



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

**CONTROL DE pH INTERNO DE MICROCÁPSULAS PARA
LA PROTECCIÓN DE PROBIÓTICOS ANTE
CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS



Presenta:

IRENE MARGARITA ARENALES SIERRA

Bajo la supervisión de: CONSUELO S. O. LOBATO CALLEROS, DRA.



Chapingo, Estado de México, a junio de 2019

**CONTROL DE pH INTERNO DE MICROCÁPSULAS PARA LA PROTECCIÓN
DE PROBIÓTICOS ANTE CONDICIONES GASTROINTESTINALES
SIMULADAS**

Tesis realizada por **Irene Margarita Arenales Sierra** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTORA:



Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros

ASESOR:



Dr. Hugo Espinosa Andrews

ASESORA:



Dra. Landy Hernández Rodríguez

**CONTROL DE pH INTERNO DE MICROCÁPSULAS PARA LA PROTECCIÓN
DE PROBIÓTICOS ANTE CONDICIONES GASTROINTESTINALES
SIMULADAS**

Tesis realizada por **Irene Margarita Arenales Sierra** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTORA:

Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros

ASESOR:

Dr. Hugo Espinosa Andrews

ASESORA:

Dra. Landy Hernández Rodríguez

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
DEDICATORIAS.....	ix
AGRADECIMIENTOS.....	x
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xi
RESUMEN GENERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Agentes bioactivos.....	5
2.1.1. Agentes bioactivos susceptibles a pH.....	5
2.1.2. Probióticos.....	7
2.2. Condiciones gastrointestinales adversas para probióticos.....	9
2.3. Sistemas de protección de probióticos.....	10
2.3.1. Materiales de pared.....	12
Alginato.....	13
2.6. Referencias.....	15

3. USO DE BASES INORGÁNICAS EN HIDROGELES PARA LA PROTECCIÓN DE AGENTES BIOACTIVOS SUCEPTIBLES A pH: REVISIÓN/USE OF INORGANIC BASES IN HYDROGELS FOR THE PROTECTION OF pH SENSITIVE BIOACTIVE AGENTS: A REVIEW.....	20
3.1. Resumen.....	20
3.2. Abstract.....	21
3.3. Introducción.....	22
3.4. Encapsulación como protección de bioactivos sensibles a pH.....	24
3.4.1. Bioactivos susceptibles a pH.....	26
3.5. Uso de bases orgánicas.....	27
3.5.1. Matrices y bases orgánicas usadas para controlar el pH en microsistemas alimenticios.....	27
3.5.2. Efecto antibacterial de bases orgánicas.....	30
3.6 Conclusión.....	31
3.7. Agradecimientos.....	31
3.8. Referencias.....	32
4. INCREMENTO DE LA VIABILIDAD DE <i>L. casei</i> CON CÁPSULAS DE ALGINATO-Mg(OH)₂ EN CONDICIONES GÁSTRICAS SIMULADAS/ CALCIUM ALGINATE BEADS LOADED WITH Mg(OH)₂ IMPROVE <i>L. casei</i> VIABILITY UNDER SIMULATED GASTRIC CONDITION.....	40
4.1. Resumen.....	40
4.2. Abstract.....	41
4.3. Introducción.....	42
4.4. Materiales y métodos.....	44

4.4.1. Materiales.....	44
4.4.2. Cultivo de bacterias y preparación del concentrado celular.....	45
4.4.3. Variaciones de cápsulas.....	45
4.4.4. Mediciones de textura.....	45
4.4.5. Microscopía electrónica de barrido.....	46
4.4.6. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR).....	47
4.4.7. Análisis termogravimétrico.....	47
4.4.8. Viabilidad de <i>L. casei</i> encapsulado en jugo gástrico simulado.....	47
4.4.9. Mediciones de tamaño, pH y potencial zeta (ζ).....	48
4.4.10. Análisis de la información.....	48
4.5. Resultados y discusión.....	49
4.5.1. Morfología interna de las cápsulas fracturadas por SEM.....	49
4.5.2. Propiedades texturales de las cápsulas.....	52
4.5.3. Análisis termogravimétrico (TGA)	53
4.5.4. Análisis FTIR.....	56
4.5.5. Análisis de pH y ζ -potencial del medio externo de las cápsulas.....	59
4.5.5. Viabilidad de <i>L. casei</i> bajo condiciones gástricas simuladas.....	60
4.6. Conclusiones.....	64
4.7. Agradecimientos.....	64
4.8 Referencias.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ejemplos de bioactivos susceptibles a cambios de pH.....	6
Cuadro 2. Especies de bacterias ácido-lácticas y propiedades de probióticos específicos	8
Cuadro 3. Materiales de pared de uso alimentario y sus funciones.....	13
Cuadro 4. Agentes bioactivos susceptibles a condiciones ácidas.....	27
Cuadro 5. Disminución de ciclos log de probióticos con y sin bases inorgánicas...	29
Cuadro 6. Propiedades texturales de las cápsulas de alginato de <i>Lactobacillus casei</i> con diferentes concentraciones de hidróxido de magnesio.....	53
Cuadro 7. Estructuras secundarias y contenidos relativos en <i>L. casei</i> encapsulados obtenidos de la deconvolución de la banda Amida I.....	58
Cuadro 8. Valores de pH y potencial- ζ después de que las cápsulas de <i>L. casei</i> fueron expuestas a condiciones gástricas simuladas.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas en diferentes regiones del tracto gastrointestinal humano.....	9
Figura 2. Sistemas de protección producidos por diferentes técnicas de encapsulación.....	11
Figura 3. Representación esquemática de la estructura “egg-box” interacción iónica de los iones carboxilato de las unidades de alginato guluronato y los iones Ca^{2+}	14
Figura 4. Micrografías SEM de la estructura interna de las cápsulas de alginato de calcio de <i>L. casei</i> cargadas con diferentes concentraciones de hidróxido de magnesio.....	51
Figura 5. Derivada de la pérdida de peso obtenida de las pruebas TGA de las cápsulas de alginato de calcio <i>L. casei</i> con diferentes concentraciones de hidróxido de magnesio. (a) Rango de temperatura baja y (b) alta.....	55
Figura 6. (a) Espectros FTIR de las cápsulas de alginato de calcio de <i>L. casei</i> con diferentes concentraciones de hidróxido de magnesio. (b) Ejemplo ilustrativo de la deconvolución de la región Amida I.....	57

Figura 7. Efecto de la exposición a condiciones gástricas simuladas sobre: (a) viabilidad inicial y final; y (b) tasas de supervivencia de <i>L. casei</i> entrampado en cápsulas de alginato de calcio con los distintos tratamientos (B ₀ , B _{0.05} , B _{0.1} , B _{0.2} y B _{0.4}).....	62
Figura 8. Crecimiento de <i>L. casei</i> encapsulado en B _{0.4} (placa izquierda) y B ₀ (placa derecha) después de condiciones gástricas simuladas.....	63

DEDICATORIAS

A mi familia mi razón de ser y mi más grande incentivo para seguir adelante. Gracias a mi mamá Lucina Sierra por todo su apoyo y comprensión. Gracias papá Tomás Arenales[†] donde quiera que estés, siempre estarás en mis pensamientos y en mi corazón, sin tus enseñanzas nunca hubiese llegado hasta aquí.

A mis hermanos por estar incondicionalmente conmigo. Gracias Sara por hacerme ver que la bondad al hacer las cosas es muy importante en la vida. Gracias Emanuel por enseñarme que incluso de los errores tenemos que aprender y seguir adelante. Gracias Tomás porque haces que nunca olvide que los sueños son lo más importante. Y a ti mi querida hermana Norma, no puedo decirte más que infinitas gracias, porque me has apoyado incondicionalmente en todas mis locuras y planes, por estar y porque sin ti no lo habría logrado mil gracias.

A mi familia Americana Chris y Peter[†] Talmage por su amor incondicional, apoyo y amabilidad y a mis hermanas de otras naciones que la vida me dio la oportunidad de conocer, porque de ellas aprendí mucho y siempre recordaré los lindos momentos con ustedes Dyviashri, Evelyn, Melissa, Qin Zhang, Kübra, Cansu, Larissa y Finja.

A mis amigos de muchos años, la familia que elegí, quienes siempre están presentes en mi vida, con palabras de aliento, regaños, risas y mil cosas, gracias por estar siempre a pesar de la distancia Pamela, Jovane, Rosa María, Anaid, César Uriel, César Ramsan, Ofelia Sandoval, Marichuy.

Gracias Familia Velázquez Ramírez y Cristóbal Velázquez por su apoyo y sus buenas vibras.

Gracias Betiky Q., Diana B. y Guadalupe C., porque ustedes fueron las personas perfectas para compartir esta experiencia, gracias mil por su apoyo incondicional y por sus palabras de aliento en los momentos difíciles.

Gracias vida, por todo, pero principalmente por las hermosas personas que pusiste en mi camino y el aprendizaje durante este camino.

AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma Mater* Universidad Autónoma Chapingo por todas las oportunidades que me ha brindado durante mi preparación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca para realizar los estudios de doctorado.

A mi comité asesor: Dra. Consuelo Lobato, Dra. Landy Hernández y Dr. Hugo Espinosa por su apoyo y sus valiosas aportaciones al presente documento.

Al Dr. José Álvarez Ramírez por su apoyo, paciencia, tiempo y su dirección durante la redacción del artículo.

A los miembros del Laboratorio del Dr. McClements por toda su ayuda y apoyo; especialmente al Dr. Julian McClements por su sinceridad, nobleza, amabilidad y por el tiempo que me brindo en el cual comprendí la importancia de la investigación; a Jean Alamed por su ayuda y el asesoramiento en mi trabajo de laboratorio. Y a todos los estudiantes del laboratorio con quienes tuve la oportunidad de convivir: Zipei (Zachary), Roujie (Vanessa), Bingjing, Jorge, Da, Li, Palm, Cheryl, Cansu, Kübra, Larissa, Luping, Mahesh, Minqi, Ye, Songran y Charmaine por su asesoría y apoyo.

A los miembros del Laboratorio de Biotecnología de la UAM, especialmente al Dr. Jaime Vernon, Dr. José Álvarez, Samuel y César por brindarme las herramientas y asesoramiento para realizar parte de los experimentos de esta investigación.

A la M. C. María Berenit Mendoza Garfias del Laboratorio Nacional de Biodiversidad de la UNAM por su ayuda y asesoramiento en Microscopía Electrónica de Barrido.

A la Dra. Citlalli González del Laboratorio de Zootecnia-UACH, por su apoyo en las pruebas de absorción atómica.

Al personal del Posgrado de Ingeniería Agroindustrial especialmente a la Sra. Esperanza y Areli por su apoyo incondicional.

DATOS BIOGRÁFICOS

Irene Margarita Arenales Sierra nació el 21 de febrero de 1983 en el estado de Morelos. Sus estudios de educación básica los realizó en el municipio de Atlatlahucan, Morelos. Posteriormente de 1998 a 2005, cursó su formación media superior y superior en la Universidad Autónoma Chapingo, donde obtuvo el título de Ingeniero Agroindustrial. En el 2005, realizó su estancia preprofesional en Ensenada, Baja California, en la empresa Vinícola L. A. Cetto, S. A. de C. V. En 2008 laboró en el Estado de Guerrero, en el Despacho Ingeniería y Tecnología en Agronegocios S. C., como Prestador de Servicios Profesionales y posteriormente como Directora General, de dicho despacho. En 2009 laboró en el aeropuerto de Cabo San Lucas, Baja California Sur, como Auxiliar de Inspección Fitozoosanitario de vuelos internacionales, para el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Cursó sus estudios de maestría en la Universidad Autónoma Chapingo de 2010-2012. Realizó una estancia de investigación de enero a marzo de 2012, en la Universidad de Zaragoza España. Posteriormente de 2013 a 2015 trabajo como profesor de tiempo completo en la Universidad Tecnológica de Tehuacán en la carrera de Procesos Bioalimentarios, donde desarrollo actividades de investigación y docencia. Durante su estancia en la Universidad Tecnológica de Tehuacán fungió como Representante de Cuerpo Académico logrando el nivel En Formación en el primer semestre de gestión, así también fue Editora y fundadora de la Revista Tecnología Agrobioalimentaria. Durante su carrera ha publicado diversos trabajos tanto a nivel nacional como internacional.

RESUMEN GENERAL

“Control de pH interno de microcápsulas para la protección de probióticos ante condiciones gastrointestinales simuladas”

La encapsulación es uno de los métodos más recurrentes para la protección de agentes bioactivos, la función principal de la encapsulación es aislar los agentes bioactivos y protegerlos del oxígeno, humedad, luz, digestión gástrica y pH, para promover la liberación controlada, sin embargo, la encapsulación presenta una desventaja importante que es la porosidad de los biopolímeros que forman parte de la pared de la cápsula, por lo que permite el intercambio de iones, por lo cual condiciones como el pH se pueden modificar y con ello disminuir la viabilidad de los bioactivos. Con el objeto de mantener el pH neutro al interior de microcápsulas de alginato con *L. casei* entrampado, después de ser sometidas a condiciones gástricas simuladas, en la presente investigación se adicionaron diferentes concentraciones de $Mg(OH)_2$, como base para ejercer un efecto buffer. El análisis FTIR indicó que las altas concentraciones de $Mg(OH)_2$ inducían el despliegue de proteínas celulares que ponían en riesgo la viabilidad de los probióticos. Esto último sugiere que si bien el $Mg(OH)_2$ es capaz de aumentar el pH dentro de las capsulas con respecto al pH del ambiente externo, se debe determinar una concentración adecuada donde se reduce o dificulta el desarrollo de la proteína. El análisis de viabilidad de *L. casei* mostró que una concentración de alrededor de 0.1 g de $Mg(OH)_2$ g⁻¹ de alginato maximizaba el recuento celular en condiciones gástricas simuladas.

Palabras clave: alginato; hidróxido de magnesio; *L. casei*; protección gástrica; pH.

GENERAL ABSTRACT

“Internal pH control of microcapsules for the protection of probiotics under simulated gastrointestinal conditions”

Encapsulation is one of the most recurrent methods for the protection of bioactive agents, the main function of the encapsulation is to isolate bioactive agents and protect them from oxygen, moisture, light, gastric digestion and pH, to promote controlled release, however, the encapsulation presents an important disadvantage that is the porosity of the biopolymers that are part of the capsule wall, by what allows the ion exchange, for which conditions like the pH can be modified and with this decrease the viability of the bioactive. In order to maintain the neutral pH inside microcapsules of alginate with trapped *L. casei*, after being subjected to simulated gastric conditions, in the present investigation different concentrations of $Mg(OH)_2$ were added, as a base to exert an effect buffer. The FTIR analysis indicated that high concentrations of $Mg(OH)_2$ induced the deployment of cellular proteins that put at risk the viability of probiotics. The latter suggests that although $Mg(OH)_2$ is able to increase the pH inside the capsules with respect to the pH of the external environment, an adequate concentration should be determined where the protein development is reduced or hindered. The viability analysis of *L. casei* showed that a concentration of about 0.1 g of $Mg(OH)_2$ g⁻¹ alginate maximized the cell count under simulated gastric conditions.

Key words: alginate; magnesium hydroxide; *L. casei*; gastric protection; pH.

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos que cuando están presentes en la cantidad adecuada en el tracto digestivo confieren efectos benéficos a la salud del huésped (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001). Sin embargo, para proveer estos efectos benéficos es necesario que sobrevivan al paso a través del tracto gastrointestinal, que involucra pH ácido y diversas enzimas. Lamentablemente, la mayoría de las bacterias probióticas no sobreviven a condiciones ácidas (pH~2) en el tracto gástrico, lo cual limita su biodisponibilidad y por tanto su efecto benéfico.

Uno de los métodos para prevenir la disminución de la carga celular y/o daño de bacterias probióticas es la encapsulación. Se han desarrollado varios sistemas de encapsulación con mezclas de biopolímeros que no dañan a los microorganismos y que mejoran su supervivencia. Sin embargo, estos sistemas tienen la desventaja de que todos son materiales porosos en mayor o menor grado, lo que permite el intercambio iónico afectando directamente el pH dentro de la cápsula que como consecuencia disminuye la bioactividad de los probióticos.

En los últimos años, se ha desarrollado una metodología donde, además de la microencapsulación, se agrega una sustancia que ejerce un efecto tampón dentro de la cápsula (Yao *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2019), lo que en algunos casos da como resultado la mejora en la biodisponibilidad de probióticos, sin embargo, estas tecnologías presentan grandes desafíos, quizá uno de los más importantes sería la evaluación del efecto sobre las bacterias de los compuestos presentes cuando las bases inorgánicas se disuelven en condiciones ácidas. Las investigaciones que hasta el momento se han realizado sobre la coencapsulación de bases inorgánicas y probióticos son las publicadas por Yao *et al.*, (2018) y Gu *et al.*, (2019), aunque es cierto que ambos estudios informan que el uso de nanopartículas de MgO, Mg(OH)₂ y MgCO₃ mejoran la supervivencia de los

microorganismos evaluados, también es importante mencionar que Gu *et al.* (2019) reportaron que después de condiciones biliares simuladas el $\text{Mg}(\text{OH})_2$ no ejerce un efecto satisfactorio, por lo que sería relevante verificar qué tipo de bases inorgánicas contribuyen a la supervivencia y biodisponibilidad de los probióticos, así como las dosis óptimas de estos compuestos. Por lo antes mencionado el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ como base inorgánica para controlar el pH interno de microcápsulas a diferentes concentraciones, a fin de evaluar si existe algún daño estructural en las bacterias probióticas y cuantificar su viabilidad.

El documento consta de cuatro capítulos: el presente capítulo que corresponde a la introducción acerca de la importancia de la protección de probióticos y el uso de bases inorgánicas en la coencapsulación de bioactivos; el capítulo dos presenta el estado del arte acerca de los agentes bioactivos enfocado a probióticos y los sistemas de protección usados, el capítulo tres que presenta una revisión acerca del uso de bases inorgánicas en hidrogeles para la protección agentes bioactivos susceptibles a pH y finalmente el capítulo cuatro está compuesto por un artículo de investigación acerca del incremento de la viabilidad de *L. casei* con cápsulas de alginato- $\text{Mg}(\text{OH})_2$ en condiciones gástricas simuladas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Agentes bioactivos

Los compuestos bioactivos derivados de los alimentos han ganado atención en los últimos años debido a sus beneficios potenciales para la salud en la reducción de los riesgos de enfermedades, como diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y obesidad; dichos beneficios se deben a sus actividades antitumorales, antiinflamatorias, antioxidantes, antihipertensivas y antihiperlipidémicas, además de sus funciones nutricionales básicas. Estos compuestos bioactivos de origen alimenticio incluyen fitoquímicos, ácidos grasos, vitaminas, proteínas, péptidos y polisacáridos. A menudo los bioactivos son altamente sensibles a estímulos ambientales, como luz, calor, pH bajo y oxígeno, durante el proceso de transformación y almacenamiento. Además, los problemas que ocurren durante la administración oral de ingredientes bioactivos deben ser superados (Chai *et al.*, 2018). Los agentes bioactivos se pueden clasificar en moléculas bioactivas como agentes saborizantes, endulzantes, enzimas, colorantes y vitaminas, entre otros, y células vivas como probióticos (Fang & Bhandari, 2010).

