, Chen R, van Veen T, Bryan N. Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014;2(33):5319-38.
44. Yu L, Ding JD. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews*. 2008;37(8):1473-81.
45. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Sada A, Orlando P. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*. 2009;1(3):319-23.

46. Khotimchenko YS, Kovalev VV, Savchenko OV, Ziganshina OA. Physical–Chemical Properties, Physiological Activity, and Usage of Alginates, the Polysaccharides of Brown Algae. *Russian Journal of Marine Biology*. 2001;27(1):S53-S64.
47. Draget KI, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. Alginates from Algae. In *Biopolymers Online*. 2005.
48. Fischer FG, Dörfel H. Die Polyuronsäuren der Braunalgen (Kohlenhydrate der Algen I). 1955;302(Jahresband):186-203.
49. Santacruz I, Gutierrez CA, Nieto MI, Moreno R. Application of alginate gelation to aqueous tape casting technology. *Materials Research Bulletin*. 2002;37(4):671-82.
50. Morris ER, Rees DA, Thom D, Boyd J. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerization process in alginate gelation. *Carbohydrate Research*. 1978;66(OCT):145-54.
51. Braccini I, Perez S. Molecular basis of Ca<sup>2+</sup>-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*. 2001;2(4):1089-96.
52. Draget KI, Stokke BT, Yuguchi Y, Urakawa H, Kajiwara K. Small-angle x-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 3. Alginic acid gels. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1661-8.
53. Pal K, Paulson AT, Rousseau D. CHAPTER 16 - Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems. In: Kasapis S, Norton IT, Ubbink JB, editors. *Modern Biopolymer Science*. San Diego: Academic Press; 2009. p. 519-57.
54. Dong QY, Chen MY, Xin Y, Qin XY, Cheng Z, Shi LE, et al. Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 2013;48(7):1339-51.
55. Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*. 2012;4(1):149-63.
56. Kailasapathy K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2002;3(2):39-48.
57. Kiran F, Mokrani M, Osmanagaoglu O. Effect of Encapsulation on Viability of *Pediococcus pentosaceus* OZF During Its Passage Through the Gastrointestinal Tract Model. *Current Microbiology*. 2015;71(1):95-105.

58. Phoem AN, Chanthachum S, Voravuthikunchai SP. Preparation of Eleutherine americana-Alginate Complex Microcapsules and Application in Bifidobacterium longum. *Nutrients*. 2015;7(2):831-48.
59. Silva MP, Tulini FL, Ribas MM, Penning M, Favaro-Trindade CS, Poncelet D. Microcapsules loaded with the probiotic *Lactobacillus paracasei* BGP-1 produced by co-extrusion technology using alginate/shellac as wall material: Characterization and evaluation of drying processes. *Food Research International*. 2016;89:582-90.
60. Eckert C, Agnol WD, Dalle D, Serpa VG, Maciel MJ, Lehn DN, et al. Development of alginate-pectin microparticles with dairy whey using vibration technology: Effects of matrix composition on the protection of *Lactobacillus* spp. from adverse conditions. *Food Research International*. 2018;113:65-73.
61. Zhou HB, Li SY, Chen Y, Zhang Q, Bai XQ, Zhu CN, et al. Evaluation of *Streptococcus thermophilus* IFFI 6038 Microcapsules Prepared Using an Ultra-fine Particle Processing System. *Aaps Pharmscitech*. 2018;19(3):1020-8.
62. Lee Y, Ji YR, Lee S, Choi MJ, Cho Y. Microencapsulation of Probiotic *Lactobacillus acidophilus* KBL409 by Extrusion Technology to Enhance Survival under Simulated Intestinal and Freeze-Drying Conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;29(5):721-30.
63. Castro-Rosas J, Gómez-Aldapa CA, Chávez-Urbiola EA, Hernández-Bautista M, Rodríguez-Marín ML, Cabrera-Canales ZE, et al. Characterisation, storage viability, and application of microspheres with *Lactobacillus paracasei* obtained by the extrusion technique. *International Journal of Food Science & Technology*. 2021;56(4):1809-17.
64. Zeashan M, Afzaal M, Saeed F, Ahmed A, Tufail T, Anjum FM. Survival and behavior of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated human gastrointestinal and technological conditions. *Food Science & Nutrition*. 2020;8(5):2419-26.
65. Chew SC, Tan CP, Long K, Nyam KL. In-vitro evaluation of kenaf seed oil in chitosan coated-high methoxyl pectin-alginate microcapsules. *Industrial Crops and Products*. 2015;76:230-6.
66. Rokka S, Rantamaki P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*. 2010;231(1):1-12.

