



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

“Estandarización del proceso de encapsulación de *Lactobacillus gasseri*
en partículas de alginato de sodio recubiertas con nanopartículas de
Eudragit S-100”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ MARTÍN CERVANTES MAURICIO

DIRIGIDA POR

DR. HÉCTOR POOL REYES PAUL

CODIRECTOR

DR. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Estandarización del proceso de encapsulación de
Lactobacillus gasseri en perlas de alginato de sodio
recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100

por

José Martín Cervantes Mauricio

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGLIN-236948



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

"Estandarización del proceso de encapsulación de *Lactobacillus gasseri*
en partículas de alginato de sodio recubiertas con nanopartículas de
Eudragit S-100".

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ MARTÍN CERVANTES MAURICIO

DIRIGIDA POR

DR. HÉCTOR PAUL REYES POOL

CODIRECTOR

DR. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ

SINODALES

DR. HÉCTOR PAUL REYES POOL

DR. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ

DR. RUFINO NAVA MENDOZA

DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES CUAN HERNÁNDEZ

DR. ALDO AMARO REYES

Agradecimientos.

La realización de esta tesis para obtener el grado de Licenciado en Ingeniería en Nanotecnología no sería posible sin los pilares más importantes: mis padres Jorgina y Martín a quienes dedico este pequeño trabajo ya que siempre creyeron en mí.

No podría sino reconocer y agradecer con creces la paciencia, conocimientos y consejos del Dr. José Antonio Cervantes Chávez quien me abrió las puertas de su laboratorio, el LAMIMO, y quien me brindó un cobijo siempre cálido desde febrero del 2021.

Al director y orquestador de este trabajo de titulación, al Dr. Héctor Paul Reyes Pool, le agradezco enteramente por guiarme desde el principio para poder realizar este trabajo de investigación, así como por todos sus consejos y bondades que tuvo para conmigo.

Agradezco enormemente a los miembros del Laboratorio de Microbiología Molecular (LAMIMO) por compartir conmigo sus conocimientos y por hacerme sentir bienvenido en el laboratorio. En especial, agradezco al I.A.Q Daniel Mendoza (“el Dany”) por su amistad y por todos sus conocimientos compartidos y por los buenos momentos (bastantes) que pasamos en el laboratorio.

Finalmente, quisiera agradecer a mis amigos y compañeros de carrera: Paulina, Alexis, Bryan, Erick y a Carlos Marín por brindarme mucho más de lo que les he podido ofrecer. Su amistad, fruto siempre dulce en esta amarga vida, hace de la existencia un lugar más agradable. Simplemente gracias.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1 ANTECEDENTES.....	- 1 -
1.1 Probióticos.....	- 1 -
1.1.1 Probióticos en leche materna.....	- 7 -
1.2 Microencapsulación.....	- 9 -
1.2.1 Métodos químicos de microencapsulación.....	- 11 -
2 HIPÓTESIS.....	- 15 -
3 OBJETIVOS.....	- 16 -
3.1 Objetivo general.....	- 16 -
3.2 Objetivos específicos.....	- 16 -
4 METODOLOGÍA.....	- 18 -
4.1 Cultivo y aislamiento de <i>L. gasseri</i>	- 18 -
4.2 Ensayos de caracterización e identificación genética de los aislados bacterianos.....	- 18 -
4.2.1 Tinción de Gram.....	- 18 -
4.2.2 Prueba de hemólisis.....	- 19 -
4.2.3 Ensayo de actividad de la gelatinasa.....	- 19 -
4.2.4 Ensayo de la producción de DNasa.....	- 19 -
4.2.5 Extracción del ADN genómico.....	- 19 -
4.2.6 Amplificación mediante PCR del fragmento 16S del aislado bacteriano....	- 20 -
4.2.7 Purificación del amplicón obtenido mediante PCR.....	- 21 -
4.2.8 Secuenciación de los productos de PCR.....	- 21 -
4.3 Microencapsulación mediante gelificación iónica de <i>Lactobacillus gasseri</i>	- 21 -
4.3.1 Cultivo de bacterias.....	- 21 -
4.3.2 Encapsulamiento de <i>L. gasseri</i>	- 22 -

4.3.3	Síntesis de nanopartículas de Eudragit S-100 y recubrimiento de las microperlas de alginato de calcio.	- 22 -
4.4	Caracterización fisicoquímica de las micropartículas.	- 23 -
4.5	Evaluación de la eficiencia de encapsulamiento de <i>L. gasseri</i>	- 24 -
4.6	Distribución del tamaño de partícula y mediciones de carga superficial de las microperlas de alginato de calcio y de las nanopartículas de Eudragit S-100.	- 24 -
4.7	Morfología.	- 24 -
4.8	Propiedades espectroscópicas	- 24 -
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	- 26 -
5.1	Aislamiento y caracterización bacterianas.	- 26 -
5.2	Ensayos de actividad hemolítica, gelatinasa y DNasa	- 27 -
5.3	Identificación molecular	- 30 -
5.4	Encapsulación y eficiencia de encapsulamiento de <i>L. gasseri</i>	- 31 -
5.5	Tamaño y carga superficial de las nanopartículas de Eudragit S-100	- 35 -
5.6	Morfología	- 39 -
5.7	Propiedades espectroscópicas.	- 40 -
6	CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.	- 45 -
7	BIBLIOGRAFÍA.	- 47 -
8	ANEXO 1	- 57 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

1 Algunos ejemplos de productos probióticos con diferentes cepas probióticas.....	-2-
2 Diversos métodos de microencapsulación utilizados actualmente	-10-

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1 Efectos inmunológicos desencadenados por probióticos y su interacción con receptor celulares transmembranales de tipo Toll (Plaza-Diaz et al., 2019).....	5-
2 Múltiples afecciones relacionadas con la disbiosis de la microbiota intestinal (Appanna & Appanna, 2018).....	6-
3 Esquema ilustrativo de microesferas y microcápsulas. Adaptado de (Asghari et al., 2017).....	9-
4 La estructura del alginato. Se muestran los bloques de construcción. M representa el ácido manurónico y G el ácido gulurónico unidos mediante enlaces R-O-R, donde R es la molécula del carbohidrato de alguno de los dos ácidos ya mencionados (Szekalska et al., 2016).....	12-
5 Esquema de encapsulación de <i>L. gasseri</i> en partículas de alginato de calcio.....	22-
6 Unidades formadoras de colonia de <i>L. gasseri</i> crecidas en placa de agar MRS aisladas de un producto comercial.....	25-
7 Tinción de Gram de <i>L. gasseri</i> 1118. Se observa la forma típica y coloración propias de especies Gram positivas a través del objetivo 100X con aceite de inmersión.....	26-
8 Ensayo de hemólisis para la caracterización de <i>L. gasseri</i> . Las bacterias se sembraron en agar sangre suplementado con sangre de cordero al 5 %. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h	26-
9 Ensayo de gelatinasa donde se muestra que <i>L. gasseri</i> cepas 1118 y 1119 no producen gelatinasa debido a que la gelatina no se licuó en comparación con los controles positivos de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> . Los tubos de agar-gelatina se incubaron a 37 °C durante 7 días para después refrigerarlos durante 24 h y verificar el estado del agar.....	27-
10 Ensayo de actividad de DNasa. <i>L. gasseri</i> resultó negativa en la actividad de la DNasa mientras que <i>S. aureus</i> fue positiva, como se esperaba. Las placas se incubaron a 37 °C durante	

24 h. El halo alrededor de <i>S. aureus</i> indica la producción de desoxirribonucleasa.....	-27-
11 Amplificación de la secuencia 16S rDNA. La PCR arrojó un amplicón de 1463pb para las clonas 1118 y 1119. Carril 2: marcador de peso molecular 1kb; carril 3: 1118; y carril 4: 1119.....	-28-
12 Emparejamientos obtenidos al analizar la secuencia obtenida por el Langebio del amplicón de <i>L. gasseri</i> cepa 1118. Se observa un 100 % de emparejamiento con cepas de <i>L. gasseri</i> , lo que permite concluir que la cepa 1118 aislada en el producto comercial pertenece a esta especie.....	-29-
13 Perlas de alginato se sodio cargadas con <i>L. gasseri</i> después de su formación en CaCl ₂	-30-
14 Perla de alginato cargada con <i>L. gasseri</i> (sin recubrimiento) vista bajo el microscopio. Se observa la típica forma de pera o lágrima. (Davarcı et al., 2017).....	-31-
15 Gráfica de intensidad obtenida mediante DLS de la distribución del tamaño de partícula para Nanopartículas de Eudragit S-100 suspendidas en agua Milli-Q, mostrando un diámetro promedio de 359.2 nm.....	-34-
16 Potencial zeta de las nanopartículas de Eudragit S-100.....	-35-
17 Curva de Potencial zeta vs pH de las nanopartículas de Eudragit S-100.....	-36-
18 Micrografías de SEM de perlas de alginato de sodio liofilizadas vacías (a, magnificación 50x). Imágenes de SEM de la superficie de las perlas de alginato de sodio liofilizadas vacías (b, magnificación 292x). Perlas de alginato de sodio recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100 (c, magnificación 50x). Superficie de perla de alginato con nanopartículas de Eudragit S-100 (d, magnificación 290x).....	-39-
19 Espectro FTIR acumulado de A alginato de sodio en polvo, B Eudragit S-100 en polvo, C perlas de alginato de calcio y D perlas de alginato de calcio recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100.....	-40-

RESUMEN

El estado del arte en el área de probióticos resalta el papel de las bacterias ácido lácticas (BAL) que están presentes en la leche materna y que, de acuerdo con estudios científicos, son de suma importancia para la adquisición de la microbiota intestinal de los neonatos, así como para el correcto desarrollo de dicho ambiente microbiano. A pesar de la grandes ventajas nutrimentales y fisiológicas que pueden traer este tipo de bacterias, su uso se encuentra limitado debido a que son altamente inestables en condiciones encontradas durante la formulación de productos funcionales (temperatura, pH), almacenamiento (humedad, oxígeno, temperatura) y/o durante su paso por el tracto gastrointestinal (pH, enzimas, biomoléculas). Por lo que las estrategias que se han implementado para eliminar dichas limitantes se han basado en el desarrollo de sistemas de liberación controlada a microescala. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que estos sistemas presentan características que pueden comprometer la viabilidad de este tipo de probióticos, incluyendo porosidad, grietas, alta biodegradabilidad en distintas condiciones, etc. El presente estudio propone la estandarización del proceso de encapsulación de *Lactobacillus gasseri* en partículas de alginato de sodio recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100, con el principal objetivo de elevar su viabilidad durante almacenamiento y su paso a través del tracto gastrointestinal (TGI). Se aisló y caracterizó microbiológicamente, así como genéticamente, una bacteria probiótica de un producto comercial, *L. gasseri*, misma que fue encapsulada en perlas de alginato de calcio mediante la técnica de gelación iónica. Se obtuvo una eficiencia de encapsulamiento del 95 % con un número de unidades formadoras de colonia (UFC) de 7.2×10^7 por cada gramo de perlas de alginato de calcio disueltas. La determinación de la morfología (mediante SEM) y de las propiedades espectroscópicas (ATR-IR) revelan la formación de perlas de alginato de calcio recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100; así, este trabajo demuestra que es posible encapsular *L. gasseri* y mantener su viabilidad después del proceso de encapsulamiento con un homogeneizador de altas velocidades. La información generada en esta propuesta tendrá impacto directo en sentar las bases necesarias para microencapsular diversas bacterias ácido-lácticas presentes en leche materna con el fin de formular productos funcionales en un futuro cercano dirigidos a neonatos y lactantes de primera etapa que no pueden recibir leche materna por algún motivo como alimento esencial.