2.1.1. Agentes bioactivos susceptibles a pH

Uno de los factores difíciles de controlar es el pH, su modificación genera cambios en el entorno de los componentes bioactivos, ocasionando cambios en su estructura química y biodisponibilidad, por lo que es necesario conocer la naturaleza química de estos compuestos, con el fin de desarrollar tecnologías de acuerdo con un proceso que preserve su funcionalidad hasta que los bioactivos alcancen su sitio activo y ejerza su función. Algunos de los compuestos bioactivos que experimentan cambios cuando se modifica el pH se pueden observar en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Ejemplos de bioactivos susceptibles a pH

Agente bioactivo	Efecto de pH
Antocianina de camote morado	El análisis de los datos indicó una reacción de primer orden para la degradación de las antocianinas en soluciones de pH 3.0, 5.0 y 7.0 tienen vidas medias de 10.27, 12.42 y 4.66 h, respectivamente; este tipo de antocianinas es más estable a pH 5, porque a pH 3 y 7 el tiempo de degradación es menor (Jiang <i>et al.</i> , 2019).
Miricetina (Flavonoide)	Debido a su estructura química, este compuesto es estable a pH 2 (Yao <i>et al.</i> , 2014).
Enzimas	Polifenol oxidasa extraída de frutos maduros de <i>Mauritia flexuosa</i>: Actividad óptima a pH 7.0 y 35 °C, con inactivación completa entre $2.0 \leq \text{pH} < 10$ (de Oliveira & Orlanda, 2017). β-galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i>: la enzima inmovilizada a pH 5 era más estable que la enzima libre a pH 5 y 9, mientras que a pH 7 la enzima libre era claramente más estable que la enzima inmovilizada (de Albuquerque <i>et al.</i>, 2016). Lipasa pancreática: esta enzima es altamente susceptible a la degradación durante el paso a través del ambiente altamente ácido del estómago. En individuos sanos, se ha informado que solo el 1% de la actividad de la lipasa se retiene después del paso a través del estómago (Zhang, Chen, Zhang, Deng, & McClements, 2016).
Probióticos	<i>Lactobacilli sp.</i>: el pH mínimo al que crecen y sobreviven es aproximadamente 3.7 y hasta pH 7 (Boylston <i>et al.</i>, 2004; Mattila-Sandholm <i>et al.</i>, 2002; Tripathi & Giri, 2014; de Melo-Pereira <i>et al.</i>, 2018). <i>Bifidobacterium sp.</i>: actividad máxima a pH entre 6.5 y 7.5 (Florindo <i>et al.</i>, 2018; Holkem <i>et al.</i>, 2017; Zhang <i>et al.</i>, 2019).

En algunos casos, como algunos flavonoides, el pH ácido brinda estabilidad; sin embargo, en el caso de las enzimas y los microorganismos probióticos, el pH ácido disminuye la funcionalidad y biodisponibilidad de estos compuestos y microorganismos.

2.1.2. Probióticos

Los probióticos se definen como "microorganismos vivos" que si se administran en las dosis apropiadas tienen un efecto beneficioso sobre el huésped la cantidad varía entre 10^8 y 10^7 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC g^{-1}), esto depende de la cepa, a estos microorganismos se les ha atribuido efectos benéficos sobre el sistema inmunológico (Gardiner *et al.*, 2002; Burgain, Gaiani, Linder, & Scher, 2011; Araújo *et al.*, 2016; Ying *et al.*, 2012; Nualkaekul, Cook, Khutoryanskiy, & Charalampopoulos, 2013), es por esta razón que es importante proteger a los probióticos de condiciones adversas en el medio ambiente (oxígeno y pH), condiciones de procesos que involucren cambios drásticos de temperatura y presión, así como finalmente condiciones gastrointestinales (pH y enzimas), para que puedan llegar al colon y ejercer su efecto benéfico. El pH en el estómago humano es quizás una de las condiciones más hostiles para los probióticos, ya que tiene un pH entre 1-2, la mayoría de los probióticos solo pueden sobrevivir en estas condiciones durante 30 segundos o unos pocos minutos (Sarao, & Arora, 2017). Las principales especies probióticas se muestran en el Cuadro 2, así como los beneficios asociados a cada especie.

Cuadro 2. Especies de bacterias ácido-lácticas y propiedades de probióticos específicos

Especie	Subespecie	Beneficios asociados
<i>Lactobacilli sp</i>	<i>L. acidophilus</i>	Inmunidad celular
	<i>L. casei</i>	mejorada en adultos sanos
	<i>L. delbrueckii</i> ssp. (bulgaricus)	en un ensayo controlado.
	<i>L. cellobiosus</i>	Mejora de la función
	<i>L. curvatus</i>	inmune de la mucosa,
	<i>L. fermentum</i>	secreción de mucina y
	<i>L. lactis</i>	prevención de
	<i>L. plantarum</i>	enfermedades.
	<i>L. reuteri</i>	Disminución de pólipos,
	<i>L. brevis</i>	adenomas y cáncer de colon en animales de experimentación.
		Disminución de diarrea aguda.
<i>Bifidobacterium sp</i>	<i>B. bifidum</i>	Reducción de la incidencia
	<i>B. adolescentis</i>	de enterocolitis
	<i>B. animalis</i>	necrotizante neonatal.
	<i>B. infantis</i>	
	<i>B. thermophilum</i>	
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>B. longum</i>	
	<i>Ent. Faecalis</i>	Disminución de la duración
	<i>Ent. Faecium</i>	de la diarrea aguda por gastroenteritis.

Fuente: Modificado de Parvez, Malik, Kang, & Kim (2006)

El efecto benéfico de los probióticos dependerá de la especie, la cantidad de microorganismos que alcancen su sitio activo, el ambiente en el que se encuentra y la salud del huésped para que pueda proliferar y colonizar el colon.

2.2. Condiciones gastrointestinales adversas para probióticos

Los compuestos administrados por vía oral encuentran diversas barreras en el tracto gastrointestinal antes de que se absorban y entren en el torrente sanguíneo (Figura 1). La cavidad oral es la primera barrera para los probióticos después de la ingestión. Las condiciones orales típicas son pH neutro (7.4) con saliva que contiene principalmente amilasa. El pH oral, la fuerza iónica, la temperatura, la velocidad de flujo, las fuerzas de fricción y las enzimas salivales, como las amilasas, son responsables de descomponer las sustancias en la cavidad oral. Las bacterias ingeridas pueden sufrir cambios apreciables en la composición y estructura en la boca (McClements, 2013).

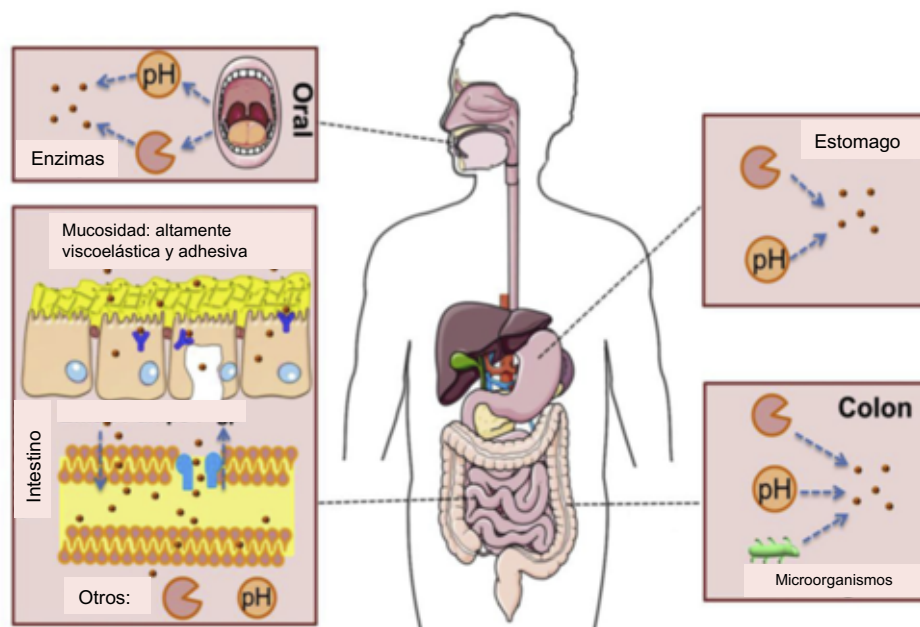


Figura 1. Representación esquemática de las condiciones físico-químicas y fisiológicas en diferentes regiones del tracto gastrointestinal humano.

Fuente: Chai *et al.*, 2018.

Posteriormente, los alimentos se tragan en la faringe y llegan al estómago a través del esófago. El estómago contiene pepsina y es un ambiente altamente ácido. Los alimentos se digieren físicamente en una masa espesa y semifluida llamada quimo, que se activa con fluidos gástricos muy ácidos (pH 1-2) o con enzimas digestivas múltiples (por ejemplo, proteasas, amilasas y lipasas). Además, también puede producirse una digestión química simple en el estómago, lo que permite que el quimo se digiera más a fondo en macromoléculas, como proteínas, grasas y polisacáridos, antes de transferir al intestino delgado. El quimo se traslada al duodeno y al íleon y se digiere mediante enzimas pancreáticas (proteasas, lipasas y amilasas) y otras enzimas digestivas en el intestino delgado. El pH interno cambia a 6.0–7.0. Sin embargo, los nutrientes impregnan la capa de moco y llegan a las células epiteliales para su absorción. Si bien los alimentos ingeridos son degradados y absorbidos principalmente por el estómago y el intestino delgado, algunos componentes, como la fibra dietética, no son digeribles debido a su composición y estructura especiales. Estos componentes pasan al colon, donde el pH es 7.0–8.0, y se desintegran allí por diversos microbios (Chai *et al.*, 2018).

2.3. Sistemas de protección de probióticos

Las técnicas de encapsulación pueden basarse en principios fisicoquímicos y/o en enfoques de ingeniería de procesos. En la mayoría de los casos se usan ambos principios, sin embargo, uno de ellos generalmente prevalece sobre el otro. La elección de una técnica particular dependerá de la aplicación y las propiedades de los bioactivos, aunque diferentes técnicas o una combinación de más de una podrían proporcionar una protección adecuada (Figura 2). En general, tres puntos se deben considerar en la encapsulación de agentes bioactivos: (i) la formación de la pared alrededor del material a encapsular; (ii) asegurar que no ocurran fugas no deseadas; (iii) asegurar que los materiales no deseados se mantengan fuera (Mozafari *et al.*, 2008).

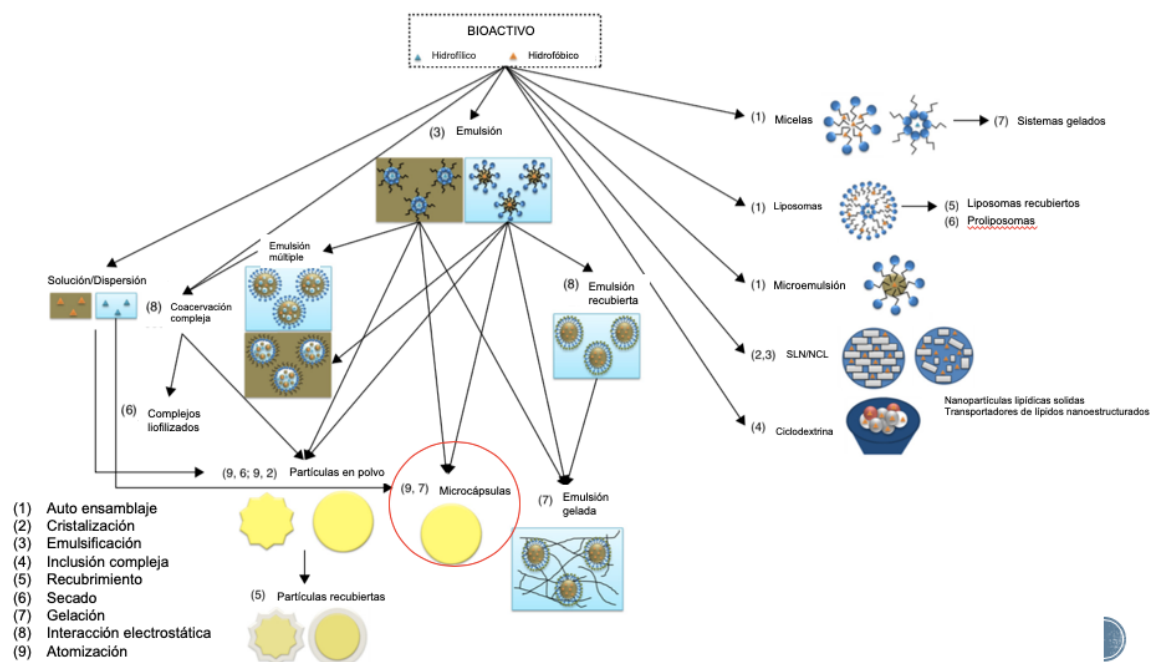


Figura 2. Sistemas de protección producidos por diferentes técnicas de encapsulación

Fuente: Okuro *et al.*, 2015

El objetivo principal de la encapsulación es proteger el material del núcleo de condiciones ambientales adversas, como los efectos indeseables de luz, humedad y oxígeno, lo que contribuye a un aumento de la vida útil del bioactivo y promueve una liberación controlada del encapsulado. En la industria alimentaria, el proceso de microencapsulación se puede aplicar por diversos motivos que Desai y Park (2005) han resumido de la siguiente manera:

- protección del material del núcleo contra la degradación al reducir su reactividad con su entorno exterior;
- reducción de la evaporación o tasa de transferencia del material del núcleo al ambiente exterior;
- modificación de las características físicas del material original para permitir un manejo más fácil;
- adaptar la liberación del material del núcleo lentamente a lo largo del tiempo o en un momento determinado;
- enmascarar un sabor o sabor no deseado del material del núcleo;
- dilución del material del núcleo cuando solo se requieren pequeñas cantidades, mientras se logra una dispersión uniforme en el material huésped;
- para ayudar a separar los componentes de la mezcla que de otra manera reaccionarían entre sí.

Los ingredientes alimenticios de los acidulantes,

agentes saborizantes, edulcorantes, colorantes, lípidos, vitaminas, minerales, enzimas y microorganismos, se encapsulan usando diferentes tecnologías.

2.3.1. Materiales de pared

Algunos materiales de pared de uso alimentario y biocompatibles se presentan en el Cuadro 3. Los carbohidratos se utilizan ampliamente como material de pared para la encapsulación de ingredientes alimentarios debido a su capacidad para formar sólidos vítreos amorfos que proporcionan soporte estructural al material de pared del sistema de suministro. Su capacidad para unir ingredientes activos se ve complementada por su diversidad, bajo costo y uso generalizado en alimentos y por eso los convierte en la opción preferida para la encapsulación. Por otro lado, las proteínas y los aislados que contienen proteínas (por ejemplo, suero de leche, soja, caseína, gelatina) consisten en una amplia gama de grupos funcionales que imparten propiedades anfífilas y, por lo tanto, excelentes capacidades de emulsificación. Lo anterior, los hace favorables para la disolución de ingredientes activos hidrófobos. Además, sus capacidades de formación de películas y la capacidad de autoasociarse en redes, las hacen útiles como material de matriz (Augustin & Hemar, 2009). Finalmente, la goma más popular para usar como material de pared es la goma arábica, también conocida como goma arábiga. Su popularidad se debe a una combinación de características favorables tales como: capacidad de formación de película, solubilidad acuosa, baja viscosidad, buena retención de componentes volátiles y propiedades emulsionantes, todo lo cual se origina en una pequeña fracción ($\pm 5\%$) de proteína presente en la goma (Madene, Jacquot, Scher, & Desobry, 2006).

Cuadro 3. Materiales de pared de uso alimentario y sus funciones.

Categoría	Material de pared	Funciones importantes
Carbohidratos	Almidón	Sólido vítreo, sabores aglutinantes / activos.
	Dextrina	Sólido vítreo, filmación.
	Maltodextrina	Formación de película, sabores / activos aglutinantes, formación de matriz.
	Cyclodextrina	Aglutinantes de sabores / activos, emulsionante, buen emulsionante.
	Almidón modificado	Buen emulsificante.
Celulosa	Quitosano	Sólido vítreo, formación de complejos.
	Celulosa modificada (metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etc.)	Formación de película.
Proteínas	Suero	Formación de película, emulsionante.
	Soya	Emulsionante.
	Caseína	Formación de película, emulsionante.
	Gelatina	Emulsionante formador de película.
Gomas	Arabica (Acacia)	Emulsionante, formador de película, sólido vítreo.
	Almendra	Emulsionante, sólido vítreo
	Mezquite	Emulsionante, sólido vítreo, saborizante.
	Alginato de sodio	Formación de gel, espesante.
	Ceras, parafina, grasas (hidrogenadas)	Barrera al O ₂ y al agua.

Fuente: Labuschagne, 2018

Alginato

El alginato es un polisacárido lineal y aniónico derivado de algas marinas marrones, como *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* y *Ascophyllum nodosum*. Debido a sus propiedades químicas y físicas, se ha estudiado ampliamente debido a su capacidad para formar geles y micropartículas. Las mezclas de alginato se consideran biocompatibles, seguras, perecederas y no-inmunogénicas. Puede definirse como biopolímero aniónico que consiste en unidades de ácido manurónico y gulurónico en los bloques irregulares. El

ácido manurónico forma enlaces β (1 $\rightarrow$ 4) y el ácido gulurónico forma enlaces α (1 $\rightarrow$ 4). Las unidades de ácido manurónico y gulurónico están unidas por enlaces glicosídicos. Los segmentos de ácido gulurónico exhiben conformaciones rígidas y dobladas que proporcionan rigidez a las cadenas moleculares (Thakur *et al.*, 2018; Agüero *et al.*, 2017).

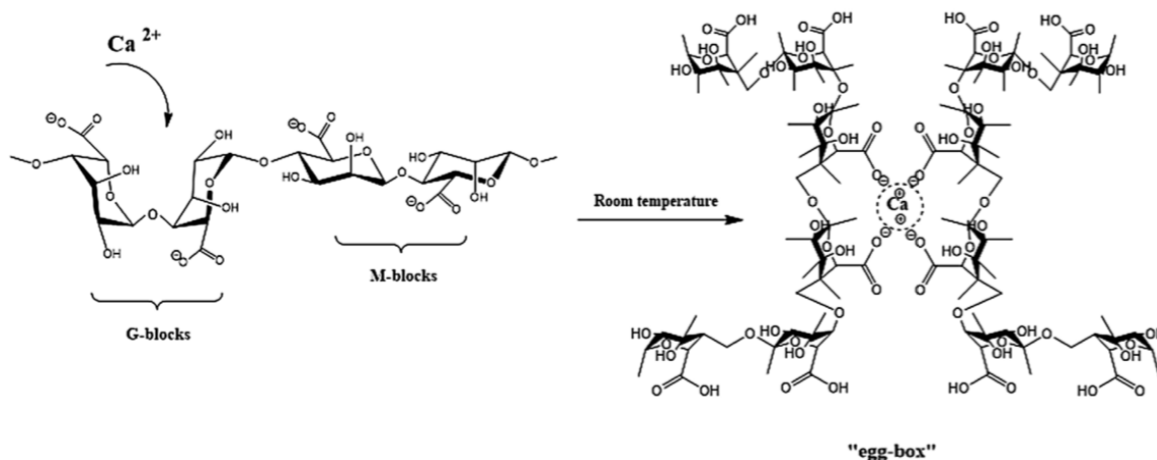


Figura 3. Representación esquemática de la estructura “egg-box” interacción iónica de los iones carboxilato de las unidades de alginato guluronato y los iones Ca^{2+}

Fuente: Agüero *et al.*, 2017.

La matriz de alginato se puede preparar a través de la reticulación física y/o química de las cadenas del polímero. La reticulación iónica genera una red tridimensional principalmente mediante la interacción de los grupos carbonilo de los restos de guluronato con cationes multivalentes, dando lugar a la bien conocida conformación "egg-box" (Figura 3). La fuerza de interacción de importantes cationes de reticulación de alginato presenta el siguiente orden: cationes trivalentes > Pb^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} . Aunque el ion Ca^{2+} no muestra la mayor fuerza de interacción, es el más utilizado. Esta preferencia podría estar asociada a la aceptabilidad del calcio por parte del organismo humano, debido a su papel como componente principal del sistema esquelético, así como a la regulación de varios procesos fisiológicos. Los cationes Sr^{2+} y Ba^{2+} también se consideran agentes de reticulación, sin embargo, el uso de Pb^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+} está limitado debido a su toxicidad (Agüero *et al.*, 2017; Bekhit, Sánchez-González, Ben-Messaoud, & Desobry, 2016).