67. Haghshenas B, Abdullah N, Nami Y, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN using alginate-psyllium-fenugreek polymeric blends. *Journal of Applied Microbiology*. 2015;118(4):1048-57.
68. Yasmin I, Saeed M, Pasha I, Zia MA. Development of Whey Protein Concentrate-Pectin-Alginate Based Delivery System to Improve Survival of *B. longum* BL-05 in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2019;11(2):413-26.
69. Ozer B, Kirmaci HA, Senel E, Atamer M, Hayaloglu A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*. 2009;19(1):22-9.
70. Chavarri M, Maranon I, Ares R, Ibanez FC, Marzo F, Villaran MD. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2010;142(1-2):185-9.
71. D'Orazio G, Di Gennaro P, Boccarusso M, Presti I, Bizzaro G, Giardina S, et al. Microencapsulation of new probiotic formulations for gastrointestinal delivery: in vitro study to assess viability and biological properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99(22):9779-89.
72. Iyer C, Kailasapathy K. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of Food Science*. 2005;70(1):M18-M23.
73. Graff S, Hussain S, Chaumeil JC, Charrueaul C. Increased intestinal delivery of viable *Saccharomyces boulardii* by encapsulation in microspheres. *Pharmaceutical Research*. 2008;25(6):1290-6.
74. Murata Y, Toniwa S, Miyamoto E, Kawashima S. Preparation of alginate gel beads containing chitosan salt and their function. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999;176(2):265-8.
75. Smidsrod O, Skjakbraek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*. 1990;8(3):71-8.

76. Esmailzadeh J, Nazemiyeh H, Maghsoodi M, Lotfipour F. Evaluation of the Effect of Psyllium on the Viability of *Lactobacillus Acidophilus* in Alginate- Polyl Lysine Beads. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2016;6(3):337-43.
77. Nami Y, Haghshenas B, Khosroushahi AY. Effect of psyllium and gum Arabic biopolymers on the survival rate and storage stability in yogurt of *Enterococcus durans* IW3 encapsulated in alginate. *Food Science & Nutrition*. 2017;5(3):554-63.
78. Lopes S, Bueno L, De Aguiar F, Finkler C. Preparation and characterization of alginate and gelatin microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosus*. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*. 2017;89(3):1601-13.
79. Succi M, Tremonte P, Reale A, Sorrentino E, Grazia L, Pacifico S, et al. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Fems Microbiology Letters*. 2005;244(1):129-37.
80. Varankovich N, Martinez MF, Nickerson MT, Korber DR. Survival of probiotics in pea protein-alginate microcapsules with or without chitosan coating during storage and in a simulated gastrointestinal environment. *Food Science and Biotechnology*. 2017;26(1):189-94.
81. Liao N, Luo BL, Gao J, Li XJ, Zhao ZX, Zhang Y, et al. Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnology Letters*. 2019;41(2):263-72.
82. Mussatto SI, Mancilha IM. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2007;68(3):587-97.
83. Swennen K, Courtin CM, Delcour JA. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2006;46(6):459-71.
84. Kaplan H, Hutkins RW. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(6):2682-4.
85. Weaver LT. Improving infant milk formulas: near the end of the trail for the holy grail? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2003;36(3):307-10.
86. Wu Y, Zhang GY. Synbiotic encapsulation of probiotic *Lactobacillus plantarum* by alginate-arabinoxylan composite microspheres. *LWT - Food Science and Technology*. 2018;93:135-41.