ABSTRACT

State of art in the probiotics field highlights the role of lactic acid bacteria (LAB) that are present in human milk and that, according to scientific literature, are truly important for the acquisition of intestinal microbiota in new-borns, but also for the correct development of the microbial environment. Despite the nutritional and physiological advantages that these kinds of bacteria could endow, their use is limited by the instability under certain conditions that bacteria face in the formulation of functional products (temperature, pH), storage (moisture, oxygen, temperature) and/or during its passing through the gastrointestinal tract (pH, enzymes, biomolecules). So, the strategies that have been implemented to get rid of the limitations have been based upon the development of microscale-controlled release systems. Nonetheless, several studies have demonstrated that these systems present some features that could compromise the viability of the probiotics including porosity, fissures, high biodegradability under certain conditions, etc. The present study proposes the standardization of the encapsulation process of *Lactobacillus gasseri* in sodium alginate particles coated with Eudragit S-100 nanoparticles with the main goal of rising its viability during storage and its passing through the gastrointestinal tract. *L. gasseri* was isolated and microbiologically characterized as well as genetically from a commercial product, then, it was encapsulated in calcium alginate beads by ionic gelation. The encapsulation efficiency was 95 % with 7.2×10^7 colony-forming units (CFU) per gram of calcium alginate beads dissolved. The morphology of the systems was determined by SEM and the spectroscopic properties by ATR-IR. Both techniques revealed the formation of calcium alginate beads coated with Eudragit S-100 nanoparticles; so, this work demonstrates that is possible to encapsulate *L. gasseri* and preserve its viability after the encapsulation process with a high-speed homogenizer. The generated information in this proposal will have direct impact in laying the groundwork to microencapsulate several lactic acid bacteria present in human milk with the goal of formulating functional products addressed to new-borns that cannot receive human milk for several reasons as an essential food.

1 ANTECEDENTES

1.1 Probióticos

Los *probióticos*, de acuerdo con la organización mundial de la salud (WHO, por sus siglas en inglés), “son microorganismos vivos los cuales al ser administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud en el huésped” (Hill et al., 2014).

Por su parte, el término *prebiótico* se define como “un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del huésped confiriendo un beneficio a la salud” (Gibson et al., 2017). Estos sustratos generalmente son carbohidratos, polifenoles o ácidos grasos poliinsaturados que ayudan al crecimiento de bacterias que se consideran benéficas para el cuerpo humano. En conjunto, probióticos y prebióticos constituyen lo que se conoce como *simbióticos* (Sarao & Arora, 2017).

Las bacterias probióticas han adquirido gran popularidad en estas últimas dos décadas debido a la creciente evidencia científica de sus efectos benéficos en la salud humana (Kechagia et al., 2013). Los probióticos han demostrado ser agentes de protección inmunológica a través de la estimulación y regulación de las respuestas inmunes (Azad et al., 2018), así como un tratamiento alternativo para pacientes con enfermedad inflamatoria en el intestino (Jia et al., 2018). De igual forma, estas bacterias benéficas pueden inhibir el crecimiento de diversos patógenos como *Clostridium difficile* (causante de diarrea y afecciones intestinales como la colitis) y mejorar algunos procesos digestivos como la intolerancia a la lactosa; además, las bacterias probióticas tienen la característica de ser organismos generalmente reconocidas como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) (Schoster et al., 2013; Wilkins & Sequoia, 2017).

Es importante resaltar la importancia económica e industrial que tienen los probióticos, por ejemplo, en América Latina, se estima que el valor del mercado de probióticos en 2018 fue de 5.58 billones de dólares y se espera que incremente a 7.73 billones de dólares para el 2023, de acuerdo con el portal de estadísticas para datos de mercado *Statista* (Probiotics Market Value in Latin America 2018 | Statista, n.d.).

Los microorganismos probióticos más utilizados en la industria alimentaria son las bacterias ácido-lácticas (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Neffe-Skocińska et al., 2018). Sin embargo, otras cepas bacterianas también son utilizadas y es

importante mencionar que las levaduras y hongos también podrían ser utilizados como agentes probióticos. Los productos probióticos pueden ser adquiridos en farmacias, tiendas de alimentos y suplementos alimenticios ya sea en establecimientos públicos o vía internet. Algunos ejemplos de productos probióticos comunes se muestran en la Tabla 1 (McFarland, 2015).

Tabla 1 Algunos ejemplos de productos probióticos con diferentes cepas probióticas.

Cepa probiótica	Formulación	Nombre de la marca (Fabricante)	Eficacia basada en la evidencia
<i>Bifidobacterium animalis subsp lactis</i> DN-173010	Yogur	Activia (Danone)	Constipación
<i>B. animalis subsp lactis</i> Bb-12	Cápsulas, leche fermentada	BB-12 (Chr Hansen)	Eczema
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Bebidas, cápsulas	Align (Procter & Gamble)	Síndrome del intestino irritable
<i>Enterococcus faecium</i> SF 68	Polvo	Bioflorin (Cerbios-Pharma)	Diarrea adulta aguda
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Lb	Cápsulas	Lacteol (PUMC Pharm)	Diarrea pediátrica aguda
<i>L. casei</i> DN-114001	Leche fermentada, yogur	Actimel, DanActive (Danone)	Prevención de diarrea pediátrica y de infecciones respiratorias

<i>L.casei</i> Shirota	Leche fermentada	Yakult	Constipación, infecciones causadas por <i>H. pylori</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1	Leche	NC1 (Nestle)	Infecciones causadas por <i>H. pylori</i>

Cabe ahora preguntarse, ¿cómo actúan los probióticos en el cuerpo humano? para ello, es importante reconocer que nosotros (y, en general, cualquier animal) somos el hogar de muchísimas bacterias, arqueas y otros eucariontes. En el tracto digestivo moran más de 10^{14} microorganismos (Thursby & Juge, 2017) o, en palabras, más de cien trillones de microorganismos que conviven en un ambiente dinámico y altamente ignoto para los científicos.

El desarrollo de la llamada *microbiota intestinal* empieza desde antes de nacer y se desarrolla casi por completo en la niñez (Plaza-Diaz et al., 2019).

Por ello, la configuración de la microbiota intestinal que se adquiera en edades tempranas será clave importante para el establecimiento del microbioma en edades posteriores. Además, mientras la microbiota es relativamente estable a través de la adultez, el envejecimiento induce cambios significativos en la composición y función del microbioma intestinal asociados con una reducción en la diversidad microbiana (Badal et al., 2020; Bosco & Noti, 2021).

El estudio de los probióticos, así como sus efectos en las personas, es bastante reciente, pero ha ido creciendo año con año. En 2019, por ejemplo, se alcanzaron poco más de 4171 publicaciones de acuerdo con el sitio *ScienceDirect*; lamentablemente, el crecimiento del número de pruebas aleatorias controladas no ha sido del todo rápido (Sanders et al., 2019a).

En la literatura se ha reportado que los probióticos actúan principalmente de estas formas (Gogineni & Morrow, 2013; Plaza-Diaz et al., 2019):

- Producción de enzimas
- Modulación del sistema inmune
- Interacción con la microbiota del intestino

- Producción de ácidos orgánicos
- Resistencia a la colonización
- Mejoramiento de la función de barrera
- Interacciones probiótico-huésped mediadas por estructuras celulares de superficie
- Manufactura de moléculas pequeñas con efectos sistémicos.
- Interacción con el eje intestino-cerebro

Las actividades enzimáticas que más se han encontrado son aquellas que corresponden a la β -galactosidasa y la hidrolasa de sales biliares (Sanders et al., 2019b). La primera es de suma importancia para romper las moléculas de lactosa y permitir que el cuerpo aproveche los azúcares como la galactosa y glucosa para otras funciones (como la energética). Generalmente, cuando las personas tienen un déficit de esta enzima es que son intolerantes a la lactosa y los productos elaborados que contengan este disacárido suelen generarles mala digestión (Sanders et al., 2019b).

El sistema inmune, como sabemos, es innato o adaptativo, es decir, aquél que se desarrolla a lo largo del crecimiento de la persona. En este aspecto, los microorganismos de nuestro microbioma estimulan la producción de ciertas moléculas que tienen propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias como las interleucinas IL-10, IL-12 o el factor de crecimiento transformante beta, TGF- β (Cristofori et al., 2021; Plaza-Diaz et al., 2019).

Harbige et al. (2016) evaluaron el efecto que tenía la ingesta de un alimento con *Lactobacillus casei Shirota* (probiótico que se encuentra en el producto comercial Yakult) en el sistema inmune de adultos sanos. Su estudio demostró que hay un aumento de la expresión de proteínas CD69 que es un marcador biológico que indica la activación de células T (células del sistema inmune adaptativo) así como la producción de interferones (IFN- γ) que son citocinas o moléculas de señalización que tienen un papel importante en la respuesta inmune. Otro mecanismo que utilizan las bacterias “buenas” para promover la respuesta inmune se esquematiza en la Fig. 1 (Plaza-Diaz et al., 2019). En este caso las bacterias se unen a receptores TLR (toll-like receptors) que son proteínas transmembranales (se han encontrado 10 tipos diferentes de estas proteínas en mamíferos) y al hacerlo, desencadenan una serie de señalizaciones en donde se terminan generando interleucinas (IL-1 β) y otros factores importantes entre ellos *NF κ B* o factor nuclear de transcripción capa B. Dicho factor nuclear

está implicado en la regulación de la transcripción del ADN asimismo en el control de las respuestas inmunitarias e inflamatorias (*Definición de NF- κ B - Diccionario de Cáncer - National Cancer Institute, n.d.; Plaza-Diaz et al., 2019*).

Los probióticos son conocidos por competir con bacterias patógenas mediante la unión con las células epiteliales del tracto gastrointestinal (TGI) (Plaza-Diaz et al., 2019).

De igual forma ha sido estudiado el papel de los probióticos y la aminoración de efectos secundarios como la diarrea causada por el uso de antibióticos o por la infección debida a algunos agentes patogénicos. En lo que respecta, Goldenberg et al. (2017a) realizaron una extensa investigación en la literatura para evaluar la eficacia y seguridad de probióticos para la prevención de diarrea asociada a *Clostridium difficile* en niños y en adultos. Los autores concluyeron que la evidencia sugiere que los probióticos son efectivos para la prevención de dicho padecimiento intestinal, aunque en algunas personas se encontraron síntomas adversos debido a que eran pacientes inmunocomprometidos. Así, pues, recomiendan el uso combinado de antibióticos y de probióticos.

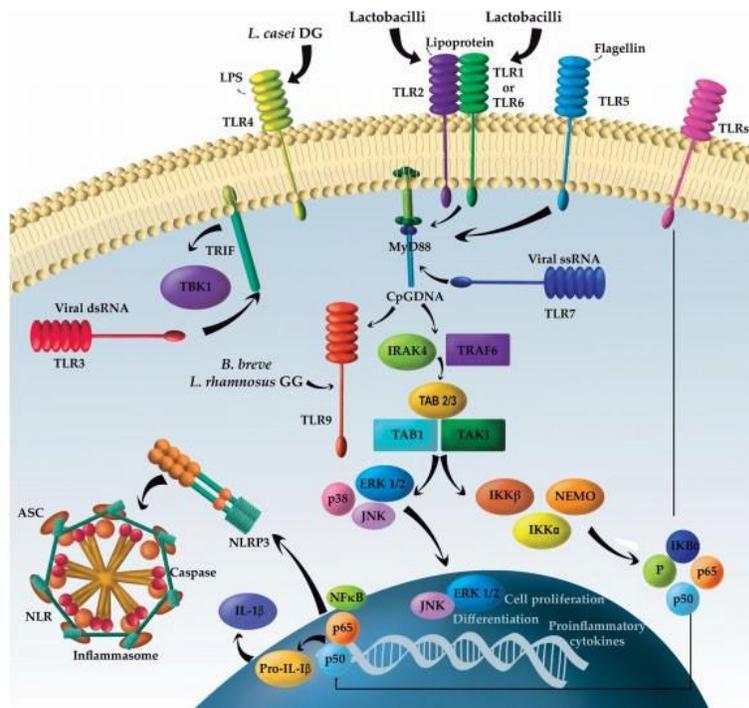


Fig. 1 Efectos inmunológicos desencadenados por probióticos y su interacción con receptores

celulares transmembranales de tipo Toll (Plaza-Diaz et al., 2019).