El gel de alginato de calcio formado es permeable a las moléculas solubles en agua, cuyos pesos moleculares son menores a 5000 Daltons. Las moléculas más grandes también pueden difundirse a través del gel, pero si el peso molecular supera los 10,000 Daltons, no se produce difusión. La excepción a esto son los lípidos, que permanecen en la matriz incluso cuando son de bajo peso molecular (Rodríguez-Llimos, Chiappetta, Szeliga, Fernández, & Bregni 2003).

2.6. Referencias

- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 902–912. <https://doi.org/10.1039/B801739P>
- Agüero, L., Zaldivar-Silva, D., Peña, L., & Dias, M. (2017). Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. *Carbohydrate Polymers*, 168, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.033>
- Araújo, M. De, Carine, G., José, A., Marlon, É., Flores, M., Smanioto, J., Queiroz, L., Jacob-Lopes, E., Ferreira, C., Menezes, D. (2016). ScienceDirect Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *Journal of Functional Foods*, 21, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.025>
- Bekhit, M., Sánchez-González, L., Ben-Messaoud, G., & Desobry, S. (2016). Encapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on alginate/pectin composite microbeads: Effect of matrix composition on bacterial survival and nisin release. *Journal of Food Engineering*, 180, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.031>
- Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., & Reinheimer, J. A. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14, 375–387. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2003.08.008>
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467–483. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>
- Chai, J., Jiang, P., Wang, P., Jiang, Y., Li, D., Bao, W., Liu, B., Liu, B., Zhao, L., Norde, W., Yuan, Q., Ren, F., & Li, Y. (2018). The intelligent delivery systems for bioactive compounds in foods: Physicochemical and physiological conditions, absorption mechanisms, obstacles and responsive strategies. *Trends in Food Science and Technology*, 78(November 2017), 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.003>
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361–1394. <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>

- de Albuquerque, T. L., Peirce, S., Rueda, N., Marzocchella, A., Gonçalves, L. R. B., Rocha, M. V. P., & Fernandez-Lafuente, R. (2016). Ion exchange of β -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. *Process Biochemistry*, 51(7), 875–880. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.014>
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060–2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
- de Oliveira Carvalho, J., & Orlanda, J. F. F. (2017). Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract. *Food Chemistry*, 233, 159–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.101>
- Dong, Ch., Cairney, J., Sun, Q., Maddan O. L., He, G., & Deng, Y. (2010). Investigation of $Mg(OH)_2$ nanoparticles as an antibacterial agent. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 2101–2109.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
- Florindo, R. N., Souza, V. P., Manzine, L. R., Camilo, C. M., Marana, S. R., Polikarpov, I., & Nascimento, A. S. (2018). Structural and biochemical characterization of a GH3 β -glucosidase from the probiotic bacteria *Bifidobacterium adolescentis*. *Biochimie*, 148, 107–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.03.007>
- Gardiner, G. E., Heinemann, C., Baroja, M. L., Bruce, A. W., Beuerman, D., Madrenas, J., & Reid, G. (2002). Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 for human intestinal applications. *International Dairy Journal*, 12(2), 191–196. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00138-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00138-8)
- Gu, M., Zhang, Z., Pan, C., Goulette, T. R., Zhang, R., Hendricks, G., McClements, D. J., & Xiao, H. (2019). Encapsulation of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G7 in gastroprotective microgels: Improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 91, 283–289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.040>
- Hikku, G. S., Jeyasubramanian K., & Vignesh Kumar, S. (2017). Nanoporous MgO as self-cleaning and anti-bacterial pigment for alkyd based coating. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 52, 168–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.03.040>
- Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Barin, J. S., Moraes Flores, É. M., Muller, E. I., Codevilla, C. F., Jacob-Lopes, E., Ferreira, G. C. R., & de Menezes, C. R. (2017). Production of microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 216–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.013>

- Jiang, T., Mao, Y., Sui, L., Yang, N., Li, S., Zhu, Z., Wang, C., Yin, S., He, J., & He, Y. (2019). Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. *Food Chemistry*, 274, 460–470. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.141>
- Jiang, W., & Schwendeman, S. P. (2008). Stabilization of Tetanus Toxoid Encapsulated in PLGA Microspheres. *Molecular Pharmaceutics*, 5(5), 808–817. <https://doi.org/10.1021/mp800027f>
- Krishnamoorthy, K., Manivannan, G., Kim, S.J., Jeyasubramanian, K., & Premanathan. (2012). Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy. *J Nanopart Res* 14: 1063. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1063-6>
- Labuschagne, P. (2018). Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: A review. *Food Research International*, 107(November 2017), 227–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.026>
- Leung, Y. H., Ng, A. M., Xu, X., Shen, Z., Gethings, L. A., Wong, M. T., Chan, C. M., Guo, M. Y., Ng, Y. H., Djurišić, A. B., Lee, P. K., Chan, W. K., Yu, L. H., Phillips, D. L., Ma, A. P., & Leung, F. C. (2013). Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small*. 2014 Mar 26;10(6):1171-83. doi: 10.1002/smll.201302434
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11(1), 1–17. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00036-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00036-X)
- Madene, A. , Jacquot, M. , Scher, J. & Desobry, S. (2006), Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41: 1-21. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x
- Marinina, J., Shenderova, A., Mallery, S. R., & Schwendeman, S. P. (2000). Stabilization of vinca alkaloids encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharmaceutical Research*, 17, 677–683.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00099-1)
- McClements, D. J. (2013). Edible lipid nanoparticles: Digestion, absorption, and potential toxicity. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 409–423. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.04.008>
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of Food Ingredients Using Nanoliposome Technology. *International Journal of Food Properties*, 11(4), 833–844. <https://doi.org/10.1080/10942910701648115>
- Nuallkaekul, S., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus*

- plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Research International*, 53(1), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.019>
- Okuro, P. K., Furtado, G. F., Sato, A. C. K., & Cunha, R. L. (2015). ScienceDirect Structures design for protection and vehiculation of bioactives. *Current Opinion in Food Science*, 5, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.003>
- Parvez, S., Malik, K. A., Kang, S. A., & Kim, H. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, 100, 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>
- Rodriquez-Llimos, A.C, Chiappetta, D, Szeliga, M.E, Fernández, A, & Bregni C. (2003). Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol. *Ars Pharmaceutica*, 44:4;333-342, 2003.
- Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics , prebiotics , and microencapsulation : A review, 8398(January). <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>
- Thakur, S., Sharma, B., Verma, A., Chaudhary, J., Tamulevicius, S., & Thakur, V. K. (2018). Recent progress in sodium alginate based sustainable hydrogels for environmental applications. *Journal of Cleaner Production*, 198, 143–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.259>
- Tripathi M. K., & Giri S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241. ISSN 1756-4646, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Yao, Y., Lin, G., Xie, Y., Ma, P., Li, G., Meng, Q., & Wu, T. (2014). Preformulation studies of myricetin: A natural antioxidant flavonoid. *Pharmazie*, 69(1), 19–26. <https://doi.org/10.1691/ph.2014.3076>
- Yao, M., Li, B., Ye, H., Huang, W., Luo, Q., Xiao, H., McClements. D. J., & Li, L. (2018). Enhanced viability of probiotics (*Pediococcus pentosaceus* Li05) by encapsulation in microgels doped with inorganic nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 83, 246–252. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.05.024>
- Ying, D., Schwander, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-demarchi, C., & Ann, M. (2012). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices : Probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.08.009>
- Zhang, Z., Chen, F., Zhang, R., Deng, Z., & McClements, D. J. (2016). Encapsulation of Pancreatic Lipase in Hydrogel Beads with Self-Regulating Internal pH Microenvironments: Retention of Lipase Activity after Exposure to Gastric Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(51), 9616–9623. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04644>
- Zhang, Z., Zhang, R., & McClements, D. J. (2017). Lactase (β -galactosidase) encapsulation in hydrogel beads with controlled internal pH microenvironments: Impact of bead characteristics on enzyme activity. *Food Hydrocolloids*, 67, 85–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.005>

- Zhang, C., Yu, Z., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2019). Colonization and probiotic function of *Bifidobacterium longum*. *Journal of Functional Foods*, 53, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.022>
- Zhu, G., Mallery, S. R., & Schwendeman, S. P. (2000). Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide). *Nature Biotechnology*, 18, 52. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/71916>

3. USO DE BASES INORGÁNICAS EN HIDROGELES PARA LA PROTECCIÓN DE AGENTES BIOACTIVOS SUCEPTIBLES A pH: REVISIÓN/USE OF INORGANIC BASES IN HYDROGELS FOR THE PROTECTION OF pH SENSITIVE BIOACTIVE AGENTS: A REVIEW

3.1. Resumen

Existe un creciente interés por la incorporación de bioactivos a alimentos funcionales, suplementos y productos farmacéuticos, debido a su efecto promotor de la salud. Sin embargo, la gran mayoría de los bioactivos son susceptibles a alteraciones químicas y físicas durante su procesamiento, almacenamiento y digestión. En adición, condiciones ambientales no favorables, tales como temperatura, luz, oxígeno y pH pueden afectar su estabilidad. El pH es quizás uno de los factores más importantes a considerar, debido a que cambios en sus valores pueden alterar la estructura química y la función biológica de los bioactivos, así como disminuir su biodisponibilidad. Hidrogeles micro y nanométricos han sido reportados como sistemas potenciales para proteger bioactivos de valores de pH severos. No obstante, los hidrogeles presentan propiedades de barrera pobres contra iones circundantes (e.g. H^+), debido a su carácter hidrofílico y estructura porosa. Para resolver este problema se ha propuesto la inclusión de ciertos tipos de bases inorgánicas a los hidrogeles, tales como $Mg(OH)_2$, $CaCO_3$, $ZnCO_3$ y $MgCO_3$, con baja solubilidad en agua a valores de pH relativamente elevados. Varios estudios han demostrado que bases inorgánicas han sido usadas con éxito para controlar el pH interno de microistemas conteniendo proteínas. En contraste, escasos estudios se han llevado a cabo sobre el uso de estas bases para la protección de probióticos encapsulados contra condiciones gastrointestinales simuladas. Por otra parte, la acción antibacterial de las bases inorgánicas que ha sido reportada, prácticamente no ha sido explorada en sistemas de encapsulación. Este artículo presenta una revisión breve de ambos temas.

Palabras clave: pH, hidrogeles, probióticos, bases inorgánicas.

3.2. Abstract

There has a growing interest in incorporating bioactives into functional foods, supplements, and pharmaceuticals because of their health promoting effect. However, bioactives are mostly susceptible to chemical and/or physical alterations at processing, storage, and digestion. Unfavorable environmental conditions, such as temperature, light, oxygen and pH may affect their stability. pH is perhaps one of the most important factors to consider, because changes in its values may alter the chemical structure and biological function of bioactives, as well as decrease their bioavailability. Micro and nanometric hydrogels have been reported as potential systems to protect bioactives from harsh values of pH. Nevertheless, hydrogels have poor barrier properties against surrounding ions (e.g. H^+), due to their high hydrophilic character and porous structure. To overcome this problem, the inclusion of certain types of inorganic bases with low water solubility at relatively high pH values, such as $Mg(OH)_2$, $CaCO_3$, $ZnCO_3$ and $MgCO_3$ has been proposed. Various studies have shown that inorganic bases have been successfully used for controlling the internal pH in microsystems containing proteins. In contrast, scarce studies have been carried out on the potential application of these bases to protect encapsulated probiotics against simulated gastrointestinal conditions. On the other hand, the reported antibacterial action of inorganic bases practically has been unexplored in these encapsulation systems. This paper presents a brief overview of both issues.

Keywords: pH, hydrogels, probiotics, inorganic bases.

3.3. Introducción

En los últimos años ha surgido un creciente interés en incorporar bioactivos en alimentos funcionales, suplementos y productos farmacéuticos debido a sus efectos benéficos a la salud (Okuro *et al.*, 2015; McClements, 2018). Sin embargo, los bioactivos en general son susceptibles a alteraciones químicas y/o físicas bajo condiciones de procesamiento, almacenamiento y digestión (McClements, 2018). En adición, condiciones ambientales desfavorables (temperatura, pH, luz, oxígeno, etc.) pueden afectar la biodisponibilidad y la actividad biológica de los bioactivos (Abaee *et al.*, 2017). La encapsulación se considera una alternativa viable para preservar la actividad de los compuestos bioactivos, mejorar su aplicación en las formulaciones alimenticias, nutraceuticas o biológicas; así como para su administración y liberación gastrointestinal controlada en un sitio específico (Shishir *et al.*, 2018). Los hidrogeles de biopolímeros (también denominados partículas de biopolímeros, nanogeles, cápsulas de hidrogel o microcápsulas) fabricados a partir de proteínas y/o polisacáridos de calidad alimentaria, se consideran particularmente adecuados para encapsulación, debido a que las condiciones usadas para su preparación son suaves y no afectan la estructura ni las propiedades del bioactivo (Zhang *et al.*, 2016; McClements, 2017; Guo *et al.*, 2018). Los hidrogeles de biopolímero son redes tridimensionales entrecruzadas, que pueden absorber y mantener una gran cantidad de agua (Su *et al.*, 2019). Las estructuras internas y externas, composición y dimensión de las partículas de los hidrogeles, se pueden modular mediante la selección de biopolímeros y el método de fabricación para obtener cierta funcionalidad y aplicaciones particulares (Ma *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2019). La selección de un material de protección y técnica de fabricación adecuados, son indispensables para controlar la funcionalidad de un sistema de protección y liberación (Okuro *et al.*, 2015). Al diseñar un hidrogel para encapsular un bioactivo, es importante considerar las propiedades del bioactivo en cuestión y las de la matriz alimentaria a la cual será incorporado. Cada bioactivo tiene su propio y único origen biológico, propiedades moleculares, características fisicoquímicas, actividades biológicas y respuesta particular a condiciones ambientales específicas (pH, luz, actividad enzimática, oxígeno, etc.) (Okuro *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2018). Dependiendo de su naturaleza química, los bioactivos son especialmente sensibles a ciertas condiciones ambientales particulares. Las enzimas se pueden desnaturalizar y desactivar cuando se

alteran el pH, fuerza iónica o condiciones de temperatura (He *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017; McClements 2017). Los lípidos poliinsaturados pueden sufrir degradación química debido a la oxidación cuando se exponen a altos niveles de oxígeno, temperaturas elevadas, luz o prooxidantes (Holkem *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). Los probióticos pueden perder viabilidad durante el almacenamiento, incorporados a un producto alimenticio funcional o durante su paso por el tracto gastrointestinal (McClements 2017; Yao *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2019). En los últimos años, se ha desarrollado una metodología que comprende, además de la microencapsulación, la inclusión de una sustancia que ejerce un “efecto tampón” en el interior del hidrogel para la protección de diversos bioactivos contra su exposición a condiciones ácidas (Zhang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2019), lo que en algunos casos ha causado mejoramiento en su biodisponibilidad. No obstante, esta tecnología representa grandes desafíos; quizá uno de los más importantes es la evaluación y el control del efecto de estas bases inorgánicas, cuando sufren disolución acuosa bajo condiciones ácidas, especialmente para el caso de organismos probióticos. Yao *et al.* (2018) y Gu *et al.* (2019) informaron que el uso de nanopartículas de MgO, Mg(OH)₂ y MgCO₃ mejoraron la supervivencia de los microorganismos probióticos evaluados bajo condiciones gastrointestinales simuladas. Es importante mencionar por otra parte, que existen estudios que han demostrado que estas bases inorgánicas ejercen efecto bactericida sobre bacterias Gram positivas y Gram-negativas (Hikku y Vignesh Kumar, 2017; Dong *et al.*, 2010; Krishnamoorthy *et al.*, 2012). Con base en lo expuesto, el objetivo de esta revisión fue analizar los avances recientes en el diseño, la fabricación y la caracterización de hidrogeles conteniendo bases inorgánicas, útiles para la encapsulación y la protección de probióticos ante condiciones gastrointestinales simuladas. Así como contrastar dicha información con los reportes que especifican un efecto bactericida de algunas de las bases inorgánicas usadas como reguladoras de pH al interior de microgeles.

3.4. Encapsulación como protección a bioactivos sensibles a pH

La encapsulación cumple diversas funciones como mejorar la estabilidad, maximizar la retención y controlar la liberación en el cuerpo humano de compuestos bioactivos. El desarrollo de la encapsulación en hidrogeles basados en biopolímeros es esencial para la

industria alimentaria debido a que los biopolímeros usados se encuentran dentro de la clasificación GRAS regulada por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos para su uso en materiales alimenticios (Burey *et al.*, 2008; FDA USA, 2016; Mendoza-Madrigal *et al.*, 2017). Los hidrogeles a base de biopolímeros que utilizan alginato, pectina, quitosano, almidón modificado o carragenina tienen una amplia gama de aplicaciones alimentarias, como los texturizantes en confitería, espesantes en sopas y salsas, y para la liberación lenta de sabores (Burey *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2018).

Los métodos de encapsulación más utilizados para la protección de los probióticos son la gelificación emulsificación-iónica (Chen y Chen, 2007; Kailasapathy, 2009; de Vos *et al.*, 2010), gelificación emulsificación-enzimática (Picot y Lacroix, 2003; Heidebach *et al.*, 2009a; Heidebach *et al.*, 2009b; Kailasapathy, 2002; Livney, 2010), secado por pulverización (Chen y Chen, 2007; Kailasapathy, 2009; de Vos *et al.*, 2010; Semyonov *et al.*, 2010), secado por congelación por aspersión (Wang *et al.*, 2006; Kailasapathy, 2009; Semyonov *et al.*, 2010; de Vos *et al.*, 2010; Zuidam y Shimoni, 2010), encapsulación por recubrimiento y aglomeración (Champagne y Fustier, 2007; Vos *et al.*, 2010) y encapsulación por el método de extrusión (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Sandoval-Castilla *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2019). Por otro lado, los materiales de pared que se utilizan con mayor frecuencia en estos métodos de encapsulación son alginato (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Mortazavian *et al.*, 2008; Sandoval-Castilla *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2019), κ -carrageenan (Chen y Chen, 2007; Gutiérrez-Zamorano *et al.*, 2018; Dafe *et al.*, 2017), goma gelana y goma xantana (Chen y Chen, 2007; Sultana *et al.*, 2000; Sun y Griffiths, 2000; Vega-Sagardía *et al.*, 2018), quitosano (Chávarri *et al.*, 2010; Mortazavian *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2017), almidón (Sajilata *et al.*, 2018; Anal y Singh, 2007; Mortazavian *et al.*, 2008; Ashwar *et al.*, 2018), gelatina (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Anal y Singh, 2007; Singh *et al.*, 2018), pectina (Sandoval-Castilla *et al.*, 2010; Vaziri *et al.*, 2018) y proteínas de leche (Livney, 2010; Heidebach *et al.*, 2009a; Heidebach *et al.*, 2009b).

El método de extrusión-gelificación es quizá uno de los más comúnmente usados y efectivos para producir cápsulas de hidrogel (Gombotz y Wee, 1998; Olivares-Romero *et al.*, 2018). En este método, una solución de biopolímero que contiene el compuesto

bioactivo se inyecta en otra solución de “endurecimiento” que promueve la gelación de biopolímeros. Este procedimiento resulta en la formación de cápsulas de hidrogel con bioactivos atrapados dentro de una matriz de biopolímero. Algunas estrategias potenciales para controlar la permeabilidad y tamaño de poro de la matriz del hidrogel, son controlar la cantidad de biopolímero y el agente de reticulación utilizado. Las cápsulas de hidrogel pueden recubrirse con capas de biopolímeros u otros materiales para alterar su permeabilidad (Zhang *et al.*, 2016).

El pH es una condición que determina las interacciones entre los biopolímeros de una manera favorable o no, que también puede modificar la naturaleza química de ciertos compuestos y/o degradar o disminuir la disponibilidad de estos. Por lo tanto, el pH es uno de los criterios más relevantes para el diseño de sistemas de protección de bioactivos; el principal método de protección utilizado como ya se ha mencionado es la encapsulación (Borgogna *et al.*, 2010), su función principal es proteger el compuesto encapsulado de las condiciones adversas del medio ambiente, como la luz, oxígeno y pH, por lo que es relevante determinar la composición del material de la pared, ya que debe estar de acuerdo con la naturaleza del agente bioactivo y el alimento que se agrega, asegurando así la estabilidad de la cápsula y por lo tanto del agente encapsulado.