87. Swennen K, Courtin CM, Lindemans G, Delcour JA. Large-scale production and characterisation of wheat bran arabinoxylooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006;86(11):1722-31.
88. Wu Y, Zhang GY. Synbiotic encapsulation of probiotic *Lactobacillus plantarum* by alginate -arabinoxylan composite microspheres. *Lwt-Food Science and Technology*. 2018;93:135-41.
89. Broekaert WF, Courtin CM, Verbeke K, Van de Wiele T, Verstraete W, Delcour JA. Prebiotic and Other Health-Related Effects of Cereal-Derived Arabinoxylans, Arabinoxylan-Oligosaccharides, and Xylooligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011;51(2):178-94.
90. Siang SC, Wai LK, Lin NK, Phing PL. Effect of added prebiotic (Isomalto-oligosaccharide) and Coating of Beads on the Survival of Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Science and Technology*. 2019;39:601-9.
91. Burgain J, Gaiani C, Cailliez-Grimal C, Jeandel C, Scher J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: Influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2013;19:233-42.
92. Li C, Wang CL, Sun Y, Li AL, Liu F, Meng XC. Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG by Transglutaminase Cross-Linked Soy Protein Isolate to Improve Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and Yoghurt. *Journal of Food Science*. 2016;81(7):M1726-M34.
93. Shori AB. Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *HAYATI Journal of Biosciences*. 2017;24(1):1-5.
94. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2012;37(1):106-26.
95. Ding W. Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. In: Shah NP, editor.: Institute for Sustainability and Innovation; 2008.
96. Soto C. Effect of isomalto-oligosaccharide and gentio-oligosaccharide on the growth and fatty acid profile of *Lactobacillus plantarum*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2013; 16:[8 p.]. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-34582013000400008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582013000400008&lng=en&nrm=iso)>.

ISSN

0717-3458.



97. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 2004;14(8):737-43.
98. Kikuchi A, Kawabuchi M, Watanabe A, Sugihara M, Sakurai Y, Okano T. Effect of Ca<sup>2+</sup>-alginate gel dissolution on release of dextran with different molecular weights. *Journal of Controlled Release*. 1999;58(1):21-8.
99. Murata Y, Maeda T, Miyamoto E, Kawashima S. Preparation of chitosan-reinforced alginate gel beads — effects of chitosan on gel matrix erosion. *International Journal of Pharmaceutics*. 1993;96(1):139-45.
100. Mandal S, Puniya AK, Singh K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*. 2006;16(10):1190-5.
101. Kaewiad K, Kaewnopparat N, Faroongsarng D, Wungsintaweekul J, Kaewnopparat S. Statistical optimization of bambara groundnut protein isolate-alginate matrix systems on survival of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG. *AIMS Microbiology*. 2017;3(4):713-32.
102. de Barros JMS, Lechner T, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV, Edwards AD. Enteric coated spheres produced by extrusion/spheronization provide effective gastric protection and efficient release of live therapeutic bacteria. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;493(1-2):483-94.
103. Chan L, Pui L. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* 5 with isomalto-oligosaccharide. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*. 2020; 1.
104. de Araújo Etchepare M, Raddatz GC, de Moraes Flores ÉM, Zepka LQ, Jacob-Lopes E, Barin JS, et al. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT - Food Science and Technology*. 2016;65:511-7.
105. Gul O, Dervisoglu M. Application of multicriteria decision technique to determine optimum sodium alginate concentration for microencapsulation of *Lactobacillus casei*

Shirota by extrusion and emulsification. *Journal of Food Process Engineering*. 2017;40(3):e12481.

106. How YH, Hubert C, Pui LP. Encapsulation of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG with black bean extract in alginate-pectin microcapsules Malaysia, 2021.

107. Mahmoud M, Abdallah NA, El-Shafei K, Tawfik NF, El-Sayed HS. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Heliyon*. 2020;6(3):e03541.

108. Valero-Cases E, Frutos MJ. Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;64(2):824-8.