Es bien sabido que algunas especies de bacterias como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en asociación con otros microorganismos como *Faecalibacterium* pueden producir butirato y otros ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés) (Harbige et al., 2016).

Canfora et al. discuten la importancia de estos productos metabólicos sobre todo en relación con la obesidad y la diabetes (Canfora et al., 2015). La conclusión de los autores refleja, primero que nada, la falta de estudios en personas ya que la mayoría de éstos se realizan en modelos con animales. En segundo lugar, ellos sugieren que los SCFA podrían incrementar el gasto de energía, estimular la producción de hormonas que regulen la saciedad y que el acetato podría mejorar la regulación central del apetito previniendo con ello la obesidad. Además, tal parece que se mejora la sensibilidad a la insulina, esto significa que tienen una menor resistencia a dicha hormona y por ello requerirán de una menor cantidad de esta para mantener normales los niveles de glucosa en la sangre (Perlmutter & Loberg, 2013).

Si la presencia de estos microorganismos en nuestro tracto digestivo (y en otras partes del cuerpo humano como la cavidad oral, la nasofaringe, el tracto respiratorio, etc.) tiene como consecuencia una correcta homeostasis que se traduce en una buena salud, lo lógico sería pensar que un desequilibrio en el número de dichas bacterias significaría un estado de enfermedad. De hecho, esto sí ocurre y se le conoce como *disbiosis*. La disbiosis se define como “las alteraciones de la microbiota intestinal y la respuesta adversa del hospedero a estos cambios” (Icaza-Chávez, 2013).

Estos microorganismos bajo condiciones anormales se convierten en *patobiontes*, y es que son diferentes a los patógenos oportunistas ya que estos últimos causan daño al entrar al cuerpo humano mientras que los primeros sólo lo hacen en un ambiente desbalanceado (Chow et al., 2011).

Dentro de las patologías autoinmunes destaca la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por sus siglas en inglés). Como su nombre lo dice, ocurren inflamaciones en el tracto gastrointestinal y se distinguen dos tipos dependiendo si sólo afecta al intestino grueso (CD) o a cualquier parte de dicho tracto (UC) (Wilson et al., 2016).

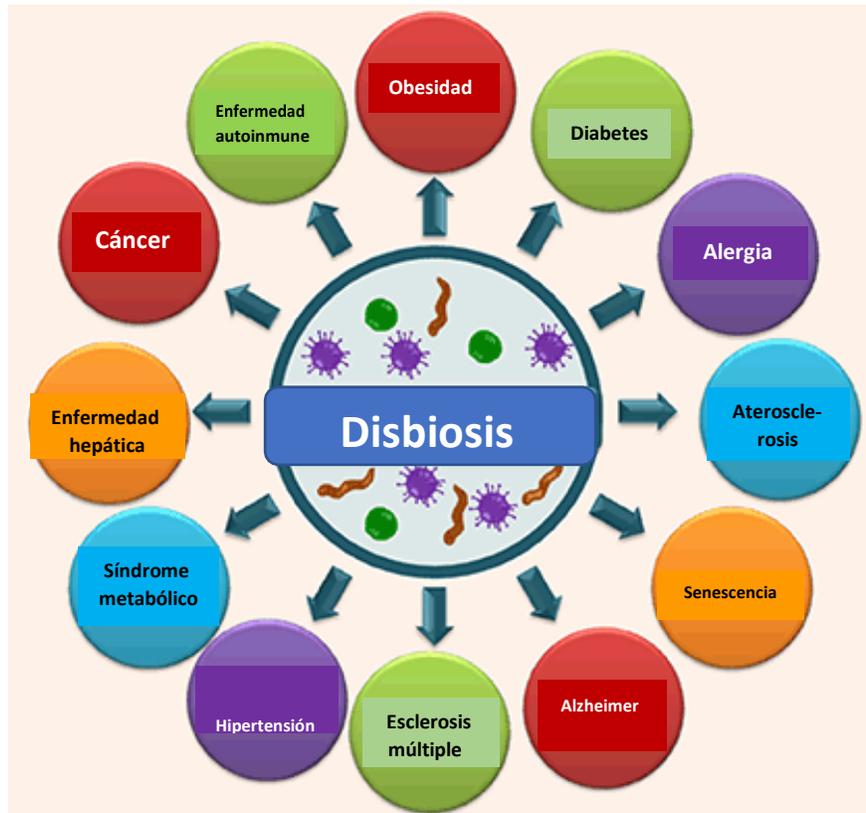


Fig. 2 Múltiples afecciones relacionadas con la disbiosis de la microbiota intestinal (Appanna & Appanna, 2018).

La causa esta enfermedad se suele ligar a la hiper sensibilidad de los linfocitos T hacia antígenos no patógenos presentes en la microbiota intestinal (Kho & Lal, 2018).

1.1.1 Probióticos en leche materna

La leche materna, pese a experimentar variaciones en las composiciones dependiendo del estadio de lactación, las condiciones de salud de la madre, la localización geográfica, la edad y demás factores, posee de forma general los mismos macro y micronutrientes (Ballard & Morrow, 2013; Padilha et al., 2019). Dentro de los macronutrientes se encuentran las proteínas (caseína, α -lactoalbúmina, lactoferrina, inmunoglobulinas, etc.), grasas (ácidos grasos como el palmítico y oleico) y azúcares (principalmente la lactosa y los llamados oligosacáridos de

leche materna o HMOS, por sus siglas en inglés). Por su parte, los micronutrientes de la leche materna son principalmente vitaminas (A, B1, B2, B6, B12 y D). Es importante mencionar que la leche materna contiene sustancias con efectos biológicos importantes, nos referimos a los compuestos *bioactivos* (células, inmunoglobulinas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, entre otros) (Padilha et al., 2019).

Gran parte de las investigaciones recientes apuntan que la leche materna no sólo provee de nutrientes al infante, sino que también sirve como una fuente de oligosacáridos (prebióticos) y de bacterias probióticas lo que ayudaría en un principio, al establecimiento de la microbiota intestinal de los infantes (Moossavi & Azad, 2019).

Ward. et al. (2013) llevaron a cabo un análisis metagenómico de leche materna de 10 mujeres donadoras. En dicho estudio encontraron preferentemente la presencia de *Staphylococcus* (75 %) y *Pseudomonas* (15 %). En menor medida se encontraron bacterias pertenecientes a los géneros, *Pantoea* (1.43 %), *Streptococcus* (1.07 %), *Lactobacillus* (0.2 %) y muchas otras.

Dentro del género *Lactobacillus* se han reportado numerosas especies como *L. plantarum*, *L. pentosus* (Jamyuang et al., 2019), *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. reuteri* (Soto et al., 2014), por mencionar algunas. Cabe mencionar que existen números estudios con respecto a las propiedades probióticas que presentan este tipo de bacterias como es el caso de *L.gasseri*.

1.1.1.1 Bacterias ácido lácticas presentes en leche materna: *Lactobacillus gasseri*.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son miembros de un grupo de bacterias implicadas en varios procesos de fermentación. Generalmente se trata de bacterias Gram positivas que se encuentran principalmente en las superficies mucosas humanas como la cavidad oral, la vagina y el tracto gastrointestinal. Estas especies se encargan principalmente de los procesos de formación de ácido láctico en la fermentación de los alimentos como el queso. Empero, también se ven envueltos en la producción de compuestos benéficos como ácidos orgánicos, polioles, exopolisacáridos y compuestos antimicrobianos (Bintsis, 2018).

Ruiz et al. (2017) evaluaron la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus* spp. sobre algunas bacterias patógenas donde encontraron que 23 cepas (de las 27 que analizaron) redujeron el desarrollo de *Escherichia coli* O125:H7; 16 inhibieron a *Salmonella* spp. y 11 evitaron el desarrollo de *S. aureus*. Lo que indica que este tipo de bacterias además de ser seguras, podrían proveer de efectos benéficos en la salud de las personas.

Estudios recientes muestran que algunas bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* presentes en la leche materna podrían ser potenciales agentes inmunomoduladores ayudando a fortalecer el sistema inmune de los neonatos. De igual forma se sugiere en la literatura que este tipo de bacterias podrían prevenir alergias en edades tempranas (Forsberg, 2016; Pérez-Cano et al., 2010).

Específicamente, *L. gasseri* es una bacteria homofermentativa y termofílica encontrada en el tracto gastrointestinal, principalmente (Singroha et al., 2017b).

Gunyakti y Asan-Ozusalgam (2019a) estudiaron algunas propiedades de *L. gasseri* y determinaron que la cepa MA-4 posee propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Además, se realizaron ensayos en ambientes simulados de tracto gastrointestinal (pH ácido, sales biliares, pepsina y pancreatina), donde la mayor reducción del número de bacterias probióticas (en un factor de 2 en la escala logarítmica) se encontró en un pH de 2 después de 3 h. Esto supone una pérdida importante si tomamos en cuenta que en el ambiente real del tracto gastrointestinal intervienen otro tipo de enzimas y diversas sustancias que podrían afectar a las células bacterianas. Empero, los autores concluyen que la viabilidad celular podría considerarse buena y que esta cepa presenta características que las hacen deseables para su uso en probióticos, aunque ciertamente podría ser mejor con la ayuda de un sistema de protección extra como el uso de micropartículas.

Lamentablemente, el uso de muchas otras bacterias probióticas se ha visto reducida debido a la baja viabilidad que éstas tienen en ambientes con diferentes valores de pH como el del tracto gastrointestinal (TGI) así como en condiciones aeróbicas, de altas temperaturas, reacciones enzimáticas o químicas como de óxido-reducción (Jensen et al., 2012).

Para enfrentar lo anterior, numerosos mecanismos se han propuesto para brindar protección y estabilidad a las bacterias probióticas y que puedan realmente llegar a su destino y proveer de los efectos benéficos que se les atribuyen. Una de estas estrategias que ha surgido como una herramienta útil para conservar la viabilidad de los probióticos durante almacenamiento y su paso a través del TGI es implementar sistemas de encapsulación y liberación controlada a microescala (microencapsulación) (Rodrigues et al., 2020).

1.2 Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica utilizada para envolver y entrapar sustancias líquidas,

sólidas y gaseosas en materia prima de diversa naturaleza (polímeros, proteínas, lípidos, etc.) que funciona como material de pared; se forman en este caso microcápsulas que tienen un tamaño desde 1 μm hasta cientos de micrómetros (da Silva et al., 2014; Das et al., 2011b). El material que se va a encapsular se denomina núcleo, agente activo, fase interna o cargo. La envoltura o el material que encapsula el núcleo se designa como material pared, material de recubrimiento, membrana, coraza, material acarreador, fase externa o matriz.