La encapsulación se ha utilizado en varios bioactivos, entre los cuales se encuentran los microorganismos probióticos que se definen como "microorganismos vivos" que, cuando se agregan a un mínimo de 10^7 UFC g o mL^{-1} , ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped (Krasaekoopt, y Watcharapoka, 2014). El sitio activo de los probióticos es el colon (Araujo *et al.*, 2016) y la bioactividad de estos microorganismos es óptima a un pH cercano a 7 (Boylston *et al.*, 2004; Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; Tripathi y Giri, 2014; de Melo Pereira *et al.*, 2018; Florindo *et al.*, 2018; Holkem *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). Se han desarrollado varios sistemas de encapsulación con mezclas de biopolímeros que no dañan a los microorganismos y que mejoran su supervivencia. Sin embargo, estos sistemas tienen la desventaja de que todos son materiales porosos en mayor o menor grado, lo que permite el intercambio iónico y esto afecta directamente el pH interior de la cápsula y, por lo tanto, disminuye la bioactividad de los probióticos.

3.4.1. Bioactivos susceptibles al pH

Hoy en día, los hábitos de consumo de alimentos se han modificado y con esto, el desarrollo de la ciencia de los alimentos se ha adaptado a estos cambios, lo que ha dado como resultado la innovación de alimentos funcionales, esta funcionalidad se logra al agregar agentes bioactivos a los sistemas alimenticios, cuya función es proporcionar al consumidor un efecto fisiológico benéfico (Fernandes *et al.*, 2019). Los agentes bioactivos se pueden clasificar en moléculas bioactivas como agentes saborizantes, endulzantes, enzimas, colorantes y vitaminas y células vivas como probióticos (Fang y Bhandari, 2010). Sin embargo, algunos de los compuestos bioactivos son agentes inestables a factores ambientales luz, oxígeno, altas temperaturas y pH, entre otros, además de ser propensos a la degradación en condiciones gastrointestinales (Paulo y Santos, 2017).

Algunos agentes bioactivos tienen como principal factor de inestabilidad el pH, definido como el logaritmo decimal del contenido de la actividad del ion hidrógeno (Karastogianni *et al.*, 2017). Los bioactivos que presentan mayor daño a cambios drásticos de pH se presentan en el Cuadro 4, donde se enlistan los agentes, pH óptimo de acción y el pH al cual sufren daño o inactivación total o parcial.

Los cambios drásticos para estos compuestos bioactivos se presentan durante proceso cuando la matriz alimentaria a la que son incorporados tiene un pH naturalmente ácido, como en el caso de productos lácteos fermentados o jugos frutales, donde el pH es ~ 4 o menor (Iyer *et al.*, 2005; Krasaekoopt y Kitsawad, 2010; Krasaekoopt y Tandhanskul, 2008; Nualkaekul *et al.*, 2013), durante el proceso de encapsulación debido a que algunos procesos requieren pH ácido para que la formación de la pared de la cápsula se lleve a cabo, como en el caso de pectina de alto metoxilo donde se requiere un pH entre 2-2.5 para formar geles (Synytsya *et al.*, 2003; Braccini y Pérez, 2001; Bekhit *et al.*, 2016) o quitosano que requiere un pH ~ 3 para interaccionar y formar redes que conformen la pared de la cápsula (Cook *et al.*, 2012); finalmente, los bioactivos se someten a condiciones ácidas durante el consumo, ya que atraviesan por la fase gástrica, la cual varía de acuerdo a la salud del individuo, con una fluctuación de pH entre 1-2.5 (Iyer *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Urbanska *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Agentes bioactivos susceptibles a condiciones ácidas

Agente Bioactivo/ Referencia	pH de actividad	pH de
	optima	inactivación/Daño
Polifenol oxidasa de <i>Mauritia flexuosa</i> (de Oliveira Carvalho y Orlanda, 2017)	7	$2.0 \leq \text{pH} < 10$
β -galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i> (de Albuquerque <i>et al.</i> , 2016)	7	5
Lipasa pancreática (Zhang <i>et al.</i> , 2016)	7	1-2
Epoxicarotenoides (Saini y Keum, 2018)	7	< 4
Proteinasas (Korhonen, 2019)	5.5-6.5	< 4
<i>Lactococcus lactis</i> (Rodríguez-Figueroa <i>et al.</i> , 2010)	7	< 4.5
<i>Lactobacilli</i> sp. (Boylston <i>et al.</i> , 2004; Mattila-Sandholm <i>et al.</i> , 2002; Tripathi y Giri, 2014; de Melo Pereira <i>et al.</i> , 2018)	7	< 3.7
<i>Bifidobacterium</i> sp. (Florindo <i>et al.</i> , 2018; Holkem <i>et al.</i> , 2017; Zhang <i>et al.</i> , 2019)	6.5-7.5	< 3

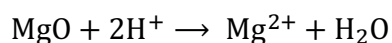
3.5. Uso de bases orgánicas

3.5.1. Matrices y bases orgánicas usadas para controlar el pH en microsistemas alimenticios

El sistema de protección ante condiciones ácidas para bioactivos es principalmente la encapsulación/entrampamiento a través de diferentes técnicas, la elección de los materiales y el tipo de acomplejamiento depende del sistema alimentario del cual formará parte y de la naturaleza misma del bioactivo. La encapsulación a diferentes escalas se define como un conjunto de técnicas que permiten el entrampamiento de ingredientes bioactivos (sólido, líquido o gas), también conocido como núcleo, utilizando un material de recubrimiento denominado material de revestimiento o pared (McClements, 2015; Keven y Meireles, 2014).

La selección del método y el material de la pared para la encapsulación de probióticos dependerá del costo, el tipo de microorganismo y el sistema al que se agregará; sin embargo, a pesar de que el desarrollo de los métodos de encapsulación ha sido muy estudiado, estos sistemas tienen una desventaja importante, las paredes de las cápsulas son materiales porosos que tienen poros de tamaños que van desde 100 Å a 1 µm (Mathiowitz *et al.*, 1999), lo que provoca un intercambio iónico con el medio ambiente y, por lo tanto, puede modificar el ambiente interno de las cápsulas, especialmente cuando las cápsulas pasan a través de los jugos gástricos, donde está presente un pH ácido.

Para lo anterior, se han desarrollado sistemas de encapsulación recientemente, combinados con la adición de una sustancia antiácida capaz de mantener el pH neutro cuando las cápsulas se someten a condiciones gástricas ácidas. Yao *et al.* (2018) investigaron la viabilidad de *Pediococcus pentosaceus* Li05 encapsulado en hidrogeles de alginato-pectina con y sin nanopartículas de óxido de magnesio (MgO) y concluyeron que cuando *P. pentosaceus* se encapsulaba con nanopartículas de MgO presentaba una mayor estabilidad. Por otro lado, Gu *et al.*, (2019) encapsularon *Bifidobacterium pseudocatenulatum* en alginato usando un antiácido CaCO₃ y Mg(OH)₂, encontrando que la mayor supervivencia después de condiciones gástricas estaba en las cápsulas que contenían los diferentes antiácidos, sin embargo, después de condiciones intestinales el sistema que mostró la mayor protección para *B. pseudocatenulatum* fue el alginato-CaCO₃. La diferencia que se presenta en la viabilidad de los probióticos después de ser sometidos a condiciones gastrointestinales simuladas se muestra en el Cuadro 5. El mecanismo de acción de las bases inorgánicas consiste en la baja solubilidad que presentan en condiciones neutras y que al ser sometidas a condiciones ácidas se solubilizan y actúan como buffer al neutralizar los iones hidrógeno, como se muestra en la siguiente reacción:



En el Cuadro 5 se puede observar que el resultado de disminución de ciclos Log depende tanto del microorganismo probiótico, como de la base inorgánica que este coencapsulada, puesto que para *P. Pentosaceus* que fue encapsulado en una matriz de alginato-gelatina se puede inferir que la adición de nanopartículas de MgO aunque mejora la viabilidad de las

bacterias, sin adicionar esta base con solo la matriz de protección se logra mantener la carga adecuada de *P. Pentosaceus* para ejercer su efecto probiótico. Por otro lado, en el caso de *B. pseudocatenulatum* donde la matriz de la cápsula fue de alginato, se observa claramente que ambas bases inorgánicas ejercen un incremento en la viabilidad del microorganismo, sin embargo, para el caso de $Mg(OH)_2$, la protección no mantiene la carga celular adecuada para ejercer su efecto probiótico.

Cuadro 5. Disminución de ciclos log de probióticos con y sin bases inorgánicas

Probiótico	Inicial	Después de	Disminución de ciclos Log
		condiciones gástricas Log ₁₀ CFU/MI	
<i>P. pentosaceus</i> sin nanopartículas de MgO (Yao <i>et al.</i> , 2018)	~ 9 ^z	~ 7 ^z	2
<i>P. pentosaceus</i> con nanopartículas de MgO (Yao <i>et al.</i> , 2018)	~ 9 ^z	~ 8.5 ^z	0.5
<i>P. pentosaceus</i> libres (Yao <i>et al.</i> , 2018)	~ 9 ^z	~ 0 ^z	9
<i>B. pseudocatenulatum</i> con $Mg(OH)_2$ (Gu <i>et al.</i> , 2019)	~ 9 ^z	~ 6.5 ^z	2.5
<i>B. pseudocatenulatum</i> con $CaCO_3$ (Gu <i>et al.</i> , 2019)	~ 9 ^z	~ 7.5 ^z	1.5
<i>B. pseudocatenulatum</i> control (Gu <i>et al.</i> , 2019)	~ 9 ^z	~ 9 ^z	9

^z Datos tomados de los gráficos de los artículos

Según los resultados obtenidos en las dos investigaciones mencionadas anteriormente, en las cuales se ha coencapsulado un microorganismo probiótico con una base inorgánica para controlar el pH al interior de la microcápsula, se puede deducir que es relevante determinar claramente el tipo de base a incluir en sistemas de microencapsulación, puesto que en algunos casos coadyuvan a incrementar la viabilidad de los probióticos, pero en otros casos puede disminuir la carga no a través del control del pH, si no más bien a través

de las especies químicas que se generan por la solubilización de estas bases inorgánicas que pueden generar compuestos citotóxicos.

3.5.2. Efecto antibacterial de bases orgánicas

El uso de bases inorgánicas coencapsuladas con microorganismos probióticos ha cobrado relevancia en los últimos años, su principal objetivo es incrementar la viabilidad de los microorganismos, existen investigaciones que revelan que las bases inorgánicas han sido usadas con éxito en la coencapsulación de estas con enzimas y vacunas (Zhang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2000; Marinina *et al.*, 2000; Jiang y Schwendeman, 2008) como el $Mg(OH)_2$ y nanopartículas de MgO , presentan un efecto antibacteriano, por lo cual, no serían adecuadas para la coencapsulación de probióticos.

Hikku y Vignesh-Kumar (2017), reportaron que las nanopartículas de MgO presentan efecto bactericida en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y que su efecto puede presentarse principalmente por dos vías: i) a través de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por las nanopartículas de MgO , las cuales interactúan con la membrana celular y desarrollan poros en la pared celular lo que incrementa la permeabilidad de la célula y que provoca finalmente la muerte de la bacteria; ii) por la inhibición del proceso de división celular por la penetración de iones Mg^{2+} liberados de la solubilización de nanopartículas de MgO , que interactúan con el genoma y enzimas de las bacterias.

Otras investigaciones que han reportado el efecto bactericida de bases orgánicas son las evidenciadas por Dong *et al.* (2010) quienes encontraron resultados satisfactorios de la actividad antibacterial de nanopartículas de $Mg(OH)_2$ contra *Escherichia coli* y *Burkholderia phytofirmans*; Krishnamoorthy *et al.* (2012) reportaron efectos bactericidas de nanopartículas de MgO contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; y Leung *et al.* (2013) también encontraron que las nanopartículas de MgO presentan efecto bactericida ante *Escherichia coli*.

Recientemente Arenales-Sierra *et al.* (2019), reportaron que altas concentraciones de $Mg(OH)_2$ inducían el despliegue de proteínas celulares que ponen en riesgo la viabilidad de *Lactobacillus casei*. Esto último sugiere que si bien el $Mg(OH)_2$ es capaz de aumentar

el pH dentro de las cápsulas con respecto al pH del ambiente externo, se debe determinar una concentración adecuada cuando se reduce o dificulta el desarrollo de la proteína. Puesto que a concentraciones mayores a 0.1 % (p/p) de $Mg(OH)_2$, se observan cambios en el crecimiento de *Lactobacillus casei*, lo cual fue atribuido a daños en pared celular de las bacterias, lo que daña directamente la biodisponibilidad de las bacterias probióticas.

3.6. Conclusión

El efecto que puede tener la adición de compuestos antiácidos en el interior de una cápsula, puede ser menos relevante cuando el sistema de encapsulación involucra un bioactivo "no vivo"; sin embargo, cuando las bacterias probióticas se encapsulan es importante corroborar que estas bases inorgánicas no afectan de ninguna manera la integridad de las bacterias, ya que aunque la viabilidad corresponde a una función probiótica, puede ocurrir que al llegar al colon las bacterias dañadas no ejerzan un efecto benéfico sobre el huésped.

Los estudios de encapsulación de probióticos con bases inorgánicas son recientes y limitados para los probióticos, por lo que se requiere una investigación más amplia sobre todos los cambios que se producen al agregar este tipo de sustancias, tanto en la red biopolimérica de las cápsulas para determinar el efecto en el comportamiento reológico y estructural de la cápsula, así como en la pared celular de los microorganismos y, por lo tanto, el daño por presión osmótica, si existiera.

3.7. Agradecimientos

El primer autor agradece el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar el Doctorado en Ciencias Agroalimentarias dentro del programa de doctorado de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.8. Referencias

- Abae, A., Mohammadian, M., & Mahdi, S. (2017). Trends in Food Science & Technology Whey and soy protein-based hydrogels and nano-hydrogels as bioactive delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 70(June), 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.011>
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240–251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>
- Araújo, M. De, Carine, G., José, A., Marlon, É., Flores, M., Smanioto, J., Queiroz, L., Jacob-Lopes, E., Ferreira, C., & Menezes, D. (2016). Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *Journal of Functional Foods*, 21, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.025>
- Arenales-Sierra, I. M., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., Hernández-Rodríguez, L., & Alvarez-Ramírez J. (2019). Calcium alginate beads loaded with Mg(OH)₂ improve *L. casei* viability under simulated gastric condition. *LWT - Food Science and Technology*. In press
- Ashwar, B. A., Gani, A., Gani, A., Shah, A., & Masoodi, F. A. (2018). Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. *Food Chemistry*, 239, 287–294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.110>
- Bekhit, M., Sánchez-González, L., Ben Messaoud, G., & Desobry, S. (2016). Encapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on alginate/pectin composite microbeads: Effect of matrix composition on bacterial survival and nisin release. *Journal of Food Engineering*, 180, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.031>
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., & Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.043>
- Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., & Reinheimer, J. A. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14(5), 375–387. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2003.08.008>
- Braccini, I., & Pérez, S. (2001). Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules* 2 (4), 1089–1096. DOI: 10.1021/bm010008g
- Burey, P., Bhandari, B. R., Howes, T., & Gidley, M. J. (2008). Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 361–377. <https://doi.org/10.1080/10408390701347801>

- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184–190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001>
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & Villarán, M. del C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1), 185–189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022>
- Chen, M. & Chen, K. (2007). Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products. In *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, J. M. Lakkis (Ed.). doi:10.1002/9780470277881.ch4
- Chen, H., Ouyang, W., Jones, M., Metz, T., Martoni, C., Haque, T., Cohen, R., Lawuyi, B., & Prakash, S. (2007). Preparation and characterization of novel polymeric microcapsules for live cell encapsulation and therapy. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 47, 159-168.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162, 56–67. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.06.003
- Dafe, A., Etemadi, H., Zarredar, H., & Mahdavinia, G. R. (2017). Development of novel carboxymethyl cellulose/k-carrageenan blends as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 299–307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.016>
- de Albuquerque, T. L., Peirce, S., Rueda, N., Marzocchella, A., Gonçalves, L. R. B., Rocha, M. V. P., & Fernandez-Lafuente, R. (2016). Ion exchange of β -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. *Process Biochemistry*, 51(7), 875–880. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.014>
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060–2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
- de Oliveira Carvalho, J., & Orlanda, J. F. F. (2017). Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract. *Food Chemistry*, 233, 159–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.101>
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292–302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>
- Dong, Ch., Cairney, J., Sun, Q., O. L., Maddan, He, G., & Deng, Y. (2010). Investigation of $Mg(OH)_2$ nanoparticles as an antibacterial agent. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 2101–2109. DOI: 10.1007/s11051-009-9769-9

- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
- Fernandes, S. S., Coelho, M. S., & Salas-Mellado, M. de las M. (2019). Chapter 7 - Bioactive Compounds as Ingredients of Functional Foods: Polyphenols, Carotenoids, Peptides From Animal and Plant Sources New. In M. R. S. B. T.-B. C. Campos (Ed.) (pp. 129–142). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00007-4>
- Florindo, R. N., Souza, V. P., Manzine, L. R., Camilo, C. M., Marana, S. R., Polikarpov, I., & Nascimento, A. S. (2018). Structural and biochemical characterization of a GH3 β -glucosidase from the probiotic bacteria *Bifidobacterium adolescentis*. *Biochimie*, 148, 107–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.03.007>
- Gombotz, W. R., & Wee, S. (1998). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31(3), 267–285. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00124-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00124-5)
- Gu, M., Zhang, Z., Pan, C., Goulette, T. R., Zhang, R., Hendricks, G., McClements, D. J., & Xiao, H. (2019). Encapsulation of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G7 in gastroprotective microgels: Improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 91, 283–289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.040>
- Guo, J., Giusti, M. M., & Kaletunç, G. (2018). Encapsulation of purple corn and blueberry extracts in alginate-pectin hydrogel particles: Impact of processing and storage parameters on encapsulation efficiency. *Food Research International*, 107(July 2017), 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.035>
- Gutiérrez-Zamorano, C., González-Ávila, M., Díaz-Blas, G., Smith, C. T., González-Correa, C., & García-Cancino, A. (2018). Increased anti-*Helicobacter pylori* effect of the probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain encapsulated in carrageenan evaluated in gastric simulations under fasting conditions. *Food Research International*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.064>
- He, H., Zhang, X., & Sheng, Y. (2014). Enteric-coated capsule containing β -galactosidase-loaded polylactic acid nanocapsules: enzyme stability and milk lactose hydrolysis under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Dairy Research*, 81(4), 479–484. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0022029914000491>
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009a). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1670–1677. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.006>
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009b). Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19(2), 77–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.08.003>

- Hikku, G. S., K., J., & Vignesh Kumar, S. (2017). Nanoporous MgO as self-cleaning and anti-bacterial pigment for alkyd based coating. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 52, 168–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.03.040>
- Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Barin, J. S., Moraes Flores, É. M., Muller, E. I., Codevilla, C. F., Jacob-Lopes, E., Ferreira, G. C. R., & de Menezes, C. R. (2017). Production of microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 216–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.013>
- Iyer, C., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2005). Release studies of *Lactobacillus casei* strain Shirota from chitosan-coated alginate-starch microcapsules in vivo porcine gastrointestinal contents. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 493-497. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01778.x
- Jiang, W., & Schwendeman, S. P. (2008). Stabilization of tetanus toxoid encapsulated in PLGA microspheres. *Molecular Pharmaceutics*, 5(5), 808–817. DOI: 10.1021/mp800027f
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 3 (2):39–48.
- Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews : Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4(33), 1-19. DOI: 10.1079/PAVSNNR20094033
- Karastogianni, S., Girousi, S., & Sotiropoulos, S. (2017). *pH: Principles and Measurement. Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00538-9>
- Keven, S. E., & Meireles, M. A. A. (2014). Encapsulation of Food Compounds Using Supercritical Technologies : Applications of Supercritical Carbon Dioxide as an Antisolvent, 4(5), 247–258. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20140405.06>
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177–187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007>
- Krasaekoopt, W., & Kitsawad, K. (2010). Sensory characteristics and consumer acceptance of fruit juice containing probiotics beads in Thailand. *Assumption University Journal of Technology*, 14(1), 33-38.
- Krasaekoopt, W., & Tandhanskul, A. (2008). Sensory and acceptance assessment of yogurt containing probiotic beads in Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 42, 99-106.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
- Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate

- beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 761–766. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.037>
- Krishnamoorthy, K., Manivannan, G., Kim, S.J., Jeyasubramanian, K., & Premanathan, M. (2012). Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy. *J Nanopart Res* 14: 1063.
- Leung, Y. H., Ng, A. M., Xu, X., Shen, Z., Gethings, L. A., Wong, M. T., Chan, C. M., Guo, M. Y., Ng, Y. H., Djurišić, A. B., Lee, P. K., Chan, W. K., Yu, L. H., Phillips, D. L., Ma, A. P., & Leung, F. C. (2013). Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small*. 2014 Mar 26;10(6):1171-83. doi: 10.1002/sml.201302434
- Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1), 73–83. [doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002](https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002)
- Ma, D., Tu, Z.-C., Wang, H., Zhang, Z., & McClements, D. J. (2018). Microgel-in-Microgel Biopolymer Delivery Systems: Controlled Digestion of Encapsulated Lipid Droplets under Simulated Gastrointestinal Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(15), 3930–3938. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00132>
- Marinina, J., Shenderova, A., Mallery, S. R., & Schwendeman, S. P. (2000). Stabilization of vinca alkaloids encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharmaceutical Research*, 17, 677–683.
- Mathiowitz, E., Kreitz, M.R., & Brannon-Peppas, L. (1999). Microencapsulation. E. Mathiowitz (Ed.), *Encyclopedia of controlled drug delivery*, John Wiley and Sons, New York (1999), pp. 493-553
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00099-1)
- Mendoza-Madrigal A.G., Durán-Páramo E., Valencia del Toro G., Chanona-Pérez J.J., Martínez-Ramírez O. C. & Arzate-Vázquez I. (2017). Viability kinetics of free *Bifidobacterium bifidum* in presence of food samples under gastrointestinal *in vitro*. *Revista Mexicana de Ingeniera Química*. Vol. 16, No. 1 (2017) 159-168
- McClements, D. J. (2015). Nanoscale Nutrient Delivery Systems for Food Applications: Improving Bioactive Dispersibility, Stability, and Bioavailability. *Journal of Food Science*, 80(7), N1602–N1611. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12919>
- McClements, D. J. (2017). Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. *Advances in Colloid and Interface Science*, 240, 31–59. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.12.005>
- McClements, D. J. (2018). Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals. *Biotechnology Advances*, (May), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.004>

- Mortazavian, A. M., Azizi, A., Ehsani, M. R., Razavi, S. H., Mousavi, S. M., Sohrabvandi, S. and Reinheimer, J. A. (2008). Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink Doogh after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft* **63**(4):427–429.
- Nualkaekul, S., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Research International*, **53**(1), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.019>
- Olivarez-Romero, R., Faustino-Vega, A., Miranda-Calderon, J. E., González-Vázquez, R., & Azaola-Espinosa, A. (2018). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 increases relative survival under simulated gastrointestinal tract stress. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*. Vol. 17, No. 2 (2018) 641-650 doi.org/10.24275/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n2/Olivarez
- Okuro, P. K., Furtado, G. F., Sato, A. C. K., & Cunha, R. L. (2015). ScienceDirect Structures design for protection and vehiculation of bioactives. *Current Opinion in Food Science*, **5**, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.003>
- Paulo, F., & Santos, L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science & Engineering C*, **77**, 1327–1340. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>
- Picot, A., & Lacroix, C. (2003). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, **14**, 515. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.008>
- Rodríguez-Figueroa, J. C., Reyes-Díaz, R., González-Córdova, A. F., Troncoso-Rojas, R., Vargas-Arispuro, I., & Vallejo-Cordoba, B. (2010). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*, **93**(11), 5032–5038. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2010-3103>
- Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, **240**, 90–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- Sajilata, M. , Singhal, R. S. & Kulkarni, P. R. (2006). Resistant Starch—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **5**: 1-17. doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00076.x
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, **43**(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.010>
- Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*, **43**(1), 193–202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.028>

- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science and Technology*, 78(December 2017), 34–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>
- Singh, P., Medronho, B., Alves, L., da Silva, G. J., Miguel, M. G., & Lindman, B. (2017). Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro- and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 175, 87–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.119>
- Singh, P., Medronho, B., Miguel, M. G., & Esquena, J. (2018). On the encapsulation and viability of probiotic bacteria in edible carboxymethyl cellulose-gelatin water-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 75, 41–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.014>
- Su, Y., Gu, L., Zhang, Z., Chang, C., Li, J., McClements, D. J., & Yang, Y. (2019). Encapsulation and release of egg white protein in alginate microgels: Impact of pH and thermal treatment. *Food Research International*, 120(December 2018), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.048>
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1), 47–55. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00380-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00380-9)
- Sun, W., & Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan–xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1), 17–25. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00327-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00327-5)
- Synytsya, A., Čopíková, J., Matějka, P., & Machovič, V. (2003). Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 54(1), 97–106. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00158-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00158-9)
- Tripathi M. K., & Giri S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Urbanska, A. M., Bhathena, J., & Prakash, S. (2007). Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yogurt for therapeutic oral delivery: preparation and in vitro analysis of alginate-chitosan microcapsules. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85(9), 884–893. DOI: 10.1139/Y07-057
- Vaziri, A. S., Alemzadeh, I., Vossoughi, M., & Khorasani, A. C. (2018). Co-microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 199, 266–275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.002>
- Vega-Sagardía, M., Rocha, J., Sáez, K., Smith, C. T., Gutierrez-Zamorano, C., & García-Cancino, A. (2018). Encapsulation, with and without oil, of biofilm forming *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain in alginate-xanthan gum and its anti-

- Helicobacter pylori* effect. *Journal of Functional Foods*, 46, 504–513. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.067>
- Wang, Z. L., Finlay, W. H., Peppler, M. S., & Sweeney, L. G. (2006). Powder formation by atmospheric spray-freeze-drying. *Powder Technology*, 170(1), 45–52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.powtec.2006.08.019>
- Yao, M., Li, B., Ye, H., Huang, W., Luo, Q., Xiao, H., McClements, D. J., & Li, L. (2018). Enhanced viability of probiotics (*Pediococcus pentosaceus* Li05) by encapsulation in microgels doped with inorganic nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 83, 246–252. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.05.024>
- Zhang, Z., Chen, F., Zhang, R., Deng, Z., & McClements, D. J. (2016). Encapsulation of Pancreatic Lipase in Hydrogel Beads with Self-Regulating Internal pH Microenvironments: Retention of Lipase Activity after Exposure to Gastric Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(51), 9616–9623. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04644>
- Zhang, Z., Zhang, R., & McClements, D. J. (2017). Lactase (β -galactosidase) encapsulation in hydrogel beads with controlled internal pH microenvironments: Impact of bead characteristics on enzyme activity. *Food Hydrocolloids*, 67, 85–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.005>
- Zhang, C., Yu, Z., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2019). Colonization and probiotic function of *Bifidobacterium longum*. *Journal of Functional Foods*, 53, 157–165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.022>
- Zhu, G., Mallery, S. R., & Schwendeman, S. P. (2000). Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide). *Nature Biotechnology*, 18, 52. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/71916>
- Zuidam, N. J., & Shimon, E. (2010). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them BT - Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. In N J Zuidam & V. Nedovic (Eds.) (pp. 3–29). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0_2

4. INCREMENTO DE LA VIABILIDAD DE *L. casei* CON CÁPSULAS DE ALGINATO-Mg(OH)₂ EN CONDICIONES GÁSTRICAS SIMULADAS/ CALCIUM ALGINATE BEADS LOADED WITH Mg(OH)₂ IMPROVE *L. casei* VIABILITY UNDER SIMULATED GASTRIC CONDITION

4.1 Resumen

Las cápsulas de alginato se usan comúnmente para proteger probióticos contra condiciones ambientales adversas. Sin embargo, las cápsulas de alginato son incapaces de proporcionar una viabilidad celular completa en condiciones de pH gástrico rigurosas. Este trabajo consideró la incorporación de partículas de Mg(OH)₂ en la formulación de cápsulas de alginato para mejorar la viabilidad de *L. casei* en condiciones gástricas. Para este fin, se agregó solución de ácido algínico (0.5 g / 100 g) con diferentes concentraciones (0.0, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 g / 100 g de alginato) de Mg(OH)₂ y una carga celular de $10.56 \pm 0.1 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de *L. casei*. Las cápsulas se formaron goteando una parte de las suspensiones anteriores respectivas en diez partes de solución de CaCl₂ 0.68 mol/L. El análisis SEM mostró que las células de *L. casei* estaban atrapadas efectivamente en las cápsulas. El análisis FTIR indicó que las altas concentraciones de Mg(OH)₂ inducían el despliegue de proteínas celulares que ponían en riesgo la viabilidad de los probióticos. Esto último sugiere que si bien el Mg(OH)₂ es capaz de aumentar el pH dentro de las cápsulas con respecto al pH del ambiente externo, una concentración adecuada podría determinar cuando el desdoblamiento de proteínas de probióticos es reducida o detenida. El análisis de viabilidad de *L. casei* mostró que una concentración de alrededor de 0.1 g de Mg(OH)₂/100 g de alginato maximizaba el recuento celular en condiciones gástricas simuladas.

Palabras clave: cápsulas de alginato de calcio; hidróxido de magnesio; *L. casei*; protección gástrica; pH.

4.2. Abstract

Alginate beads are commonly used for protection of probiotics against adverse environmental conditions. However, alginate beads are unable to provide complete cell viability under stringent gastric pH conditions. This work considered the incorporation of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ particles in the formulation of alginate beads to enhance the viability of *L. casei* under gastric conditions. To this end, alginic acid solution (0.5 g/100 g) was added with different concentrations (0.0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 g/100 g alginate) of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ and a cell load of 10.56 ± 0.1 log CFU/g of *L. casei*. The beads were formed by dripping one part of the respective former suspensions into ten parts of 0.68 mol/L CaCl_2 solution. SEM analysis showed that *L. casei* cells were effectively entrapped in the beads. FTIR analysis indicated that high $\text{Mg}(\text{OH})_2$ concentrations induced unfolding of cell proteins risking the viability of the probiotics. The latter suggests that while $\text{Mg}(\text{OH})_2$ is able to increase the pH within the beads respect the pH of the external environment, a suitable concentration should be determined where protein unfolding is reduced or hindered. *L. casei* viability analysis showed that a concentration of about 0.1 g $\text{Mg}(\text{OH})_2$ /100 g alginate maximized the cell count under simulated gastric condition.

Key words: calcium alginate beads; magnesium hydroxide; *L. casei*; gastric protection; pH

4.3. Introducción

La microencapsulación es un proceso mediante el cual las partículas individuales de agentes bioactivos se recubren con una película continua de material polimérico para la protección contra condiciones ambientales adversas (pH, temperatura oxígeno, gastrointestinal, procesamiento, entre otros). Además, la microencapsulación es útil para la liberación controlada en sitios específicos para que las sustancias bioactivas puedan llevar a cabo su función (Basu, Banerjee, Chowdhury, & Bhattacharya, 2018; Silva, Cezarino, Michelon, & Sato, 2018). El biopolímero utilizado como material de pared es un factor importante para determinar la eficiencia de encapsulación, la estabilidad y las propiedades funcionales de las microcápsulas (Kandansamy y Somasundaram, 2012). Alginato, quitosano, carboximetilcelulosa, goma xantana, almidón, carragenina, gelatina y pectina, se han utilizado en diversas aplicaciones alimenticias (Kandansamy y Somasundaram, 2012; Shori, 2017). Sin embargo, el alginato es el biomaterial más utilizado en la microencapsulación o inmovilización de bacterias probióticas, debido a su biocompatibilidad, bajo costo, no toxicidad y buena estabilidad en condiciones ácidas (Cook, Tzortzis, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy, 2014; Basu *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). El alginato es un polisacárido aniónico aislado principalmente de algas pardas. Es un copolímero lineal de unidades de ácido β -D -manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) conectadas a través de enlaces $\beta 1 \rightarrow 4$ glicosídicos. Los residuos M y G se distribuyen en bloques homopoliméricos de bloques M o G o bloques de heteropolímeros que alternan residuos M y G (Hecht y Srebnik, 2016). El alginato puede formar hidrogeles en presencia de calcio divalente debido a la reticulación entre los bloques G por Ca^{+2} , lo que da lugar a una red tridimensional conocida como "egg box model". La estructura tridimensional de cadenas ricas en ácidos gulurónicos genera distancias entre los grupos carboxilo e hidroxilo que permiten un alto grado de coordinación de los iones de calcio (Chuah, Kuroiwa, Kobayashi, Zhang & Nakajima, 2009; Agüero, Zaldivar-Silva, Peña, & Dias, 2017). Los hidrogeles de alginato tienen una amplia gama de aplicaciones que incluyen inmovilización de enzimas, liberación controlada de fármacos, microencapsulación de probióticos y antioxidantes, etc (Lozano-Vázquez *et al.*, 2015; Basu *et al.*, 2018; Ozkan, Franco, De Marco, Xiao & Capanoglu, 2019). Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se

administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud al huésped (Hill *et al.*, 2014). Una ingesta diaria de 10^8 - 10^9 microorganismos probióticos es esencial para lograr una acción probiótica en el organismo humano (Knorr, 1998). Las especies probióticas de bacterias ácido-lácticas (por ejemplo, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium*) tienen una larga historia de uso seguro (de Melo-Pereira, de Oliveira-Coelho, Magalhães-Júnior, Thomaz-Soccol, & Soccol, 2018). Varios factores afectan la viabilidad de los probióticos, incluidas las condiciones ambientales, de procesamiento y almacenamiento, entre otros. Los probióticos deben poder sobrevivir a su tránsito a través de condiciones gastrointestinales, especialmente durante la fase gástrica donde el pH puede disminuir a un valor de 1. Por ejemplo, la cepa *Lactobacilli* crece y sobrevive sin presentar una disminución en la viabilidad en un rango de pH entre 3.7 y 7.0 (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; Tripathi & Giri, 2014).

La encapsulación/entrapamiento de probióticos dentro de una matriz de hidrogel obtenida por el entrecruzamiento de cadenas de alginato en presencia de Ca^{+2} (es decir, gelificación iónica) se ha utilizado ampliamente en la industria alimentaria (Sandoval-Castilla, Lobato-Calleros, García-Galindo, Álvarez-Ramírez, y Vernon-Carter, 2010; Shori, 2017; Basu *et al.*, 2018). Sin embargo, los hidrogeles de alginato son altamente permeables debido a su carácter hidrófilo y su estructura porosa (4-400 nm), tienden a tener propiedades de barrera deficientes, lo que permite el intercambio de iones y moléculas con los medios circundantes (Chan y Neufeld, 2009; Silva *et al.*, 2018). Estas características estructurales pueden considerarse un inconveniente en la microencapsulación de bioactivos lábiles al pH, ya que el pH interno de las cápsulas tenderá al de la solución circundante (Zhang, Zhang, Sun, Park y McClements, 2017). Para superar este problema, la inclusión de ciertos tipos de agentes tamponadores con baja solubilidad en agua, como $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, MgCO_3 , $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnCO_3 , $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, ácido benzoico, o una combinación que comprende al menos uno de los anteriores ha sido propuesta. De esta manera, los iones H^+ se pueden neutralizar y se puede mantener un pH básico dentro de los microgeles, incluso cuando están suspendidos en fluidos gástricos (Zhang *et al.*, 2017a; McClements, Zhang, & Zhang, 2018). La suspensión de MgO en polvo e $\text{Mg}(\text{OH})_2$ exhiben acción antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sawai *et al.*, 2010, Dong *et al.*, 2012). El $\text{Mg}(\text{OH})_2$ se

ha utilizado para controlar el pH interno en microsistemas que contienen albúmina de suero bovino (Zhu, Mallery y Schwendeman, 2000), lipasa pancreática (Zhang, Chen, Zhang, Deng, & McClements et al., 2016), sulfato de vincristina y sulfato de vinblastina (Marinina *et al.*, 2000) así como toxoide tetánico (Jiang & Schwendeman, 2008). Yao *et al.* (2018) encontraron que *Pediococcus pentosaceus* Li05 encapsulado en microgeles de gelatina-alginato cargados con nanopartículas de MgO sufrió solo una disminución de 2 ciclos logarítmicos de UFC en comparación con la disminución de 5 ciclos logarítmicos de UFC de las bacterias libres cuando se puso en contacto con el fluido gástrico. Este efecto fue atribuido a la neutralización de iones de hidrógeno por las nanopartículas de MgO. No obstante, los efectos de diferentes concentraciones de MgO o su forma hidratada de $Mg(OH)_2$ sobre la viabilidad de los probióticos encapsulados se han investigado poco.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las características de la textura, las propiedades térmicas y el posible daño estructural de *L. casei* atrapado en cápsulas de alginato de calcio con diferentes concentraciones de $Mg(OH)_2$, y la viabilidad de las células cuando son sometidas a condiciones gástricas simuladas.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Materiales

Ácido algínico de algas marrones (*Macrocystis pyrifera*) (número CAS 9005-32-7) y pepsina de mucosa gástrica porcina (polvo, ≥ 250 unidades / mg de sólido) se compraron en Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Hidróxido de magnesio ($Mg(OH)_2$) se obtuvo de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EE. UU.). El caldo De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) y el agar MRS *Lactobacilli* se adquirieron de DIFCO (Becton, Dickinson and Company Sparks, La Pont de Claix, Francia). El glutaraldehído se adquirió en Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, EE. UU.). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico y en todos los casos se utilizó agua doblemente desionizada (ADD).

4.4.2. Cultivo de bacterias y preparación de concentrado celular

Se propagó un gramo de cultivo liofilizado de *L. casei* LBC81 LYO (Danisco, Dange Saint Romain, Francia) en 100 mL de caldo MRS estéril durante 20 horas a 37 °C. Las células obtenidas se subcultivaron dos veces en caldo MRS estéril durante 20 horas a 37 °C. Finalmente, en la tercera reactivación, las células se recolectaron mediante centrifugación a $4000 \times g$ durante 10 minutos (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se lavaron dos veces con 20 mL de solución fisiológica (0.85 g salina/100 mL ADD) y se suspendieron en 2 mL de esta misma solución. El concentrado celular se almacenó a 4 °C hasta su uso y se determinó el recuento celular en placas de agar MRS estéril a 37 °C durante 72 h (Li, Jiang, Chen, Wang y Lin, 2014).

4.4.3. Variaciones de cápsulas

Las soluciones iniciales de ácido algínico (0.5 g/100 g) se prepararon en tampón fosfato (5 mmol/L, pH 7.0) (Zhang *et al.*, 2017a), se almacenaron a 4 °C durante 24 h para permitir la hidratación completa y luego se agregó $Mg(OH)_2$ (0, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 g/100 g) agitándose durante 15 min. Posteriormente, las dispersiones de polímeros se esterilizaron (121 °C, 15 min), se enfriaron a 4 °C y se mezclaron con el concentrado celular en una relación de volumen de 9:1, obteniendo las suspensiones celulares (SC) con una carga celular de 10.56 ± 0.1 log UFC/g, determinado por incubación a 37 °C durante 72 h en una placa de agar MRS (Herigstad, Hamilton y Heersink, 2001). Las cápsulas se formaron goteando una parte de la SC respectiva en diez partes de solución de $CaCl_2$ estéril 0.68 mol/L utilizando una aguja de 0.6 mm (31 G) (Sandoval-Castilla *et al.*, 2010). Las cápsulas formadas se mantuvieron en la solución de Ca^{2+} durante 30 minutos a temperatura ambiente para promover la reticulación del alginato, y finalmente se lavaron tres veces con ADD y se almacenaron a 4 °C. Las cápsulas se codificaron como B_x, donde el subíndice "x" denota la concentración de $Mg(OH)_2$.