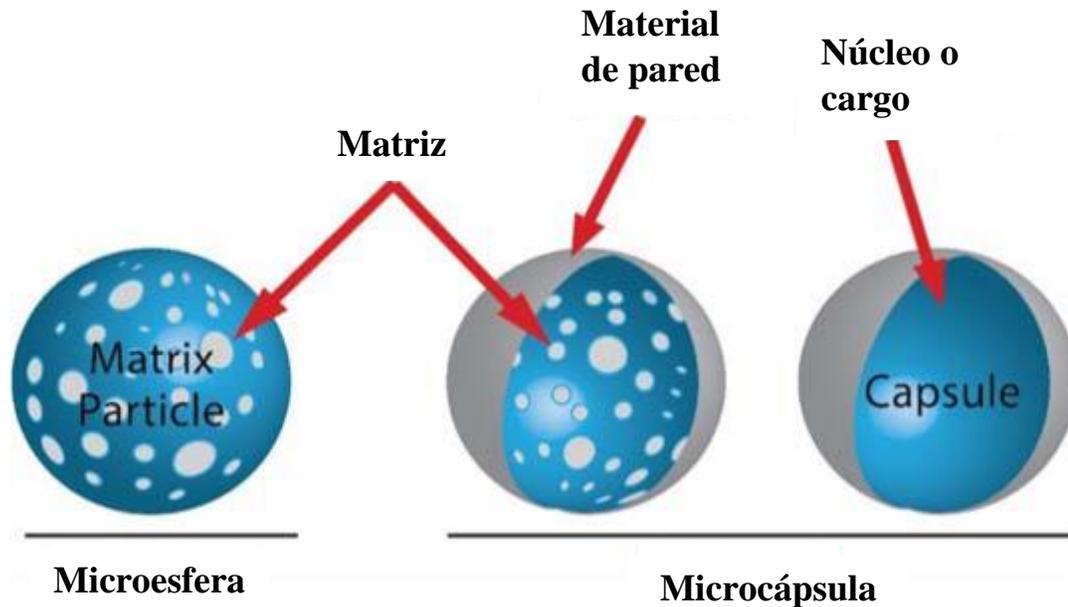


Fig. 3 Esquema ilustrativo de microesferas y microcápsulas. Adaptado de (Asghari et al., 2017).

Por su parte, en la Fig. 3 se muestra la estructura típica de una microesfera y se detalla la principal diferencia entre ésta y una microcápsula.

De hecho, las microesferas pueden ser caracterizadas como sistemas matriciales en donde un fármaco, célula o cargo está homogéneamente disperso, ya sea disuelto o suspendido homogéneamente.

Por otro lado, las microcápsulas son partículas heterogéneas donde una membrana (coraza) rodea el núcleo formando un reservorio (Lengyel et al., 2019).

Tabla 2 Diversos métodos de microencapsulación utilizados actualmente.

<i>Químicos</i>	Físicos	
	Fisicoquímicos	Fisicomecánicos
<ul style="list-style-type: none"> • Polimerización <i>in-situ</i>. • Emulsión, suspensión, dispersión • Policondensación interfacial 	<ul style="list-style-type: none"> • Coacervación • Evaporación de solvente • Adsorción capa por capa • Precipitación compleja • Gelación iónica • Precipitación de fluidos supercríticos 	<ul style="list-style-type: none"> • Secado por aspersion y por congelación • Encapsulación electroestática • Encapsulación al vacío • Extrusión • Suspensión de aire

Las microcápsulas suelen ser los sistemas elegidos al momento de administrar algún fármaco o compuesto de interés, así como probióticos y prebióticos. Estos sistemas presentan algunas ventajas como i) protección contra agentes externos, ii) liberación controlada, iii) administración mejorada, entre otras (Singh et al., 2010). Cabe mencionar que las micropartículas suelen presentar diferentes morfologías (debido a su núcleo y a su coraza o capa) y de igual forma diferentes conformaciones atendiendo a la forma en que está disperso el agente activo en la microcápsula. Además, existen numerosas técnicas reportadas en la literatura, pero en general podemos dividir las en aquellas que son hechas por métodos químicos o físicos. Algunos de los métodos se presentan en la Tabla 2 (Das et al., 2011a). En el recuadro verde se resalta el método que nos atañe en el presente trabajo.

A continuación, se profundizará un poco en cada método y se resaltarán las principales ventajas y desventajas de estos.

1.2.1 Métodos químicos de microencapsulación

Podemos decir, que este tipo de métodos se basan en reacciones químicas en donde los monómeros junto con pequeñas moléculas se polimerizan para formar la pared polimérica de la microcápsula. Por ejemplo, en la polimerización *in situ*, se forma primeramente una

emulsión que contenga al núcleo o cargo (líquido o sólido) para después agregar monómeros reactivos (o pre-polímeros solubles) que precipitan sobre el núcleo o cargo con la acción de calor o catalizadores (Fu & Hu, 2017).

Otra técnica que entra en esta categoría es la llamada policondensación interfacial. Este método involucra la reacción de Schotten-Baumann entre un cloruro de acilo y un compuesto que contenga un átomo de hidrógeno reactivo. Estos dos reactivos poliméricos en una policondensación se unen y forman paredes delgadas en la interfaz de la microcápsula (Tomaro-Duchesneau et al., 2013).

El método de extrusión es uno de los métodos más antiguos y comunes para hacer cápsulas con hidrocoloides. Dicha técnica se basa en la preparación de una solución hidrocoloide y añadiendo las células bacterianas para posteriormente realizar la extrusión de la suspensión anterior a través de una aguja de jeringa. La técnica es relativamente fácil pero el problema reside en que es muy difícil el escalamiento industrial (Krasaekoopt et al., 2003).

Las técnicas de secado por aspersión, secado por congelación o secado por perlas fluidizadas muestran sus limitantes debido a que las células encapsuladas por estas técnicas son liberadas completamente en el producto (Gbassi & Vandamme, 2012).

Por su parte, la técnica de emulsión/gelación iónica presenta algunas ventajas como la facilidad de escalamiento y el tamaño que puede rondar desde los 25 μm -2 mm, esto permite tener un tamaño que pueda proteger a la bacteria (alrededor de 80 μm) y que a la vez no sea demasiado grande para ser percibido y que genera sensaciones no deseadas en los consumidores (Krasaekoopt et al., 2003; Martín et al., 2015). Por esto la gelación iónica puede ser una opción viable para encapsular probióticos.

1.2.1.1 Gelación iónica

También conocido como gelación iónica (*ionic/ionotropic gelation*, en inglés), involucra la interacción de un polímero iónico con un ion de carga opuesta para iniciar el entrecruzamiento polimérico (Ahirrao et al., 2014).

En este respecto, el alginato de sodio ha demostrado ser una opción viable y de alguna manera ecológica en la industria y en la comunidad científica utilizado en el método de gelación iónica debido a que esta técnica tiene una alta eficiencia de encapsulamiento (cercana, muchas veces al 100 %), se suelen utilizar biopolímeros naturales y biodegradables y no se requiere de

reactivos o equipos costosos para su preparación. De igual forma, las condiciones de temperatura y presión suelen ser las cercanas a las del ambiente, por lo que no existe un gasto energético elevado (Das et al., 2011a; Gbassi & Vandamme, 2012; Krasaekoopt et al., 2003; Pedroso-Santana & Fleitas-Salazar, 2020).

Los alginatos son polisacáridos aniónicos (cargados negativamente) que se encuentran en las paredes celulares de las algas pardas y también pueden ser producidos por bacterias no patógenas y fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter vinelandii*.

Estos biopolímeros consisten en los ácidos 1,4- β -D -manurónico y 1,4 α -L-gulurónico (éste último en menor medida) cuya estructura molecular se muestra en la Fig. 4.

Los alginatos pueden formar fácilmente estructuras sólidas o semisólidas en condiciones templadas por su habilidad de realizar transiciones sol/gel. Además, son comúnmente usados como agentes para incrementar la viscosidad, espesantes, y estabilizadores de suspensiones y emulsiones en diversas industrias como la de los alimentos y la farmacéutica (Szekalska et al., 2016).

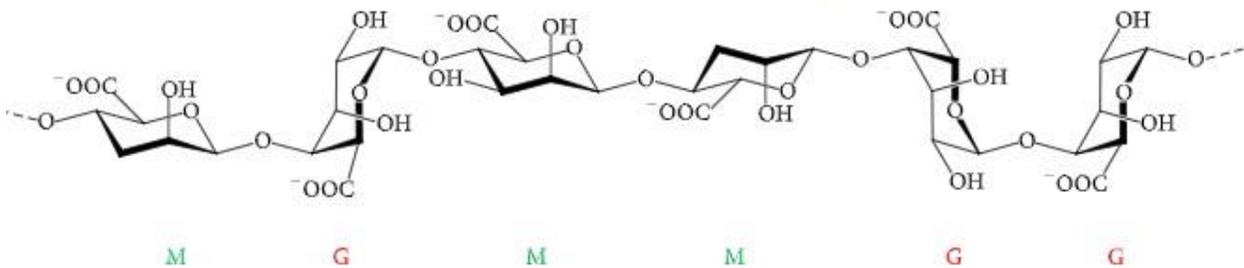


Fig. 4 La estructura del alginato. Se muestran los bloques de construcción. M representa el ácido manurónico y G el ácido gulurónico unidos mediante enlaces R-O-R, donde R es la molécula del carbohidrato de alguno de los dos ácidos ya mencionados (Szekalska et al., 2016).

La gelación de los alginatos puede ser inducida por la presencia de iones divalentes (como aquellos que nos proporcionan las sales de CaCl₂) positivos, los cuales entrecruzan las cadenas del polímero debido a que actúan como una especie de agentes quelantes a través del modelo de “caja de huevo” (Wang et al., 2018).

Usualmente las micropartículas (o en algunos casos, nanopartículas) formadas con alginato de

sodio son recubiertas con otra capa polimérica. Este segundo polímero podría funcionar como un segundo recubrimiento adicional. De hecho, Khosravi et al. (2018) microencapsularon *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum* en micropartículas de alginato de sodio recubiertas con quitosano. En sus estudios encontraron que hubo un incremento de los probióticos microencapsulados en un ambiente en donde se simulaban las condiciones del jugo intestinal y jugos gástricos. Los autores atribuyen este incremento a la segunda cubierta de quitosano que actuó como barrera protectora de las micropartículas.

Otro ejemplo es el de Afzaal et al. (2019) en donde encapsularon *L. acidophilus* utilizando dos polímeros, a saber, alginato de sodio y carragenano (polisacárido derivado de la galactosa) para evaluar su efecto en helado y en condiciones simuladas de tracto gastrointestinal. En este estudio se determinó que hubo una mejora en la supervivencia de las células encapsuladas en el helado en comparación con aquellas libres. Es importante mencionar que la unidad formadora de colonias disminuyó a los 120 días.

Es de especial interés los polímeros entéricos, o sea, polímeros que puedan resistir los efectos de los jugos gástricos y que se disuelvan posteriormente en el intestino. Existen en el mercado numerosos polímeros que cumplen con estas características v.g., aquellos derivados de la celulosa como HPMC AS-LF y HP-55 o aquellos derivados del ácido acrílico/ metacrílico (Eudragit L100 y S100) (Barbosa, Al-Kauraishi, et al., 2019).

El Eudragit S100 es un copolímero aniónico que es sensible al pH, lo que lo hace idóneo para la liberación localizada. Es un polímero entérico ya que no se degrada en un pH menor de 7. Esto significa que no se disolvería en el ambiente ácido que presenta el estómago y conferiría de protección a las sustancias o cargos hasta llegar al intestino grueso que presenta un pH mayor de 7. Además, ha sido utilizado ampliamente en formulaciones farmacéuticas como acarreador de fármacos (Asfour & Mohsen, 2018a; Qelliny et al., 2019).

Ansari. et al. (2017) evaluaron la viabilidad de algunas bacterias ácido lácticas en micropartículas de alginato-quitosano y nanopartículas de Eudragit S100 donde encontraron un incremento de bacterias viables en los sistemas de doble capa en un ambiente simulado de jugo gástrico.