4.4.4. Mediciones de textura

Las variaciones de las cápsulas se sometieron a un análisis del perfil de textura (TPA) utilizando un analizador de texturas CT3 Brookfield (AMETEK Brookfield, Middleboro,

MA, EE. UU.). Cada medición se realizó a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) en 10 g de cada variación de cápsulas fue colocada en una placa de vidrio debajo de la sonda de acuerdo con Sandoval-Castilla *et al.* (2010). La fuerza de contacto inicial entre la sonda y las cápsulas fue de 0.005 N, se aplicaron dos ciclos de compresión al 30% a una velocidad constante de la sonda de 0.5 mm/s. Las propiedades de textura de dureza, cohesión, elasticidad y adhesividad (Sandoval-Castilla *et al.*, 2010; Choonara, Pillay, Singh, Khan y Ndesendo, 2008) se obtuvieron utilizando el equipo TexturePro CT Build Software para Windows versión 1.6.

4.4.5. Microscopía electrónica de barrido

Las muestras de cápsulas se fijaron en una solución de 2 mL de glutaraldehído/100 mL de tampón fosfato (0.1 mol/L, pH 7.2) durante 6 h. Posteriormente, se deshidrataron en soluciones de etanol de concentraciones crecientes (50, 60, 70, 80, 90 y 100 mL/100 mL), permaneciendo 30 min en cada una. Las cápsulas fijas se secaron en un secador de punto crítico CPA II Technics (Tousimis, Rockville, MD, EE. UU.), se montaron en soportes de aluminio y finalmente se cubrieron con una capa delgada de oro en un Sputter Ion de capa fina, JFC 1100 (Jeol Ltd. , Akishima, Japón) (Hernández-Rodríguez, Lobato-Calleros, Pimentel-González, y Vernon-Carter, 2014). Se observaron cápsulas fracturadas en un microscopio de exploración electrónica (SEM) (HITACHI-SU1510, Tokio, Japón), operado a 15 kV con un aumento de 6000 y 30000 $\times$. Se obtuvieron valores discretos de radios de las cavidades de alginato nombradas como radio de poro relativo (rpr) a partir de micrografías SEM con un aumento de 30000 $\times$ (Leal-Egaña, Dietrich-Braumann, Díaz-Cuenca, Nowicki, & Bader, 2011). Se procesaron seis micrografías de cada variación de cápsulas con el software ImageJ (1.50I, imagej.nih.gov). La segmentación se realizó mediante binarización, posteriormente se eliminó el ruido suavizando los bordes, y las micrografías SEM preprocesadas se dividieron para revelar las cavidades. Finalmente se determinó el radio de poro relativo utilizando un modelo de transformación de distancia de imagen euclidiana.

4.4.6. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR se obtuvieron utilizando un Spectrum 100 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) equipado con un accesorio de muestreo ATR universal de cristal de diamante. La velocidad del espejo fue de 0.3 cm/s. Antes de cada medición, el cristal ATR fue cuidadosamente limpiado con etanol. Durante la medición, la muestra estuvo en contacto con la placa superior universal de diamante ATR. Se usó un espectro de la celda vacía como fondo. La medición se realizó en un intervalo de 400-4000 cm^{-1} .

4.4.7. Análisis termogravimétrico

La estabilidad térmica de las cápsulas se analizó de acuerdo con la descripción realizada por Lozano-Vázquez *et al.* (2015) y Lim y Ahmad (2017), utilizando un TGA 4000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) equipado con un accesorio de muestreo ATR universal de cristal de diamante. Se realizó una exploración de temperatura de 0 a 300 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min bajo flujo de gas nitrógeno. El soporte de la muestra utilizado fue una bandeja de aluminio.

4.4.8. Viabilidad de *L. casei* encapsulado en jugo gástrico simulado

Se preparó un litro de solución madre gástrica simulada mediante la adición de cloruro de sodio (2 g) y 6 mol/L de ácido clorhídrico (7 mL) a ADD. Posteriormente se añadió pepsina extraída de mucosa gástrica porcina (0.064 g) a la solución de reserva gástrica (200 mL). Esta solución se preparó 40 minutos antes de que comenzara la fase estomacal, y el pH se ajustó a 2.5-2.6 (Yeung, Üçok, Tiani, McClements y Sela, 2016). Las células libres y encapsuladas se sometieron a jugo gástrico simulado. La simulación con células libres se llevó a cabo con una alícuota de 2 mL del cultivo de 18 h, que se añadió a 2 mL de jugo gástrico simulado. Para determinar la viabilidad de *L. casei* encapsulado en jugo gástrico simulado, se colocaron por separado 2 g de cada variación de cápsulas recién preparadas en tubos de ensayo que contenían 2 mL de solución gástrica simulada. Para todas las pruebas, las suspensiones se incubaron a 37 °C durante 2 h en una incubadora de agitación continua (Incubadora en incubadora New Brunswick Scientific Excella E24, Hamburgo, Alemania). Posteriormente, el sobrenadante y las cápsulas se separaron por

centrifugación a $4000 \times g$ durante 10 min. Se enumeraron las células viables de *L. casei* en el cultivo libre, las cápsulas recién preparadas (recuento inicial) y las que permanecen en las cápsulas después de condiciones gástricas simuladas. Las cápsulas se suspendieron en una solución de citrato de sodio (10 g/100 g) en una proporción de 1:10, seguido de agitación suave a temperatura ambiente hasta su completa desintegración, para liberar las células encapsuladas de *L. casei*. El número de células viables en las suspensiones se determinó posteriormente por recuento en placa utilizando MRS como se describió anteriormente, y la eficiencia de encapsulación (EE) se calculó como se describe en Farias *et al.* (2019).

4.4.9. Mediciones de tamaño, pH y potencial zeta (ζ)

Las cápsulas se diluyeron en ADD a una concentración de 0.01 g/100 g, y su diámetro volumétrico medio ($D_{4,3}$) se determinó mediante mediciones de dispersión de luz estática (Mastersizer 3000, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) (Yeung *et al.*, 2016). El pH del medio acuoso externo de las cápsulas (sobrenadante) se midió a temperatura ambiente por triplicado (potenciómetro de pH 120, Conductronic, Puebla, México). El potencial de superficie (potencial ζ) de las variaciones de las cápsulas recién elaboradas y después del tratamiento gástrico se midió utilizando un dispositivo automatizado de electroforesis capilar (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) utilizando el modelo de Smoluchowski (Yeung *et al.*, 2016). Previamente, las variaciones de cápsulas recogidas después del tratamiento gástrico se diluyeron en ADD en una proporción de 1:50 (v/v).

4.4.10. Análisis de la información

Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado a partir de tres experimentos independientes para cada variación de cápsulas utilizando un diseño experimental completamente al azar. Los datos correspondientes a las características de las cápsulas se sometieron a un análisis de varianza de clasificación simple y siempre que fue adecuado con la prueba de Tukey. La significancia se estableció en $p \leq 0.05$. El software IBM® SPSS Statistics fue utilizado para el análisis de datos.

4.5. Resultados y discusión

4.5.1. Morfología interna de las cápsulas fracturadas por SEM

El $D_{4,3}$ de las cápsulas tendió a aumentar a medida que la concentración de $Mg(OH)_2$ fue mayor, pero no significativamente diferente, variando de $309.30 \pm 21.48 \mu m$ para B_0 a $334.40 \pm 29.35 \mu m$ para $B_{0.4}$. El tamaño de las cápsulas es importante ya que gran cantidad de células microbianas (típicamente 1-4 μm) limita la carga celular para cápsulas pequeñas (Sandoval-Castilla *et al.*, 2010). Yao *et al.* (2018) reportaron un diámetro de alrededor de 500 μm para cápsulas de alginato-gelatina que contenían células de *Pediococcus pentosaceus* Li05 y MgO . Por otro lado, Gu *et al.* (2019) informaron valores de diámetro de 540 y 665 μm para microgeles de alginato que contienen *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G7 y $Mg(OH)_2$ o $CaCO_3$, respectivamente. Los tamaños más pequeños de las cápsulas de alginato obtenidas en este trabajo podrían deberse a la menor concentración total de biopolímero (0.5 g / 100 g) utilizada para hacer nuestras cápsulas en comparación con los 2 g / 100 mL utilizados por los autores mencionados anteriormente. Sandoval-Castilla *et al.* (2010) utilizaron diferentes concentraciones de biopolímeros totales al fabricar cápsulas de alginato-pectina y encontraron que a medida que aumentaba la concentración total de biopolímeros, aumentaba el diámetro de las cápsulas.

L. casei es una bacteria corineforme con dimensiones de $0.7-1.1 \times 2.0-4.0 \mu m$, con una tendencia a formar cadenas sin movimiento (Erdoğan y Erbilir, 2006). Nuestras cápsulas fueron lo suficientemente grandes para permitir una adecuada carga celular (10.09 ± 0.12 a $10.60 \pm 0.08 \log UFC/g$) que se encontraban en el rango reportado por Alehosseini, Sarabi-Jamab, Ghorani y Kadkhodae (2019) y Cook *et al.* (2014). Las diferencias en la microestructura se infirieron cualitativamente a partir de las micrografías de SEM con una ampliación de $6000 \times$ mostradas en la Figura 4. Durante la preparación de la muestra para el análisis de SEM, se eliminó el agua produciendo espacios intersticiales y/o poros diminutos en la red de alginato. La microestructura de B_0 (Figura 4) se caracterizó por mostrar poros relativamente pequeños, con células de *L. casei* unidas individualmente o en grupos, y distribuidas al azar en la red de alginato. La adición de $Mg(OH)_2$ produjo

poros más grandes y una red de alginato más relajada en las cápsulas (Figura 4), lo que indica que la presencia de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ afectó la reticulación del alginato por cloruro de calcio. En general, las matrices de hidrogeles están compuestas por una red de estructuras similares a fibrillas que se pueden identificar y discriminar de las cavidades circundantes mediante programas computacionales. En este trabajo, la mitad de la distancia más corta entre dos puntos opuestos de las estructuras similares a fibrillas de alginato, conocida como radio de poro relativo (rpr) se usó para definir los tamaños de estas cavidades o poros (Leal-Egaña *et al.*, 2011). Un aumento en la concentración de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (es decir, Mg^{+2}) incrementó el valor medio de la red de alginato, de la siguiente manera: $32.84 \pm 0.12 \text{ nm (B}_0) = 33.03 \pm 0.15 \text{ nm (B}_{0.05}) < 38.70 \pm 0.39 \text{ nm (B}_{0.1}) < 49.51 \pm 0.31 \text{ nm (B}_{0.2}) < 80.12 \pm 0.17 \text{ nm (B}_{0.4})$. La porosidad del alginato es importante para mantener la viabilidad de las bacterias a medida que se mueven a través del tracto digestivo (Allan-Wojtas, Hansen, y Paulson, 2008). Sanchez-Ballester, Soulairol, Bataille y Sharkawi (2019) informaron la aparición de poros (1-2 μm) en la superficie de las cápsulas de alginato formuladas con cantidades crecientes de Mg^{+2} cuando diferentes relaciones de Ca:Mg (es decir, $\text{CaCl}_2:\text{MgCl}_2$) fueron utilizadas para la gelificación iónica de alginato, y relacionó esta observación con la formación de geles menos rígidos a medida que aumentaba la concentración de Mg^{+2} . Topuz, Henke, Richtering y Groll (2012) informaron sobre la estructura porosa de los hidrogeles de Mg-alginato, mientras que la introducción de iones de calcio indujo el colapso de los poros y la formación de una pared sólida. Es de esperar que se induzcan poros/cavidades más grandes mediante la adición de $\text{Mg}(\text{OH})_2$. Como se verá más adelante, la microestructura de la red de alginato de las cápsulas jugó un papel importante en la viabilidad de las células.

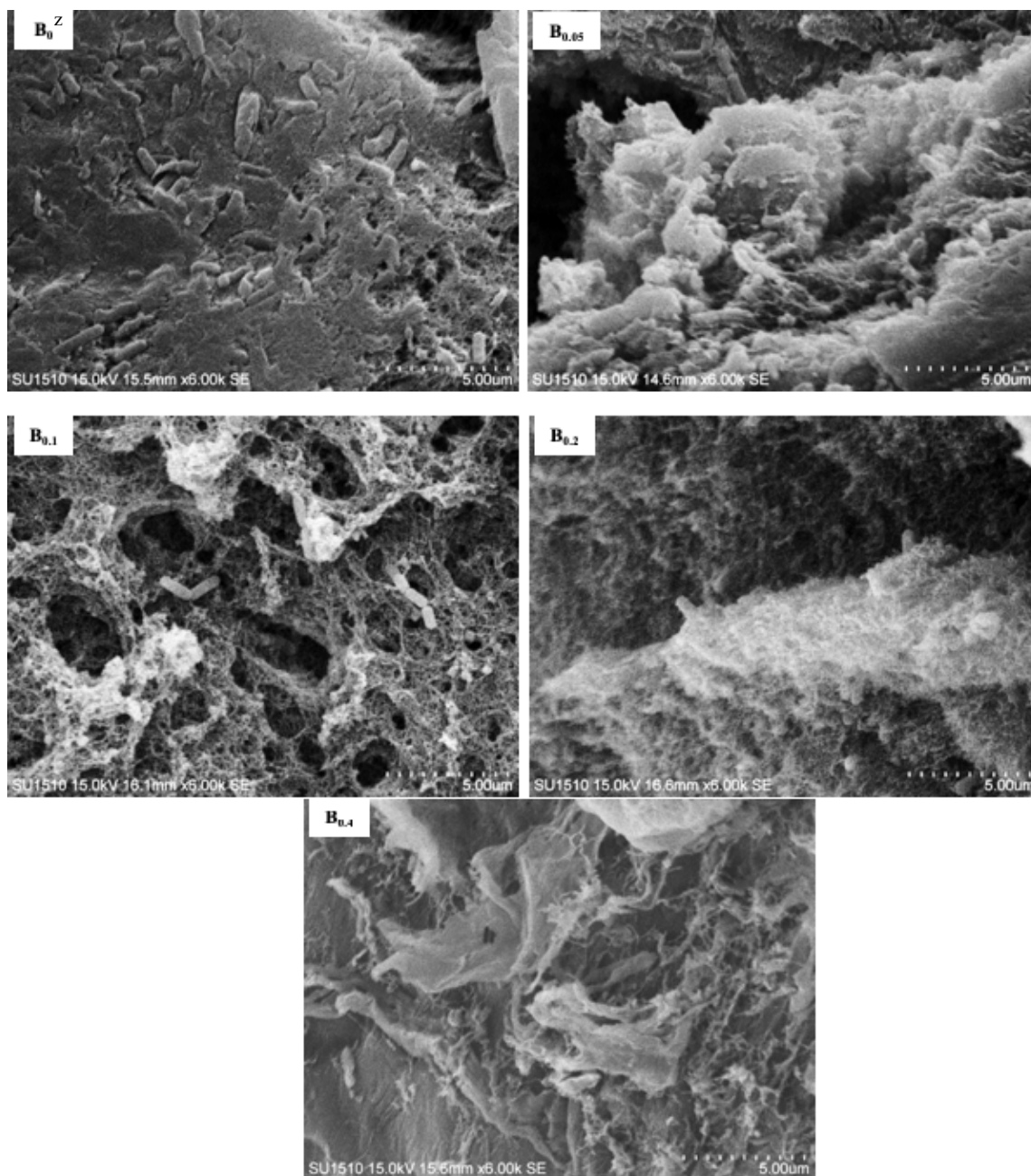


Figura 4. Micrografías SEM de la estructura interna de las cápsulas de alginato de calcio de *L. casei* con diferentes concentraciones de hidróxido de magnesio.

z: Cápsulas de alginato en donde el subíndice denota la concentración de $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

4.5.2. Propiedades texturales de las cápsulas

Las propiedades de textura de las variaciones de las cápsulas se vieron afectadas por la adición de Mg(OH)_2 (Cuadro 6). La dureza, la adhesividad y la cohesividad de B_0 fueron significativamente más altas que las de las cápsulas cargadas con Mg(OH)_2 , sin embargo, tuvieron menor elasticidad. A medida que la concentración de Mg(OH)_2 aumentaba, la dureza, la adhesividad y la cohesión de las cápsulas tendían a disminuir, mientras que la elasticidad aumentaba significativamente. Estos resultados indican que existían diferencias en la reticulación entre las redes poliméricas de alginato de calcio y alginato de magnesio, lo que dio lugar a diferentes respuestas mecánicas a la deformación. Kaklamani, Cheneler, Grover, Adams y Bowena (2014) compararon el efecto de los cationes Ca^{+2} y Mg^{+2} en las propiedades mecánicas de los hidrogeles de alginato, informando que el Ca^{2+} exhibió un diámetro (200 pm) suficientemente grande para coordinar las fracciones carboxilo e hidroxilo de cadenas de polisacáridos, para promover una fuerte reticulación física. En contraste, los cationes Mg^{2+} eran demasiado pequeños (144 pm) y no podían formar un fuerte entrecruzamiento con las moléculas de alginato, y por lo tanto no promovían la gelificación. Topuz *et al.* (2012) informaron que la cinética de la gelificación de alginato con Mg^{+2} fue más lenta que la que se produjo con Ca^{+2} . Sanchez-Ballester *et al.* (2019) informaron que las cápsulas de alginato preparadas con diferentes relaciones Ca:Mg presentaban geles menos rígidos cuando la proporción iónica favorecía el contenido de Mg^{2+} .

Cuadro 6. Propiedades texturales de las cápsulas de alginato de *Lactobacillus casei* con diferentes concentraciones de hidróxido de magnesio

Código de cápsulas	Dureza (N)	Adhesividad (mJ)	Cohesividad	Elasticidad (mm)
B ₀ ^z	0.14 ± 0.011a ^y	0.06 ± 0.004a	0.94 ± 0.003a	1.51 ± 0.072c
B _{0.05}	0.09 ± 0.021bc	0.02 ± 0.005c	0.40 ± 0.398c	3.74 ± 0.025b
B _{0.1}	0.09 ± 0.005c	0.03 ± 0.005bc	0.62 ± 0.010b	3.86 ± 0.031a
B _{0.2}	0.11 ± 0.006ab	0.02 ± 0.006bc	0.62 ± 0.010a	3.95 ± 0.027a
B _{0.4}	0.08 ± 0.006c	0.03 ± 0.007b	0.38 ± 0.009c	3.67 ± 0.020b

z: Cápsulas de alginato en donde el subíndice denota la concentración de Mg(OH)₂.

y: letras diferentes dentro de la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

El comportamiento elástico de las cápsulas (Cuadro 6) es acorde con estudios reológicos previos donde se muestra que la fuerza del gel de alginato de magnesio está relacionada con el contenido de cationes divalentes, es decir, los geles exhibieron un módulo elástico mayor (G'), a mayor contenido de Mg⁺² (Topuz *et al.*, 2012). Banerjee *et al.* (2009) informaron que G' dependía de la densidad numérica de los enlaces cruzados físicos entre cadenas, conferida por la presencia de cationes.

4.5.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis TGA de las variaciones de cápsulas recién elaboradas se realizó de 0 a 300 °C. Posteriormente, los datos se procesaron para obtener los gráficos de la primera derivada (Figura 5). El evento más destacado para todos los tratamientos se ubicó en el rango de 80-100 °C (Figura 5.a), y se puede atribuir a la pérdida de agua. El pico en el que se produjo la mayor pérdida de agua se desplazó hacia la izquierda para las cápsulas con concentraciones mayores de Mg(OH)₂ (B_{0.2} y B_{0.4}). El pico máximo de temperatura cambió de 90 °C para B₀ a 80 °C para B_{0.4}. Esto significa que la incorporación del hidróxido de magnesio redujo la estabilidad del agua unida en la matriz de alginato. El efecto podría deberse a la sustitución de las moléculas de agua unidas por Mg⁺². Por otro lado, se obtuvieron eventos térmicos más débiles para temperaturas en el rango de 180-

300 °C (Figura 5.b). La principal diferencia en este evento fue la presencia de dos picos bien definidos mostrados por las cápsulas con $\text{Mg}(\text{OH})_2$ a concentraciones de 0.05 a 0.2 g/100 g y la presencia de solo un pico exhibido por B_0 y $B_{0.4}$. Los picos mostrados por las cápsulas fueron los siguientes: B_0 (260.33 °C), $B_{0.05}$ (192.81 y 264.35 °C), $B_{0.1}$ (184.19 y 266.69 °C), $B_{0.2}$ (182.16 y 260.45 °C) y $B_{0.4}$ (260.88 °C). Los picos para $B_{0.05}$, $B_{0.1}$ y $B_{0.2}$ corresponden a la eliminación del agua coordinada a los cationes de la capa intermedia. Esta condición se atribuyó a la presencia de hidróxido de magnesio, que debido a sus características de solubilidad se puede encontrar en diferentes especies (por ejemplo, MgO , $\text{Mg}(\text{OH})_2$, Mg^{2+} y OH^-), lo que permite la presencia de agua coordinada. En $B_{0.4}$, probablemente el segundo y tercer evento se fusionaron, dando lugar a un solo pico. Esto sugiere que el aumento en el agua coordinada requiere una temperatura más alta para que se elimine. La presencia de agua coordinada exhibida en el rango entre 120-350 °C ha sido reportada por otros autores (Donoso *et al.*, 2010; Caglar, Afsin, Tabak, & Eren, 2009). El evento alrededor de 260-265 °C estuvo presente en todas las variaciones de cápsulas. Esto se atribuye a deshidratación, fractura de los enlaces glicosídicos, descarboxilación y descarbonilación del alginato. Este resultado es consistente con estudios previos donde se evidencia este evento entre 228.87-280.65 °C (Liu *et al.*, 2015; Lim & Ahmad, 2017).

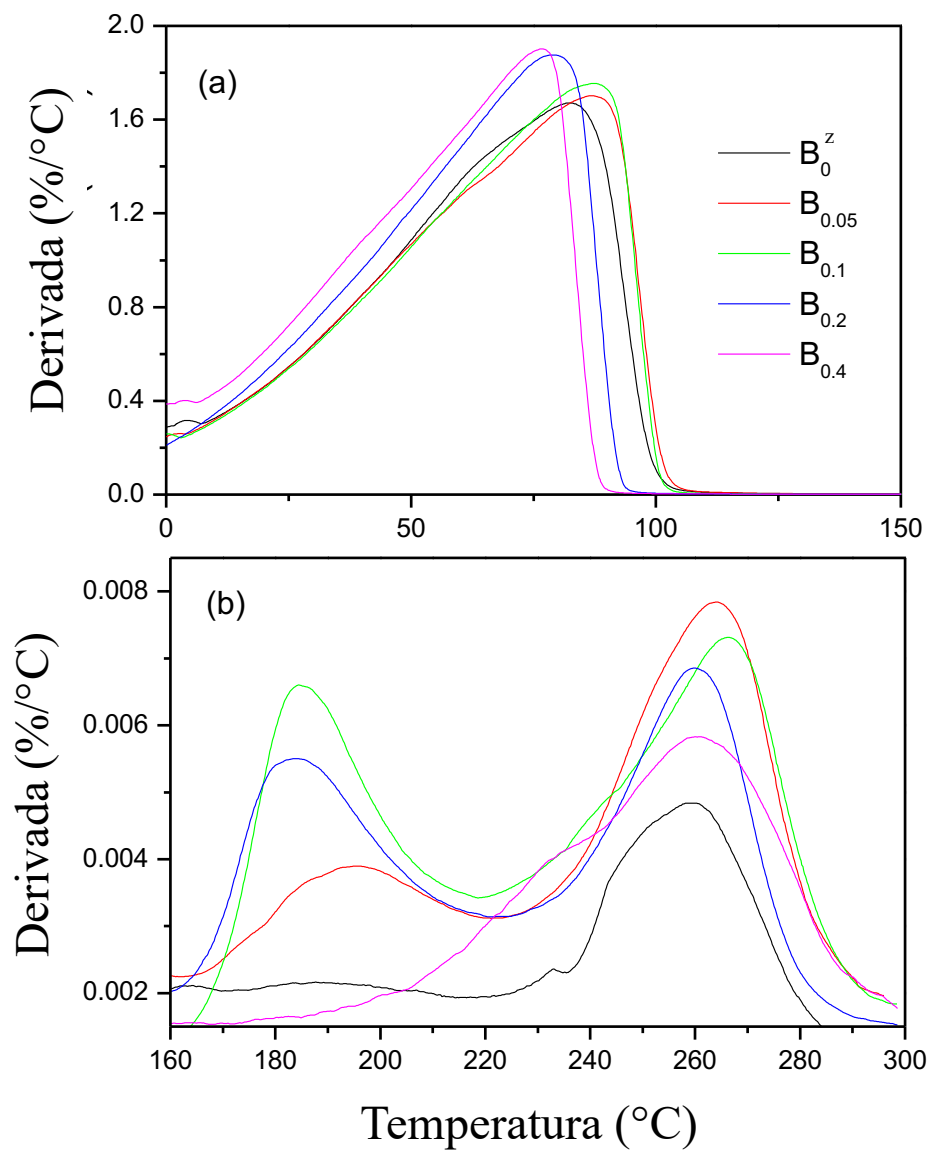


Figura 5. Derivada de la pérdida de peso obtenida de las pruebas TGA de las cápsulas de alginato de calcio *L. casei* con diferentes concentraciones de hidróxido de magnesio. (a) Rango de temperatura baja y (b) alta.

z: Cápsulas de alginato en donde el subíndice denota la concentración de $Mg(OH)_2$.

4.5.4. Análisis FTIR

Un número creciente de trabajos de investigación que surgieron en los últimos años han utilizado el análisis FTIR para evaluar las modificaciones estructurales que ocurren en los microorganismos asociados a los alimentos en respuesta a las condiciones de estrés (Alvarez-Ordóñez, Mouwen, López, & Prieto, 2011). El análisis FTIR se llevó a cabo en las variaciones de cápsulas recién preparadas y los espectros obtenidos se muestran en la Figura 6.(a). Los picos más representativos, que estaban presentes en todas las variaciones de las cápsulas, fueron: a) 3200-3300 cm^{-1} atribuido a la vibración de estiramiento de los grupos -OH, vinculados a estructuras de hidratación, b) 1600-1680 cm^{-1} representativos del grupo Amida I vinculados a la vibración de estiramiento de los grupos -CO, y c) 1100-1000 cm^{-1} que se presenta mediante el estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos de CO y COC y algunas señales por debajo de 1000 cm^{-1} que son complementarias a las señales principales. Estos picos son representativos del alginato y estos resultados son consistentes con informes anteriores (Lim & Ahmad, 2017). La principal diferencia entre los espectros FTIR fue el pico entre 1600-1680 cm^{-1} , que tendió a ser más prominente y agudo cuando estaba presente el $\text{Mg}(\text{OH})_2$ y en concentración creciente. Rather, Akhter, Masoodi, Gani y Wani (2017) informaron que el espectro ATR-FTIR de microcápsulas de alginato que contenían *L. casei* NCDC297 mostró algunos picos adicionales a los del espectro de alginato de sodio. En particular, los picos observados entre 1700 y 1600 cm^{-1} y 1600 -1500 cm^{-1} , se identificaron como bandas de amida-I y amida-II de proteínas endógenas. Por lo tanto, se deconvolucionó el espectro de Amida I para caracterizar las huellas digitales espectroscópicas de las células en ausencia y presencia de $\text{Mg}(\text{OH})_2$. La figura 6.(b) ilustra los resultados de la deconvolución para cuatro funciones Gaussianas. Las señales individuales obtenidas del procedimiento de deconvolución se interpretaron en términos de estructuras secundarias de proteínas de *Lactobacillus casei*. Los picos Gaussianos se asignaron a su estructura correspondiente en función de su centro. Los resultados concuerdan con los informes anteriores que mencionan una banda a 1612 cm^{-1} debido a la vibración de la Amida II, NH o CN de proteínas, que se asignan a estructuras de cadena lateral (Naumann, Helm, Labischinski y Giesbrecht, 1991; Li *et al.*, 2014).

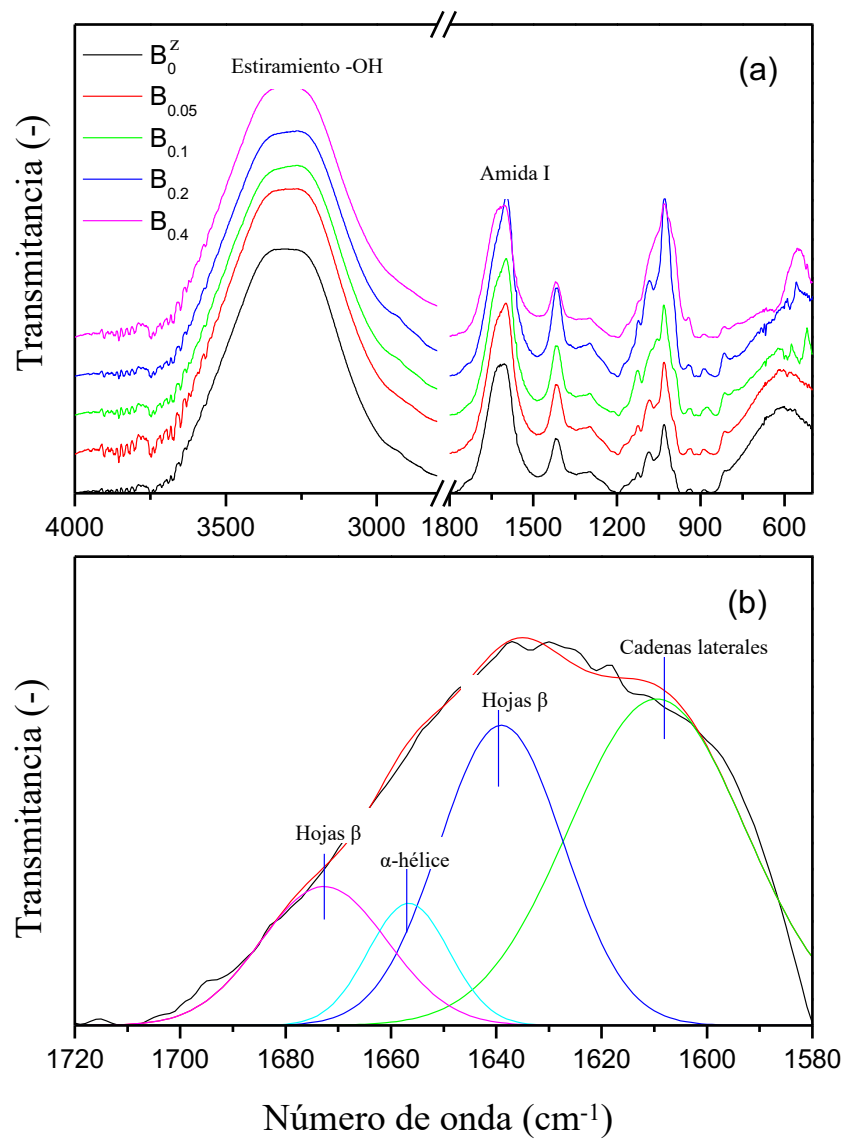


Figura 6. (a) Espectros FTIR de las cápsulas de alginato de calcio de *L. casei* con diferentes concentraciones de hidróxido de magnesio. (b) Ejemplo ilustrativo de la deconvolución de la región Amida I.

z: Cápsulas de alginato en donde el subíndice denota la concentración de Mg(OH)₂.

El centro del pico de las cadenas laterales, las estructuras de la hoja β y la hélice α para las cápsulas se muestran en la Cuadro 7. Los pesos espectrales relativos y el porcentaje de las estructuras secundarias se obtuvieron de las áreas de los picos. La proporción de hojas β presenta diferencias estadísticas en todas las variaciones de las cápsulas y tiende a disminuir a medida que aumenta el $\text{Mg}(\text{OH})_2$, lo que puede atribuirse al daño de la pared celular de *L. casei* debido al despliegue de la pared proteica. Por otro lado, la proporción de cadenas laterales aumentó concomitantemente a la disminución de hojas β . Las estructuras de las hojas β en diferentes zonas de la misma cadena polipeptídica pueden interactuar entre sí mediante enlaces de hidrógeno, dando lugar a estructuras laminares. A medida que ocurre la proteólisis, la estructura se despliega, disminuyendo las hojas β y aumentando las cadenas laterales. Varios autores han utilizado con éxito el análisis FTIR para detectar cambios estructurales en las células bacterianas como resultado de condiciones externas estresantes. Al-Qadiri, Lin, Al-Holy, Cavinato y Rasco (2008a) detectaron lesiones por sublimación por calor de las células de *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* y discriminaron entre diferentes intensidades de tratamientos de calor a través de cambios espectrales en proteínas bacterianas, enzimas y ácidos nucleicos. Con aparente desnaturalización. Al-Qadiri, Al-Alami, Al-Holy y Rasco (2008b) estudiaron la lesión bacteriana inducida por el cloro al estudiar los espectros del cultivo mixto de *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Cuadro 7. Estructuras secundarias y contenidos relativos en *L. casei* encapsulados obtenidos de la deconvolución de la banda Amida I.

Código de cápsulas	Cadenas laterales	Hojas β (%)	α -hélice
B ₀ ^z	45.99 $\pm$ 1.68 ^{c_y}	45.73 $\pm$ 1.03 ^a	8.26 $\pm$ 0.66a
B _{0.05}	53.21 $\pm$ 1.31b	39.75 $\pm$ 1.06b	7.02 $\pm$ 0.29b
B _{0.1}	52.45 $\pm$ 1.18b	38.83 $\pm$ 1.18b	8.71 $\pm$ 0.35a
B _{0.2}	60.02 $\pm$ 1.31a	32.94 $\pm$ 1.40c	7.03 $\pm$ 0.70b
B _{0.4}	61.27 $\pm$ 1.47a	30.62 $\pm$ 1.30c	8.11 $\pm$ 0.20a

z: Cápsulas de alginato en donde el subíndice denota la concentración de $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

y: letras diferentes dentro de la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

4.5.5. Análisis de pH y ζ -potencial del medio externo de las cápsulas

Se examinó el impacto de la concentración de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ en el pH de las variaciones de las cápsulas que rodean el medio durante la exposición a condiciones gástricas simuladas. Las cápsulas de alginato son altamente porosas (Zhang, Zhang, Chen, Tong y McClements, 2015), por lo que los iones pequeños ácidos (H^+) o básicos (OH^-) se difunden dentro o fuera de ellos, lo que hace que el pH interno sea bastante similar al pH externo. En este sentido, puede considerarse que el pH externo de las cápsulas refleja el efecto neutralizador del $\text{Mg}(\text{OH})_2$ dentro de las cápsulas.

El pH inicial fue el del fluido gástrico simulado fue de 2.5 ± 0.0 , después de 2 h en condiciones gástricas simuladas, el medio acuoso externo de las células de *L. casei* libres y B_0 no fue significativamente diferente (Cuadro 8). En contraste, los valores de pH del medio acuoso externo de las cápsulas con $\text{Mg}(\text{OH})_2$ fueron significativamente más altos que los de las células de *L. casei* libres y B_0 , con valores de pH más altos cuando la concentración de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ fue mayor. Estos confirman el papel neutralizante del $\text{Mg}(\text{OH})_2$ en el H^+ del ácido clorhídrico. Zhang *et al.* (2016) encontraron que el pH interno de las cápsulas de alginato que contenían lipasa pancreática y $\text{Mg}(\text{OH})_2$ se mantuvo relativamente alto y casi neutro (pH 7.39) después de la exposición a los fluidos gástricos simulados. Por el contrario, el pH interno de las cápsulas de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ libres disminuyó por debajo del límite de detección ($< \text{pH } 4$).

El valor del potencial ζ disminuyó a medida que aumentaba la concentración de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ con B_0 mostrando el valor más alto ($-2.89 \pm 0.07 \text{ mV}$) y $\text{B}_{0.4}$ el valor más bajo ($-6.69 \pm 0.13 \text{ mV}$). El potencial ζ y los valores de pH reflejan los compuestos presentes dentro de las cápsulas. El pH tendió a valores más básicos, ya que el $\text{Mg}(\text{OH})_2$ se solubilizó parcialmente en Mg^{2+} y OH^- en condiciones gástricas. Este último neutralizó el H^+ del ácido clorhídrico del ambiente externo. Por lo tanto, el pH fue muy cercano a la neutralidad (6.20 ± 0.06) y el potencial ζ fue el más bajo y negativo en $\text{B}_{0.4}$, lo que significa que hubo un exceso de OH^- . El uso de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ se ha informado previamente para el control interno del pH en enzimas, vacunas y otros componentes durante condiciones gástricas (Marinina *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2017b). Sin embargo, según

nuestro conocimiento, no existen informes sobre el uso de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ en la protección de bacterias probióticas.

Cuadro 8. Valores de pH y potencial ζ después de que las cápsulas de *L. casei* fueron expuestas a condiciones gástricas simuladas

Código de cápsulas	pH	Potencial- ζ (mV)
Células libres de <i>L. casei</i>	$3.19 \pm 0.01\text{e}^y$	$2.32 \pm 0.15\text{a}$
B ₀ ^z	$3.28 \pm 0.01\text{e}$	$-2.89 \pm 0.07\text{b}$
B _{0.05}	$3.93 \pm 0.02\text{d}$	$-4.54 \pm 0.15\text{c}$
B _{0.1}	$4.75 \pm 0.04\text{c}$	$-5.49 \pm 0.29\text{d}$
B _{0.2}	$5.35 \pm 0.02\text{b}$	$-5.94 \pm 0.22\text{d}$
B _{0.4}	$6.20 \pm 0.06\text{a}$	$-6.69 \pm 0.13\text{e}$

z: Cápsulas de alginato en donde el subíndice denota la concentración de $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

y: letras diferentes dentro de la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

4.5.5. Viabilidad de *L. casei* bajo condiciones gástricas simuladas

La EE no fue significativamente diferente entre las variaciones de las cápsulas, oscilando entre 80.86 ± 0.70 y $82.80 \pm 0.60\%$. Los recuentos iniciales para las células de *L. casei* libres y encapsuladas no fueron significativamente diferentes (Figura 7(a)). El número de células libres viables con respecto al recuento inicial disminuyó 4.27 ciclos logarítmicos (de $10.51 \log \text{UFC/g}$ a $6.24 \log \text{UFC/g}$), mostrando una tasa de supervivencia del 0.005% (Figuras 7(a) y 7(b)). La viabilidad de las células de *L. casei* encapsuladas fue significativamente mayor que para las células libres cuando se expusieron a un pH bajo. Por lo tanto, la disminución en los recuentos de células encapsuladas varió de $0.55 \log \text{UFC/g}$ para B_{0.1} a $1.30 \log \text{UFC/g}$ para B_{0.4}, con tasas de supervivencia de 27.78 y 3.5%, respectivamente. Yao *et al.* (2018) encapsularon *Pediococcus pentosaceus* Li05 en cápsulas de alginato-gelatina cargadas con nanopartículas de MgO. Mientras que la viabilidad de las células libres de *Pediococcus pentosaceus* Li05 sufrió una reducción de $5 \log \text{CFU/g}$ cuando se expuso a condiciones gástricas simuladas, la de las células encapsuladas se redujo en solo $2 \log \text{CFU / g}$. La capacidad de protección de esta última

se atribuyó a la capacidad de las nanopartículas de MgO para llenar los poros y mantener un pH neutro dentro de las cápsulas. Gu *et al.* (2019) informaron que las células libres y encapsuladas de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G7 en cápsulas de alginato sufrieron una pérdida total de viabilidad después de la exposición a condiciones gástricas simuladas. Cuando las células bacterianas se encapsularon en cápsulas cargadas con $\text{Mg}(\text{OH})_2$ o CaCO_3 , la pérdida en la viabilidad celular fue solo de 1.5 y 1.0 log CFU / g, respectivamente.