2 HIPÓTESIS

La viabilidad del probiótico *L. gasseri* se mantiene luego del proceso de encapsulamiento en compositos híbridos basados en partículas de alginato de calcio recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estandarizar el proceso de encapsulación de *Lactobacillus gasseri* en partículas de alginato de sodio recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar *Lactobacillus gasseri* de un producto comercial.
- Caracterizar *L. gasseri* mediante técnicas microbiológicas y su identificación genética por secuenciación del marcador molecular 16S.
- Encapsular *L. gasseri* en partículas de alginato de calcio mediante la técnica de gelación iónica y recubrirlas con nanopartículas de Eudragit S-100.
- Determinar el porcentaje de viabilidad y eficiencia de encapsulamiento de *L. gasseri* en partículas de alginato de calcio.

- Evaluar las propiedades fisicoquímicas (tamaño, potencial zeta y morfología) de los sistemas desarrollados.
- Analizar las propiedades espectroscópicas de las perlas de alginato de calcio libres con y sin recubrimiento con nanopartículas de Eudragit S-100 mediante espectroscopía de infrarrojo.

4 METODOLOGÍA

4.1 Cultivo y aislamiento de *L. gasseri*.

L. gasseri fue aislada de un producto comercial (Swanson, EE. UU). Para ello, se disolvió el contenido de una cápsula en 5 mL de caldo LB (Difco, EE. UU) en un tubo de ensayo que se incubó en agitación (150 rpm) a 37 °C durante 24 h, posteriormente, se realizó una siembra con asa en agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Difco, Sparks, MD, EE. UU) sobre una caja Petri (de tal manera que se tuvieran 3 siembras diferentes en una misma caja Petri denominadas como 1118, 1119 y 1120) y se incubó a 37 °C durante 24 h.

Las bacterias se conservaron en caldo MRS (Difco, Sparks, MD, EE. UU) suplementado con 20 % (v/v) de glicerol a -80 °C.

4.2 Ensayos de caracterización e identificación genética de los aislados bacterianos.

Para corroborar la identidad de *L. gasseri*, se realizó una tinción de Gram, así como diversas pruebas microbiológicas, a saber, hemólisis, gelatinasa y DNasa.

4.2.1 Tinción de Gram.

La tinción de Gram resulta primordial para la identificación de *Lactobacillus* sp. Dicha técnica nos indica que *L. gasseri* es una bacteria Gram positiva (Kim et al., 2020). Por lo tanto, se realizó esta técnica siguiendo el protocolo de la American Society for Microbiology con ligeras modificaciones (Ann & Marise, 2019). En principio, se fijaron con flama indirecta 30 µL de cultivo bacteriano en un portaobjetos. Posteriormente, se tiñó con una solución de cristal violeta por 60 segundos para luego lavar el exceso con agua. Después, se colocaron gotas de Lugol de tal forma que se cubriera la muestra durante 1 minuto. Se lavó con agua como en el paso anterior. Acto seguido, se colocó durante 15 segundos el decolorante que en este caso fue una solución de etanol-acetona (7 partes de etanol y 3 de acetona). Se lavó con agua y se aplicó safranina como agente de contraste para detectar bacterias Gram negativas. Se dejó secar la muestra a temperatura ambiente y se observó al microscopio con aceite de inmersión a un aumento de 100x.

4.2.2 Prueba de hemólisis.

Para evaluar la producción de hemolisinas (Halder et al., 2017) por parte del aislado bacteriano de interés, se estriaron 4 cepas bacterianas sobre agar base sangre (5 % sangre de carnero). Dos de ellas fueron clonas de *L. gasseri* y los 2 restantes un control positivo y uno negativo (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente).

4.2.3 Ensayo de actividad de la gelatinasa.

Se inocularon en 4 tubos de ensayo que contenían gelatina nutritiva (extracto de carne 3 g/L, peptona de gelatina 5g/L y gelatina 120 g/L) 4 cepas bacterianas (una en cada tubo) mediante la técnica de punzado con aguja. Se incubaron a 37 °C durante 15 días. Posteriormente, los tubos se refrigeraron a 2 °C durante 15 minutos y se observó la gelatinización o no de los tubos.

4.2.4 Ensayo de la producción de DNasa.

Los aislados bacterianos fueron estriados en una placa de agar de DNA (triptona bacto 20 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, agar bacteriológico 20 g/L, y ácido desoxirribonucleico 2 g/L) para revisar la producción de la enzima DNasa. La caja Petri fue incubada a 37 °C durante 48 h para luego ser observada. Un halo transparente o con coloración rosa fue tomado como positivo (Yadav et al., 2016).

4.2.5 Extracción del ADN genómico.

Se llevó a cabo la extracción del ADN genómico con el método de extracción por fenol-cloroformo. Brevemente, los cultivos celulares se obtuvieron creciendo en tubos de ensayo llenos completamente (para evitar una alta concentración de oxígeno) de caldo MRS las cepas 1118 y 1119 que se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después del crecimiento, los cultivos celulares se colocaron en un tubo de 50 mL y se centrifugaron 13,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se descartó y se conservaron las pastillas celulares formadas en el fondo del tubo. Estas se almacenaron a -80 °C durante 12 h.

Las pastillas celulares se molieron en nitrógeno líquido, se colocaron en tubos de microcentrífuga y se les agregaron 400 µL de la solución tampón TSNTE (Tritonx100-SDS-NaCl-Tris-EDTA 1 M) y 400 µL de fenol-cloroformo junto con microperlas de vidrio. Se pusieron los tubos en el vórtex por 2 minutos, posteriormente se centrifugó por 10 minutos a

12,000 rpm y se recuperó la fase acuosa (fase superior) en un tubo de plástico de 1.5 mL y se descartó la fase orgánica. Se adicionaron 3 μL de la enzima RNAsa (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), se mezcló en el vórtex por 5 segundos y se incubaron los tubos a 37 °C por 5 minutos. Se les agregaron 400 μL de cloroformo a cada tubo y se mezclaron en el vórtex por 2 minutos para posteriormente centrifugar los tubos a 14,000 rpm por 7 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo de plástico de 2 mL, cuidando de mantener las muestras en hielo cuando no estuvieran en uso para conservar el ADN. Se añadió una décima parte del volumen de la muestra de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló y se llevaron las muestras a una temperatura de -20 °C por 1 h. Posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos para obtener la pastilla de ADN y se descartó el sobrenadante. Se agregaron a los tubos 300 μl de etanol a 70 %, se golpeó el tubo para tratar de resuspender la pastilla, se centrifugaron a 12,000 rpm por 3 minutos y se decantaron. Se colocó el tubo invertido para permitir secar la pastilla y se colocaron 60 μL de agua ultrapura para disolver el ADN. Finalmente, se cuantificó la concentración de ADN en un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop, Thermo Scientific, EE. UU).

4.2.6 Amplificación mediante PCR del fragmento 16S del aislado bacteriano.

Para la secuenciación genética, se realizó una PCR para amplificar el fragmento 16 S del ADN genómico de las bacterias. Para dicha reacción se mezclaron los siguientes reactivos: 1.5 μL de solución tampón DreamTaq, 0.25 μL de dNTPs, 0.25 μL de cebador hacia arriba (con la secuencia: TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T), 0.25 μL de cebador reverso (con la secuencia: AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG), 0.15 μL Taq DreamTaq, 4.35 μL de agua grado biología molecular (GBM) y 6 μL de ADN (25 ng/ μL). Se utilizó un termociclador (Thermal Cycler T100, Thermo Scientific, EE. UU) con la siguiente programación:

94 °C durante 3 minutos para la desnaturalización, seguido de 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación con cebadores a 64 °C por 30 segundos, elongación a 72 °C durante 100 segundos y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. El producto de la PCR se observó en gel de agarosa al 1% usando un marcador de peso molecular de 1 Kb. La banda de amplificación se visualizó con luz ultravioleta en el fotodocumentador modelo BIO RAD Gel Doctm XR+.

4.2.7 Purificación del amplicón obtenido mediante PCR.

Se limpió y purificó el producto de la PCR con ayuda de un kit de purificación (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research, EE. UU). Para ello, se añadieron 60 μ L del producto de la PCR en un tubo de microcentrífuga junto con 150 μ L de solución tampón ADB (incluido en el kit de purificación). Esta mezcla se incubó a 65 °C por 5 minutos. Acto seguido, se trasvasó la mezcla anterior a una columna Zymo-SpinTM (también incluida en el kit) soportada en un tubo de colección para centrifugar a 12,000 rpm durante 60 segundos. Se descartó el sobrenadante.

Después, se añadieron 200 μ L de solución tampón de lavado de ADN (provisto en el kit) a la misma columna y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto. Este paso se repitió una vez más. Se volvió a centrifugar por 30 segundos colocando la columna en tubo de microcentrífuga nuevo. Posteriormente, se agregaron 30 μ L de solución tampón de elución de ADN directamente a la matriz de la columna. Esta mezcla se incubó 60 segundos a 65 °C. Se centrifugó lo anterior durante 1 minuto para eluir el ADN. Este paso se repite. Finalmente, se cuantificaron 2 μ L en el espectrofotómetro de microvolúmenes y se hizo una corrida en gel de agarosa.

4.2.8 Secuenciación de los productos de PCR.

La muestra purificada de ADN fue secuenciada genómicamente mediante el método de Sanger en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad en el CINVESTAV Unidad Irapuato. La secuencia obtenida se comparó mediante alineamiento en BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.3 Microencapsulación mediante gelificación iónica de *Lactobacillus gasseri*.

4.3.1 Cultivo de bacterias.

En un tubo de ensayo estéril y lleno con caldo MRS se sembró la clona bacteriana designada como 1118. Se incubó a 37 °C durante 24 h. Al día siguiente, se inocularon 50 μ L del crecimiento bacteriano en otro tubo de ensayo lleno con MRS. También se incubó a 37 °C por 24 h. Después de la incubación, se volvieron a inocular 50 μ L, pero ahora en dos tubos de ensayo llenos con caldo MRS de este nuevo crecimiento en las mismas condiciones de incubación. Finalmente, en un tubo de 50 mL estéril se colocaron los cultivos crecidos del día

anterior, y se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos hasta obtener una pastilla. El sobrenadante se descartó y se resuspendió la pastilla en 11 mL de agua estéril.

4.3.2 Encapsulamiento de *L. gasseri*.

Todos los reactivos y soluciones utilizados fueron previamente esterilizados a 120 °C durante 15 minutos en autoclave previo al proceso de encapsulamiento para garantizar la inocuidad de la encapsulación. En el caso de la solución de alginato de sodio, se esterilizaban por separado sus componentes, es decir, el alginato en polvo y el agua con un pH de 4 para que, una vez estériles, se disolviera el alginato en el agua con un pH 4 y así evitar una mayor despolimerización por efecto de la temperatura de la autoclave.

Primero se preparó una solución de alginato de sodio al 2 % (p/v utilizando 50 mL de agua destilada con un pH ajustado a 4. Se homogenizaron 22.5 mL de la solución de alginato de sodio con 452 µL de aceite de soya y 400 µL de Tween 40 a 12,000 rpm, implementando un homogeneizador de mano de altas velocidades (D-160, Science MED, EE. UU) durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron al tubo que contenía esta mezcla, 2 mL de las bacterias resuspendidas en agua para homogenizarse con el mismo equipo que en el paso anterior, a 24,000 rpm hasta que la emulsión se tornara de color completamente blanco. Esta emulsión que contiene las bacterias se asperjó gota a gota (a una altura de 3 cm, aproximadamente) con una jeringa de insulina sobre una solución de cloruro de calcio al 2 % p/v que estaba en agitación a 100 rpm. Las perlas de alginato se formaron al instante y se dejaron madurar en agitación magnética por 15 minutos para finalmente ser filtradas y lavadas con agua destilada estéril. Dichas perlas se guardaron a 2 °C para su uso posterior.