Curiosamente, cuando la concentración de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ variaba de 0 a 0.1 g/100 g, la viabilidad de *L. casei* sometida a condiciones gástricas simuladas aumentó de 5.14 a 27.78% (Figura 7(b)). Sin embargo, las concentraciones de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ superiores a 0.1 g/100 g causaron disminuciones significativas en la viabilidad de las células. Estos resultados indican que cuando la concentración de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ fue superior a 0.1 g/100 g, tuvo un efecto negativo en la viabilidad de las células de *L. casei*. De hecho, cuando se enumeraron las células de *L. casei* encapsuladas en B_{0.4} que contenían la concentración más alta de hidróxido de magnesio, se observó que las células bacterianas no estaban bien definidas, lo que puede atribuirse al daño de la pared celular (Figura 8) . Este efecto se refuerza con los resultados obtenidos en FTIR, donde se refleja el despliegue de proteínas (Figura 6, Cuadro 7).

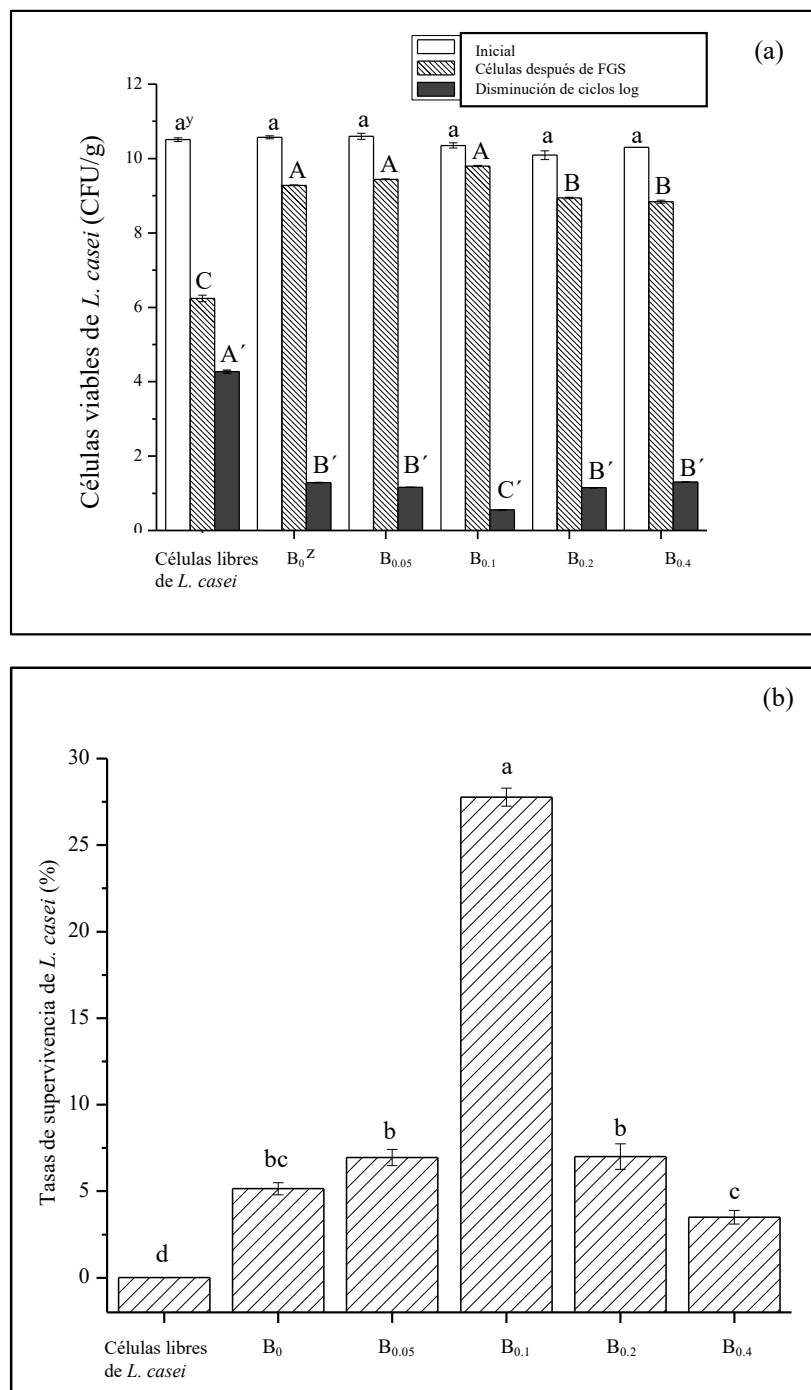


Figura 7. Efecto de la exposición a condiciones gástricas simuladas sobre: (a) viabilidad inicial y final; y (b) tasas de supervivencia de *L. casei* entrampado en cápsulas de alginato de calcio con los distintos tratamientos (B_0 , $B_{0.05}$, $B_{0.1}$, $B_{0.2}$ y $B_{0.4}$).

z: Cápsulas de alginato en donde el subíndice denota la concentración de $Mg(OH)_2$.

y: letras diferentes en columnas de la misma serie indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

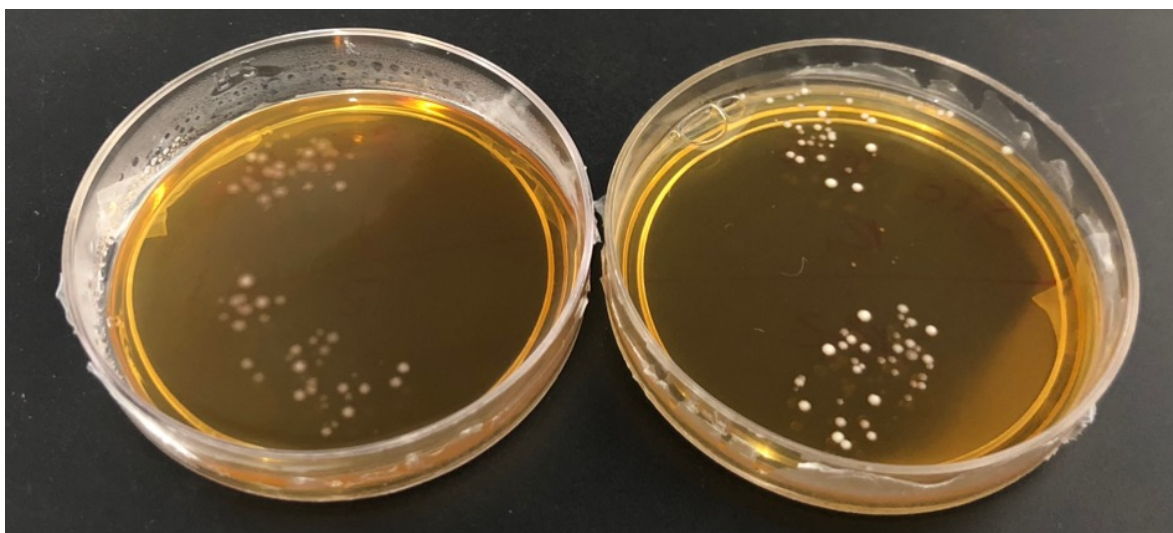


Figura 8. Crecimiento de *L. casei* encapsulado en tratamiento con 0.4 % de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ($\text{B}_{0.4}$, placa izquierda) y tratamiento con 0.4 % de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (B_0 , placa derecha) después de condiciones gástricas simuladas.

La actividad antibacteriana del $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ha sido reportada por otros autores. Dong *et al.* (2010) informaron que las nanopartículas de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ eran agentes antibacterianos efectivos contra *E. coli* y *Burkholderia phytofirmans*, a través de dos mecanismos posibles. El primero, que consiste en la penetración de las nanopartículas de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ en la pared celular que destruyen la estructura de las proteínas, lo que lleva al daño de la membrana y a la muerte celular. El segundo mecanismo posible es la adsorción de la humedad del agua en las superficies de las nanopartículas de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ y la alta concentración de grupos OH^- ya que en esta delgada capa de agua superficial se podría dañar la membrana y causar la muerte celular. Pan *et al.* (2013) informaron el mecanismo antibacteriano de tres suspensiones de nano- $\text{Mg}(\text{OH})_2$ utilizando *E. coli* como bacterias modelo. Estos autores concluyeron que nano- $\text{Mg}(\text{OH})_2$ se adsorbía en la superficie bacteriana primero mediante atracción, para posteriormente destruir la integridad de las paredes celulares, lo que resulta en la muerte de las bacterias.

4.6. Conclusiones

Las cápsulas de alginato de calcio exhiben cierta fragilidad en condiciones gástricas rigurosas, lo que pone en riesgo la viabilidad de las bacterias probióticas encapsuladas. En este trabajo, exploramos si la incorporación de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ en las cápsulas podría mejorar la viabilidad de *L. casei*, al proporcionar un microambiente neutro en su interior, reduciendo así el riesgo de una alteración ácida. Los resultados mostraron que la incorporación de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ fue efectiva hasta una concentración de 0.1 g/100 g para mejorar la protección de los probióticos, sin embargo, concentraciones más altas dañaron la pared celular. En general, nuestros resultados mostraron que la incorporación de partículas neutralizantes en las cápsulas de alginato es una estrategia prometedora para mejorar la capacidad protectora de células probióticas contra condiciones gástricas adversas.

4.7. Agradecimientos

I. M. Arenales-Sierra agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su beca, y al Dr. David Julian McClements por darle la bienvenida a su estancia en su laboratorio en UMass, Amherst, de quien tuvo la idea de desarrollar este trabajo. Los autores agradecen a M.C. María Berenit Mendoza Garfias del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por su ayuda con el microscopio electrónico de barrido.

4.8. Referencias

- Agüero, L., Zaldivar-Silva, D., Peña, L., & Dias, M. (2017). Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. *Carbohydrate Polymers*, 168, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.033>
- Allan-Wojtas, P., Truelstrup Hansen, L., & Paulson, A.T. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.02.003>
- Al-Qadiri, H.M., Lin, M., Al-Holy, M.A., Cavinato, A.G., & Rasco, B.A. (2008^a). Detection of sublethal thermal injury in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and *Listeria monocytogenes* using Fourier transform infrared (FT-

- IR) spectroscopy (4000 to 600 cm^{-1}). *Journal of Food Science*, 73, M54–M61. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00640.x>
- Al-Qadiri, H.M., Al-Alami, N.I., Al-Holy, M.A., Rasco, & B.A. (2008b). Using Fourier transform infrared (FT-IR) absorbance spectroscopy and multivariate analysis to study the effect of chlorine-induced bacterial injury in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8992–8997. <https://doi.org/10.1021/jf801604p>
- Alvarez-Ordóñez, A., Mouwen, D. J. M., López, M., & Prieto, M. (2011). Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 84, 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.009>
- Banerjee, A., Arha, M., Choudhary, S., Ashton, R. S., Bhatia, S. R., Schaffer, D. V., & Kane, R. S. (2009). The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells. *Biomaterials*, 30, 4695–4699. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.050>
- Basu, S., Banerjee, D., Chowdhury, R., & Bhattacharya, P. (2018). Controlled release of microencapsulated probiotics in food matrix. *Journal of Food Engineering*, 238, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.06.005>
- Caglar, B., Afsin, B., Tabak, A., & Eren, E. (2009). Characterization of the cation-exchanged bentonites by XRPD, ATR, DTA/TG analyses and BET measurement. *Chemical Engineering Journal*, 149(1–3), 242–248. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2008.10.028>
- Chan, A. W., & Neufeld, R. J. (2009). Modeling the controllable pH-responsive swelling and pore size of networked alginate based biomaterials. *Biomaterials*, 30(30), 6119–6129. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.034>
- Choonara Y. E., Pillay, V., Singh, N., Khan, R. A., & Ndesendo, V. M. (2008). Chemometric, physicomechanical and rheological analysis of the sol–gel dynamics and degree of crosslinking of glycosidic polymers. *Biomedical Materials*, 3(2), 25003. Retrieved from <http://stacks.iop.org/1748-605X/3/i=2/a=025003>
- Chuah, A. M., Kuroiwa, T., Kobayashi, I., Zhang, X., & Nakajima, M. (2009). Preparation of uniformly sized alginate microspheres using the novel combined methods of microchannel emulsification and external gelation. *Colloids and Surfaces. A Physicochemical and Engineering Aspects*, 35, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.09.005>
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2014). Microencapsulation of a symbiotic into PLGA/alginate multiparticulate gels. *International Journal of Pharmaceutics*, 466(1), 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.034>
- Desai, K. G. H., & Park, J. H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361–1394. <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>

- de Farias, T. G. S., Ladislau, H. F. L., Stamford, T. C. M., Medeiros, J. A. C., Soares, B. L. M., Arnaud, T. M. S., & Stamford, T. L. M. (2019). Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. *LWT - Food Science and Technology*, 100, 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.084>
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060–2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
- Dong, Ch., Cairney, J., Sun, Q., O. L., Maddan, He, G., & Deng, Y. (2010). Investigation of Mg(OH)₂ nanoparticles as an antibacterial agent. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 2101–2109. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9769-9>
- Donoso, J. P., Tambelli, C. E., Magon, C. J., Mattos, R. I., Silva, I. D. A., Souza, J. E. de, Benavente, E. & Gonzalez, G. (2010). Nuclear Magnetic Resonance Study of Hydrated Bentonite. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 521(1), 93–103. <https://doi.org/10.1080/15421401003723219>
- Erdoğan, Ö., & Erbilir, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. *Turk Journal of Biology*, 30, 39-44.
- Gu, M., Zhang, Z., Pan, Ch., Goulette, T. R., Zhang, R., Hendricks, G., McClements, D. J., & Xiao, H. (2019). Encapsulation of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G7 in gastroprotective microgels: Improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 91, 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.040>
- Hecht, H. & Srebnik, S. (2016). Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate. *Biomacromolecules*, 17, 2160-2167. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00378
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44(2), 121–129. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)
- Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D., & Vernon-Carter, E. J. (2014). *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate: κ-carrageenan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 36, 181-188. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.09.018
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Jiang, W., & Schwendeman, S. P. (2008). stabilization of tetanus toxoid encapsulated in PLGA microspheres. *Molecular Pharmaceutics*, 5(5), 808–817. <https://doi.org/10.1021/mp800027f>

- Kaklamani, G., Cheneler, D., Grover, L. M., Adams, M. J., & Bowena, J. (2014). Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 36, 135–142. <http://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.04.013>
- Kandansamy, K., & Somasundaram, P. D. (2012). Microencapsulation of colors by spray drying-A review. *International Journal of Food Engineering*, 8(2), 1–15. <https://doi.org/10.1515/1556-3758.2647>
- Knorr, D. (1998). Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 9(8–9), 295–306. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00051-X)
- Leal-Egaña, A., Dietrich-Braumann, U., Díaz-Cuenca, A., Nowicki, M., & Bader, A. (2011). Determination of pore size distribution at the cell-hydrogel interface. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 24 (1-7). DOI: 10.1186/1477-3155-9-24
- Li, S., Jiang, C., Chen, X., Wang, H., & Lin, J. (2014). *Lactobacillus casei* immobilized onto montmorillonite: Survivability in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration and yogurt. *Food Research International*, 64, 822–830. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.08.030
- Lim, G. P., & Ahmad, M. S. (2017). Development of Ca-alginate-chitosan microcapsules for encapsulation and controlled release of imidacloprid to control dengue outbreaks. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 56, 382–393. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.07.035>
- Liu, Y., Liu, J., Li, S., Wang, Y., Han, Z., & Ren, L. (2015). One-step method for fabrication of biomimetic superhydrophobic surface on aluminum alloy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 466, 125–131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.11.017>
- Lozano-Vazquez, G., Lobato-Calleros, C., Escalona-Buendia, H., Chavez, G., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2015). Effect of the weight ratio of alginate-modified tapioca starch on the physicochemical properties and release kinetics of chlorogenic acid containing microbeads. *Food Hydrocolloids*, 48, 301–311. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.02.032
- Marinina, J., Shenderova, A., Mallery, S. R., & Schwendeman, S. P. (2000). Stabilization of vinca alkaloids encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharmaceutical Research*, 17, 677–683. DOI: 10.1023/A:1007522013835
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 173–182. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00099-1
- McClements, J. D., Zhang, Z., & Zhang, R. (2018). Hydrogel microbeads with self-regulating microclimate pH properties. *United States Patent Application US20180055777*.

- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H., & Giesbrecht, P. (1991). The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy. In W. H. Nelson (Ed.), *Modern techniques for rapid microbiological analysis* (pp. 43–96). New York: VCH-Publisher.
- Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, 272, 494–506. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.205>
- Pan, X., Wang, Y., Chen, Z., Pan, D., Cheng, Y., Liu, Z., Lin, Z., & Guan, X. (2013). Investigation of antibacterial activity and related mechanism of a series of nano-Mg(OH)₂. *ACS Applied Material & Interfaces*, 5, 1137–1142. <https://doi.org/10.1021/am302910q>
- Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., & Wani, S. M. (2017). Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT - Food Science and Technology*, 83, 50–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.036>
- Sanchez-Ballester, N. M., Soulairol, I., Bataille, B., & Sharkawi, T. (2019). Flexible heteroionic calcium-magnesium alginate microbeads for controlled drug release. *Carbohydrate Polymers*, 207, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.096>
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Álvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate-pectin microbeads and survivability of entrapped *L. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.010>
- Sawai, J., Kojima, H., Igarashi, H., Hashimoto, A., Shoji, S., Sawaki, T., Hakoda, A., Kawada, E., Kokugan, T., & Shimizu, M. (2000). Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16, 187–194. <http://doi.org/10.1023/A:1008916209784>
- Shori, A. B. (2017). Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24, 1–5. <http://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.12.008>
- Silva, K. C. G., Cezarino, E. C., Michelon, M., & Sato, A. C. K. (2018). Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.026>
- Topuz, F., Henke, A., Richtering, W., & Groll, J. (2012). Magnesium ions and alginate do form hydrogels: a rheological study. *Soft Matter*, 8, 4877–4481. <https://doi.org/10.1039/c2sm07465f>
- Tripathi M. K., & Giri S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241. ISSN 1756-4646, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>

- Yao, M., Li, B., Ye, H., Huang, W., Luo, Q., Xiao, H., McClements, D. J. & Li, L. (2018). Enhanced viability of probiotics (*Pediococcus pentosaceus* Li05) by encapsulation in microgels doped with inorganic nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 83, 246–252. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.05.024>
- Yeung, T. W., Üçok, E. F., Tiani, K. A., McClements, D. J., & Sela, D. A. (2016). Microencapsulation in alginate and chitosan microgels to enhance viability of *Bifidobacterium longum* for oral delivery. *Frontiers in Microbiology*, 7, 494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00494>
- Zhang, Z., Zhang, R., Chen, L., Tong, Q., & McClements, D. J. (2015). Designing hydrogel particles for controlled or targeted release of lipophilic bioactive agents in the gastrointestinal tract. *European Polymer Journal*, 72, 698–716. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.01.013>
- Zhang, Z., Chen, F., Zhang, R., Deng, Z., & McClements, D. J. (2016). Encapsulation of pancreatic lipase in hydrogel beads with self-regulating internal pH microenvironments: retention of lipase activity after exposure to gastric conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 9616–9623. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04644>
- Zhang, Z., Zhang, R., Sun, Q., Park, Y., & McClements, D. J. (2017a). Confocal fluorescence mapping of pH profile inside hydrogel microbeads (microgels) with controllable internal pH values. *Food Hydrocolloids*, 65, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.018>
- Zhang, Z., Zhang, R., & McClements, D. J. (2017b). Lactase (β -galactosidase) encapsulation in hydrogel beads with controlled internal pH microenvironments: Impact of bead characteristics on enzyme activity. *Food Hydrocolloids*, 67, 85–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.005>
- Zhu, G., Mallery, S. R., & Schwendeman, S. P. (2000). Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide). *Nature Biotechnology*, 18, 52. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/71916>