4.3.3 Síntesis de nanopartículas de Eudragit S-100 y recubrimiento de las microperlas de alginato de calcio.

Las nanopartículas se prepararon mediante el método de desplazamiento de solvente (Pool et al., 2012). Brevemente, se disolvieron 100 mg de Eudragit S-100 (Evonik, Alemania) en 10 mL de etanol (97 % v/v) mediante agitación magnética (100 rpm) por 20 minutos a 25 °C. La solución resultante se añadió lentamente a una solución acuosa de alcohol polivinílico al 5 %. Dicha mezcla fue homogeneizada con el homogeneizador de mano D-160 a 18,000 rpm por 6 minutos. El solvente orgánico fue evaporado por 30 minutos usando un evaporador rotatorio. Las nanopartículas formadas fueron almacenadas a -4 °C para su uso posterior.

Para la formación de la recubierta de nanopartículas de Eudragit S-100 sobre la superficie de las microcápsulas de alginato de calcio, se colocaron 0.5 gramos de perlas de alginato de calcio en 15 mL de la solución que contenían las nanopartículas de Eudragit. Se mantuvieron en agitación magnética (150 rpm) durante 16 h. Finalmente, las microperlas recubiertas con las nanopartículas fueron filtradas, congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior liofilización (FreeZone 2.5, Labconco, EE. UU).

En la Fig. 5 se muestra el diagrama que resume el procedimiento la síntesis de las microperlas de alginato de calcio, así como el encapsulamiento de *L. gasseri* y su posterior disolución en citrato de sodio 3 % (p/v) para evaluar el porcentaje de encapsulamiento.

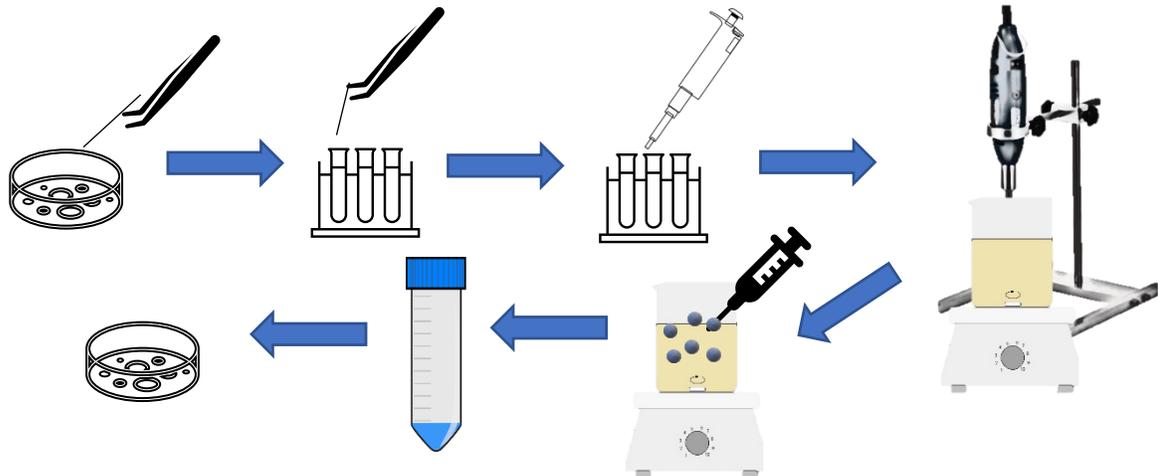


Fig. 5 Esquema de encapsulación de *L. gasseri* en partículas de alginato de calcio.

4.4 Caracterización fisicoquímica de las micropartículas.

Todas las micropartículas poliméricas, de una o dos capas, cargadas y libres fueron evaluadas por sus propiedades fisicoquímicas para dilucidar las mejores formulaciones para su subsecuente uso en el desarrollo de productos funcionales.

Se midió la eficiencia de encapsulamiento, la distribución de tamaños de partícula y la carga de superficie, así como la morfología de las cápsulas para terminar con el estudio de las propiedades espectroscópicas.

4.5 Evaluación de la eficiencia de encapsulamiento de *L. gasseri*.

Para realizar el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) se disolvieron 0.5 g de microperlas de alginato de calcio en 4.5 mL de una solución de citrato de sodio estéril (3 % p/v) con un pH de 6. Una vez disueltas, se sembraron las diluciones pertinentes mediante el método de vaciado en placa y se realizó el conteo de las UFC. Para determinar la eficiencia de encapsulación porcentual (% EE) y la viabilidad celular (% VC) se emplearon las fórmulas siguientes (Afzaal et al., 2020; Wu et al., 2012):

$$\text{Eficiencia de encapsulamiento (\% EE)} = \frac{N_e - N_u}{N_0} * 100$$

$$\text{Viabilidad celular (\% VC)} = \frac{N_0}{N_b} * 100$$

donde N_e representa el número de células presentes después de la disolución de las perlas en citrato de sodio, N_u es el número de bacterias no embebidas que permanecen en la solución de CaCl_2 , N_0 el número de células después de la mezcla de componentes con el homogeneizador y N_b es el número de UFC antes de que se mezclan con el homogeneizador y los demás componentes (alginato de sodio, Tween 40 y aceite).

4.6 Distribución del tamaño de partícula y mediciones de carga superficial de las microperlas de alginato de calcio y de las nanopartículas de Eudragit S-100.

El diámetro medio de partícula, el índice de polidispersidad (IP) y la carga superficial (potencial ζ) de las nanopartículas se determinaron mediante tecnología de dispersión dinámica de luz y dispersión de luz electroforética para el último caso (Litesizer 500, Anton Paar, México).

4.7 Morfología.

La morfología de las perlas de alginato de calcio libres y recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100 se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (EVO-50, Zeiss, Alemania).

4.8 Propiedades espectroscópicas

Las propiedades espectroscópicas de las muestras como el espectro de absorción infrarrojo se determinaron mediante absorción infrarroja utilizando la Transformada de Fourier y el método

de reflexión total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) utilizando un espectroscopio Spectrum GX (Perkin-Elmer, MA, EE. UU).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento y caracterización bacterianas.

Lactobacillus gasseri es una especie que se encuentra, principalmente, en el microbioma vaginal sano y también ha sido identificado y aislado del tracto gastrointestinal humano previamente (Pan et al., 2020). *L. gasseri* es una de las especies predominantes del grupo *Lactobacillus* y se le define como un microorganismo generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) (Gunyakti & Asan-Ozusaglam, 2019b).

Estudios recientes resaltan el papel de *L. gasseri* que podría tener como potencial probiótico. Por ejemplo, Niha et al. (2018), observaron la inhibición promovida por *L. gasseri* ATCC 9857 contra la adhesión de *Trichomonas vaginalis* a las células del hospedero. *T. vaginalis* es conocida por causar tricomoniasis, una infección vaginal. En otro estudio, Kensei et al. (2019) concluyeron que el uso prolongado de *L. gasseri* CP2305 podría mejorar el estado mental, la calidad del sueño, así como la microbiota de adultos bajo condiciones de estrés derivadas de padecimientos como el síndrome de intestino inflamado.

También, Xiang y colaboradores, investigaron la reducción de purinas en el intestino. Los investigadores concluyeron en su estudio que *L. gasseri* PA3 podría reducir las concentraciones de ácido úrico (y con ello, prevenir enfermedades como la gota e hiperuricemia) y jugar un papel importante de homeostasis en el colon ascendente (Xiang et al., 2019).

Las colonias formadas por *L. gasseri* en una placa de agar MRS después de hacer un estriado con asa en caja Petri, se muestran en la Fig. 6. La morfología de las colonias fue circular y de color blanco, típicos de otras cepas bacterianas pertenecientes al género *Lactobacillus* (Reuben et al., 2019).

Se conservaron 3 cepas de *L. gasseri* en un cepario con los códigos de identificación 1118, 1119 y 1120 a -80 °C con glicerol como agente criogénico.

Luego de que se tomara una colonia con un palillo estéril y se frotera sobre un portaobjetos, se realizó la tinción de Gram y en la Fig. 7 se muestran bacterias Gram positivas con forma de bacilo después de realizar la tinción. La mayoría de las especies bacterianas pertenecientes a este género presenta esta morfología y son Gram positivas (Martinez et al., 2014).

5.2 Ensayos de actividad hemolítica, gelatinasa y DNasa

Uno de los criterios de selección de bacterias probióticas es la ausencia de α y/o β -hemólisis debido a que la producción de hemolisinas podría romper la capa epitelial del intestino (Singroha et al., 2017a). En el caso de la producción de gelatinasa, su presencia es indicada por la licuefacción del medio de cultivo bacteriano y su persistencia después de la refrigeración, es decir, ocurre la hidrólisis de la gelatina (da Silva et al., 2019). Al igual que la actividad hemolítica, la gelatinasa podría causar daños en el tracto gastrointestinal y, en específico, en la mucosa que recubre el intestino (Kalui et al., 2009).

En el presente trabajo, *L. gasseri* (las clonas 1118 y 1119) no presentó actividad hemolítica ni producción de gelatinasa como se muestra en la Fig. 8 y Fig. 9, respectivamente. Por otro lado, el control positivo *S. aureus* produjo β hemólisis y fue positiva a la producción de gelatinasa, como se había reportado anteriormente (Bertelloni et al., 2021).



Fig. 6 Unidades formadoras de colonia de *L. gasseri* crecidas en placa de agar MRS aisladas de un producto comercial.

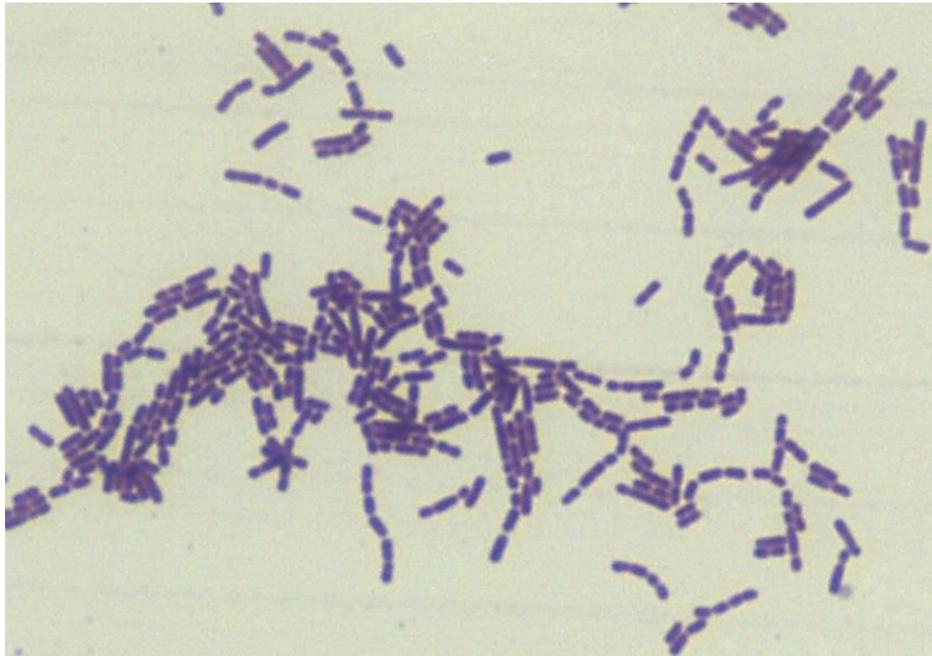


Fig. 7 Tinción de Gram de *L. gasseri* 1118. Se observa la forma típica y coloración propias de especies Gram positivas a través del objetivo 100X con aceite de inmersión.

En el caso de *E. coli*, no se observa de actividad hemolítica, sin embargo, presenta producción de gelatinasa.

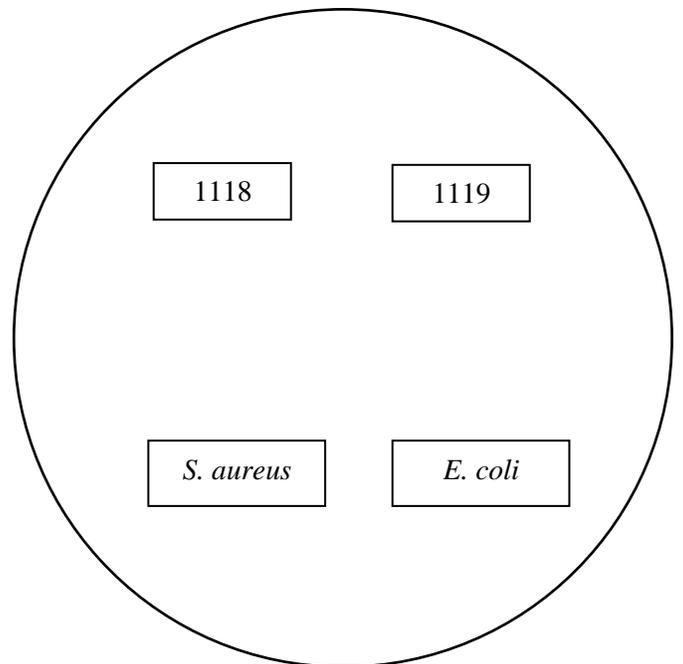


Fig. 8 Ensayo de hemólisis para la caracterización de *L. gasseri*. Las bacterias se sembraron en agar sangre suplementado con sangre de cordero al 5 %. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

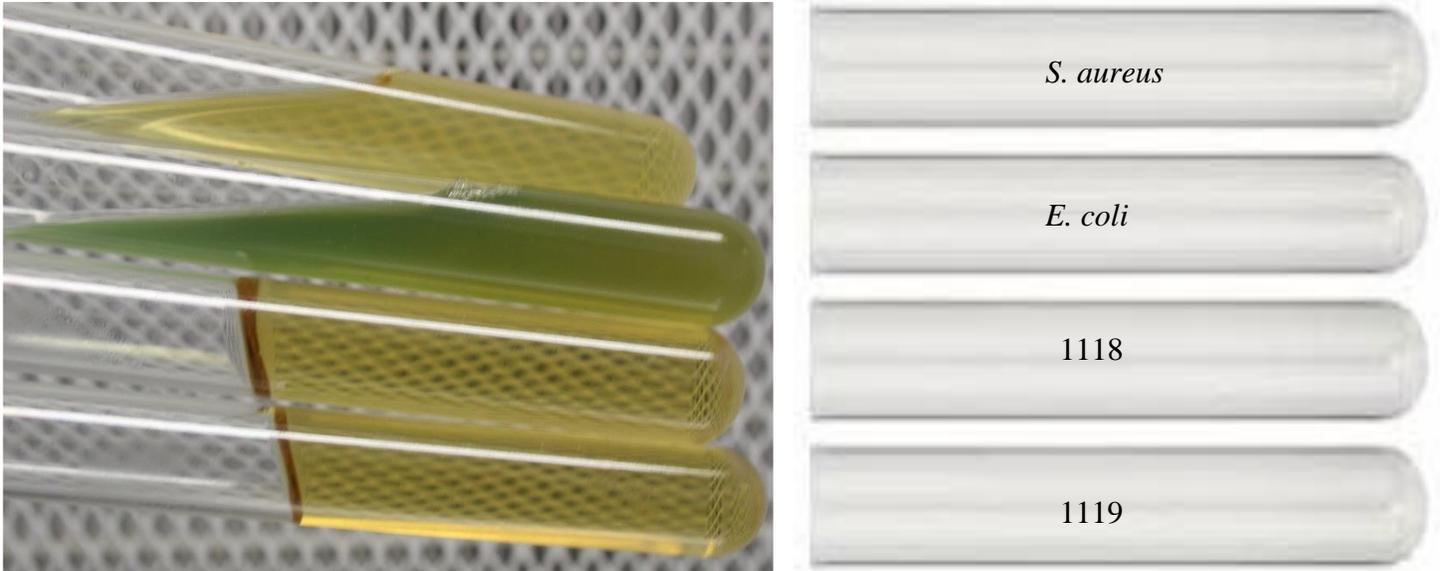


Fig. 9 Ensayo de gelatinasa donde se muestra que *L. gasseri* cepas 1118 y 1119 no producen gelatinasa debido a que la gelatina no se licuó en comparación con los controles positivos de *S. aureus* y *E. coli*. Los tubos de agar-gelatina se incubaron a 37 °C durante 7 días para después refrigerarlos durante 24 h y verificar el estado del agar.

Finalmente, el ensayo de la DNasa se realizó con las mismas dos cepas que en los ensayos anteriores. En este caso, 1118 y 1119, resultaron negativas en la actividad de DNasa mientras que *S. aureus* fue la única positiva. Esto está de acuerdo con lo reportado en la literatura (Kateete et al., 2010).

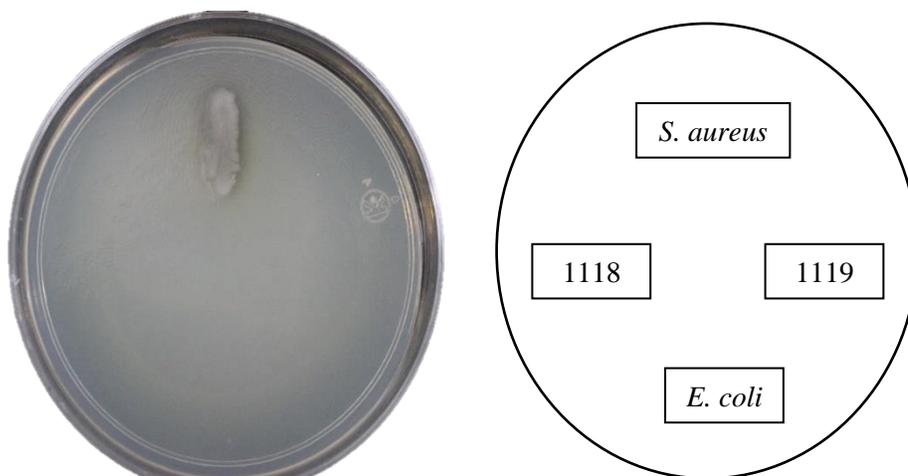


Fig. 10 Ensayo de actividad de DNasa. *L. gasseri* resultó negativa en la actividad de la DNasa mientras que *S. aureus* fue positiva, como se esperaba. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. El halo alrededor de *S. aureus* indica la producción de desoxirribonucleasa.

5.3 Identificación molecular

Las secuencias 16S rDNA, que codifican para los genes 16S rRNA, esto es, la subunidad 30S de los ribosomas en procariotas, son un marcador molecular de ~1,500 pb que comprenden nueve regiones variables interespaciadas a lo largo de la secuencia 16S altamente conservada (Johnson et al., 2019; Srinivasan et al., 2015).

Estas secuencias son de especial interés ya que son comúnmente usadas para la identificación bacteriana (debido a su alta conservación entre especies), incluyendo la identificación de especies de *Lactobacillus* (Kim et al., 2020).

Para la identificación de *L. gasseri* se realizó la amplificación de la secuencia 16S rDNA mediante PCR. En la Fig. 11 se presenta el gel de electroforesis del amplicón estudiado. Las bandas bien definidas que se observan tienen alrededor de 1,500 pb. Dichas bandas corresponden a las dos clonas analizadas en el presente trabajo, a saber, 1118 y 1119 en el canal 3 y 4, respectivamente.

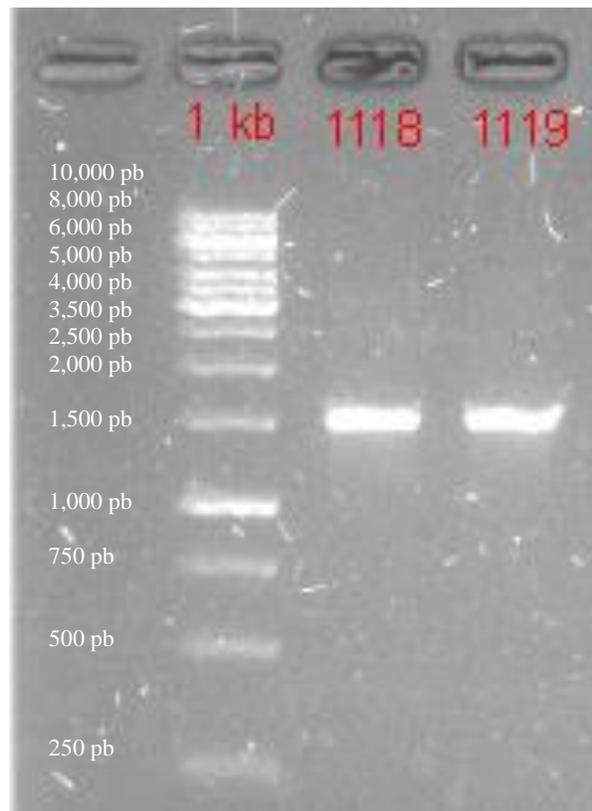


Fig. 11 Amplificación de la secuencia 16S rDNA. Carril 2: marcador de peso molecular 1 kb; carril 3: 1118; y carril 4: 1119

Luego, las secuencias obtenidas por el Langebio se analizaron en el sitio BLAST y se obtuvo un emparejamiento del 100 % con la cepa denominada como *Lactobacillus gasseri* 1770 (GenBank: MT597618.1). En la Fig. se muestran 10 alineamientos principales obtenidos por BLAST al analizar la secuencia de *L. gasseri* de la cepa 1118.

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ Select columns ▼ Show 10 ⓘ									
<input checked="" type="checkbox"/> select all 10 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus gasseri strain 1770 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus gasseri	2665	2665	100%	0.0	100.00%	1482	MT597618.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus gasseri strain 1357 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus gasseri	2665	2665	100%	0.0	100.00%	1470	MT573779.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus gasseri strain 4769 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus gasseri	2665	2665	100%	0.0	100.00%	1478	MT545146.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus gasseri strain 7534 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus gasseri	2665	2665	100%	0.0	100.00%	1447	MT516138.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus gasseri strain 5176 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus gasseri	2665	2665	100%	0.0	100.00%	1481	MT510264.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus gasseri strain 4826 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus gasseri	2665	2665	100%	0.0	100.00%	1483	MT505594.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus gasseri strain 8031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus gasseri	2665	2665	100%	0.0	100.00%	1488	MT464216.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus gasseri strain 7034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus gasseri	2665	2665	100%	0.0	100.00%	1482	MT464080.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus gasseri strain 6864 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus gasseri	2665	2665	100%	0.0	100.00%	1482	MT463923.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus gasseri strain 5679 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus gasseri	2665	2665	100%	0.0	100.00%	1482	MT463589.1

Fig. 12 Emparejamientos obtenidos al analizar la secuencia obtenida por el Langebio del amplicón de *L. gasseri* cepa 1118. Se observa un 100 % de emparejamiento con cepas de *L. gasseri*, lo que permite concluir que la cepa 1118 aislada en el producto comercial pertenece a esta especie.

Las secuencias obtenidas en el presente trabajo se presentan en el Anexo 1. Esto anterior indica que las clonas 1118 y 1119 obtenidas y utilizadas para la encapsulación de probióticos corresponden a *L. gasseri*.

5.4 Encapsulación y eficiencia de encapsulamiento de *L. gasseri*.

Se encapsuló la bacteria probiótica por el método de gelación iónica. Esta bacteria resulta ser especialmente sensible al oxígeno por lo que su crecimiento en caldo MRS se cuidó de tal manera que se minimizara la presencia de aire durante su cultivo. Los parámetros elegidos para la encapsulación se determinaron con base en lo reportado en la literatura. Por ejemplo, la concentración del alginato de sodio es un factor importante que considerar. Esto se debe a que la concentración influye en la viscosidad de la solución. Una solución viscosa óptima que garantiza la formación de perlas de alginato esféricas debe ser mayor a 60 mPa s. Sin embargo, si se tiene una viscosidad mayor a 500 mPa s podría suceder que la solución sea muy difícil

de extruir y se deformen las perlas (Davarci et al., 2017) . Una solución al 2 % p/v de alginato de sodio (como la utilizada en este trabajo) ronda los 156 mPa s la cual la hace idónea para realizar la técnica de gelación iónica y obtener perlas esféricas. En la Fig. 13 se observan algunas perlas de alginato de calcio sobre una caja Petri después de salir del baño de cloruro de calcio. A simple vista, la morfología parece esférica y con un tamaño de 2 mm de diámetro, aproximadamente. El color blanquecino se debe a que la emulsión de alginato de sodio junto con el Tween 40, el aceite y las bacterias es una solución que se encuentra en el rango micrométrico (Langevin, 2020).

Una mirada bajo el microscopio (Objetivo 25X) muestra la morfología casi esférica de una perla de alginato de calcio, como se aprecia en la Fig. 14.

Otro factor que resultó especialmente importante para el encapsulamiento de *L. gasseri* fue la velocidad de homogenización a la que se sometía la mezcla de alginato de sodio, Tween 40, aceite de soya y la suspensión de *L. gasseri*. Se observó que el uso de un agitador vórtex (cuyo rango es de 0-2500 rpm) no logra una correcta homogenización de todos los componentes mencionados.

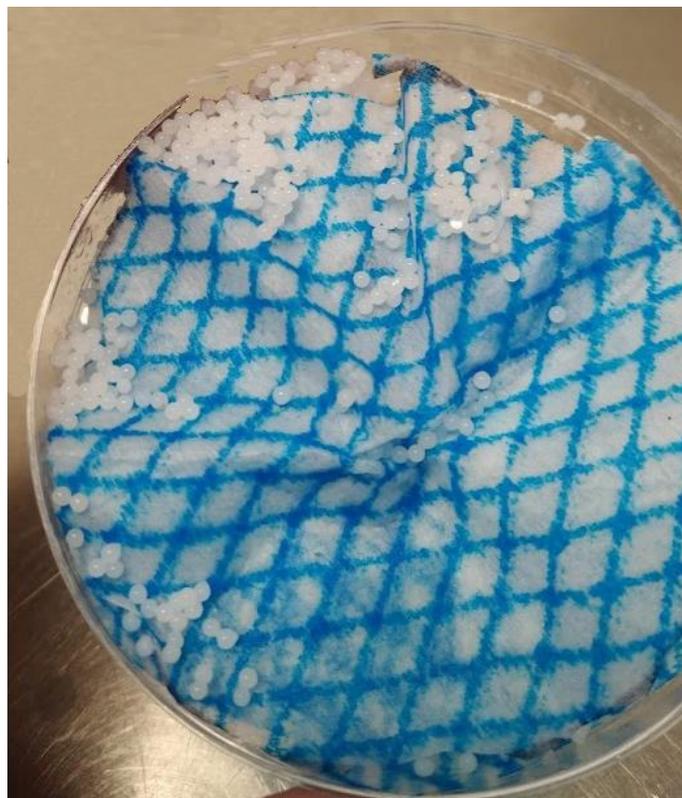


Fig. 13 Perlas de alginato de sodio cargadas con *L. gasseri* después de su formación en CaCl₂.

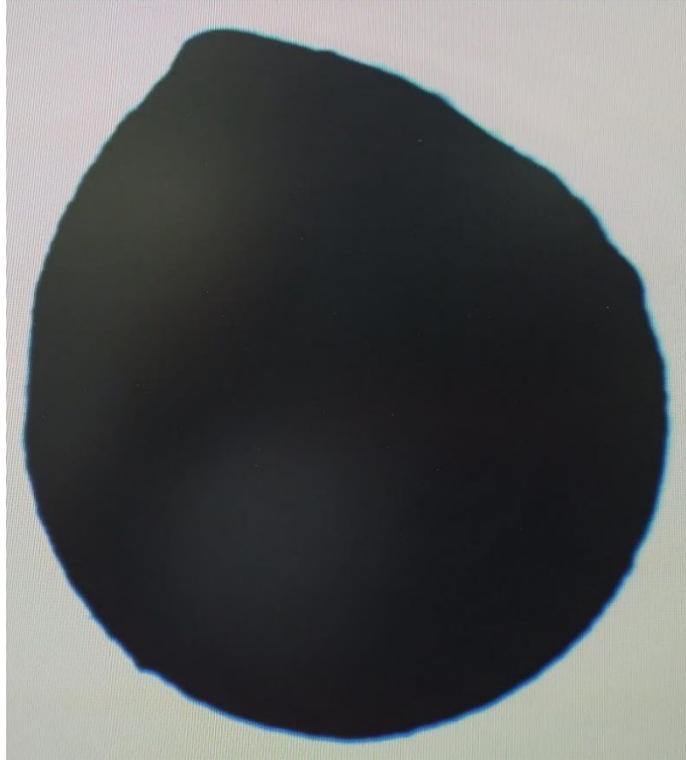


Fig. 14 Perla de alginato cargada con *L. gasseri* (sin recubrimiento) vista bajo el microscopio. Se observa la típica forma de pera o lágrima. (Davarcı et al., 2017).

En cambio, el uso de un homogeneizador de altas velocidades (como el utilizado en este trabajo) muestra la formación de una sustancia de tipo lechosa que indica que la emulsión se ha formado. Esto anterior podría ayudar a que *L. gasseri* quede completamente inmersa en las gotas de aceite de soya y de alguna manera, le sirva de protección al momento de entrar en contacto con la solución de alginato de calcio.

El surfactante utilizado, a saber, Tween 40, es utilizado para la formación de emulsiones y como agente estabilizador. Este surfactante es no-iónico y resulta de especial interés debido a que este tipo de emulsificadores suelen presentar una mejor biodisponibilidad y no tienen efectos adversos en la formación de las emulsiones (Petchsomrit et al., 2013). Además, su valor de balance hidrófilo-lipófilo (HLB, por sus siglas en inglés) es de 15.6, lo que lo hace ideal para emulsiones aceite en agua (o/w, también por sus siglas en inglés). La concentración de los surfactantes suele ser baja en este tipo de emulsiones. Por ejemplo, Khosravi Zanani et

al. (2014) encapsularon *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum* en perlas de alginato de calcio con un surfactante no-iónico (Tween 80, en su caso) a una concentración de 0.2 %. En este trabajo, se observó que para el caso del Tween 40, una concentración de 1.6 % p/v de este en la emulsión es suficiente.

Para conocer la eficiencia de encapsulamiento y el porcentaje de viabilidad de *L. gasseri* (cepa 1118) se hizo uso de las fórmulas presentada en la sección 4.4.1 del presente trabajo. Se comenzó con una concentración de 8.7×10^7 UFC/g de *L. gasseri* después de su crecimiento en caldo MRS. Esta concentración resulta mayor que la concentración de 1×10^6 UFC/g de células viables usualmente reconocida como estándar para tener un nivel “terapéutico mínimo” (Terpou et al., 2019). Al momento de homogeneizar todos los componentes y contar las bacterias viables se obtuvieron 7.56×10^7 UFC/g lo que podría indicar que el proceso de homogeneización a altas velocidades reduce la viabilidad celular en cierta medida. Después de realizar la encapsulación, se obtuvo que la concentración de bacterias en el baño de cloruro de calcio fue de 1.18×10^5 UFC/g. La concentración de las bacterias viables después de la disolución de las perlas de alginato en citrato de sodio fue de 7.2×10^7 UFC/g.

Así, pues, el porcentaje de encapsulación fue del 95 %. La viabilidad celular, por su parte, fue del 8 %. Sin embargo, Aunque la viabilidad parezca muy poca, la realidad es que después del proceso de homogeneización, se tienen 10 veces más concentración de bacteria que la recomendada.

Resultados similares en cuanto a eficiencia de encapsulamiento de probióticos fueron obtenidos por Khosravi Zanjani et al. (2014) quienes obtuvieron hasta un 98 % de eficiencia. Recientemente, Valera-Pérez y colaboradores encapsularon *L. gasseri* en perlas de alginato de calcio haciendo uso de un vórtex y de un *ultraturrax* (homogeneizador de altas velocidades) obteniendo una eficiencia de encapsulamiento del 65 % en ambos casos. Cabe mencionar que su velocidad máxima de homogeneización fue de 4,000 rpm durante 7 minutos (Varela-Pérez et al., 2022). Los autores señalan que a mayor velocidad existe una menor viabilidad celular. Sin embargo, una mayor velocidad (como la usada en este trabajo de 16,000 rpm) produce perlas de menor tamaño y podría mejorar la homogeneización de los componentes lo que a su vez, supondría una mejor eficiencia de encapsulamiento, aunque la viabilidad celular se vea un poco disminuida.

5.5 Tamaño y carga superficial de las nanopartículas de Eudragit S-100

La forma de las partículas, así como su tamaño, carga superficial (potencial zeta) e índice de polidispersidad son unos de los parámetros básicos que se deben recolectar al principio de la caracterización de sistemas nanoparticulados. El tamaño de la partícula determina si las nanopartículas son idóneas o no para una aplicación en específico (Kumar & Dixit, 2017).

En solución, se suele utilizar la técnica de DLS para conocer el diámetro hidrodinámico de una partícula. El diámetro hidrodinámico de una nanopartícula refleja el tamaño de la partícula cuando está en solución e incluye los recubrimientos o las modificaciones que sufre la partícula en cuestión debido a la solvatación, aglomeramiento, efecto corona, etc. (Maguire et al., 2018).

En un ensayo de DLS, los resultados que se obtienen suelen ser el diámetro promedio (también conocido como diámetro promedio-z) y la distribución de tamaño, junto con un estimado del ancho de la distribución (índice de polidispersidad, IP). La distribución de tamaño obtenida es una gráfica de la intensidad relativa de la luz dispersada por las partículas en varios tamaños y se conoce como una distribución de tamaño de intensidad (Malvern Instruments, 2001). Un dilema común en la comunidad científica es cómo representar los resultados ya que la distribución del tamaño de partícula puede basarse en intensidad, número y volumen. Sin embargo, el principio del DLS se basa en la intensidad, por lo que el diámetro hidrodinámico debería deducirse de las mediciones de intensidad mientras que los otros parámetros (volumen y número) se podrían usar como información adicional (Bhattacharjee, 2016).

La Fig. 15 muestra la distribución de tamaño de intensidad. El diámetro hidrodinámico promedio fue de 359.2 nm con un IP de 0.18.

El valor numérico del IP va desde 0.0 (para una muestra perfectamente uniforme en el tamaño de sus partículas) hasta 1.0 (para muestras altamente polidispersas con múltiples poblaciones de tamaños de partícula). Valores de 0.2 y menores son los comúnmente más aceptados en la práctica para nanopartículas poliméricas (Danaei et al., 2018).

En el caso del potencial zeta, podemos decir que éste es una medida de la carga eléctrica efectiva sobre la superficie de la nanopartícula. Una nanopartícula inmersa en una solución es rodeada por iones de carga opuesta a la “carga real” de la superficie de la nanopartícula. Entonces, el potencial zeta es la medida de la diferencia de potencial entre el fluido en bulto

en que una partícula está dispersada y la capa de fluido que contiene los iones con carga opuesta que está asociada con la superficie de la nanopartícula (Selvamani, 2019).

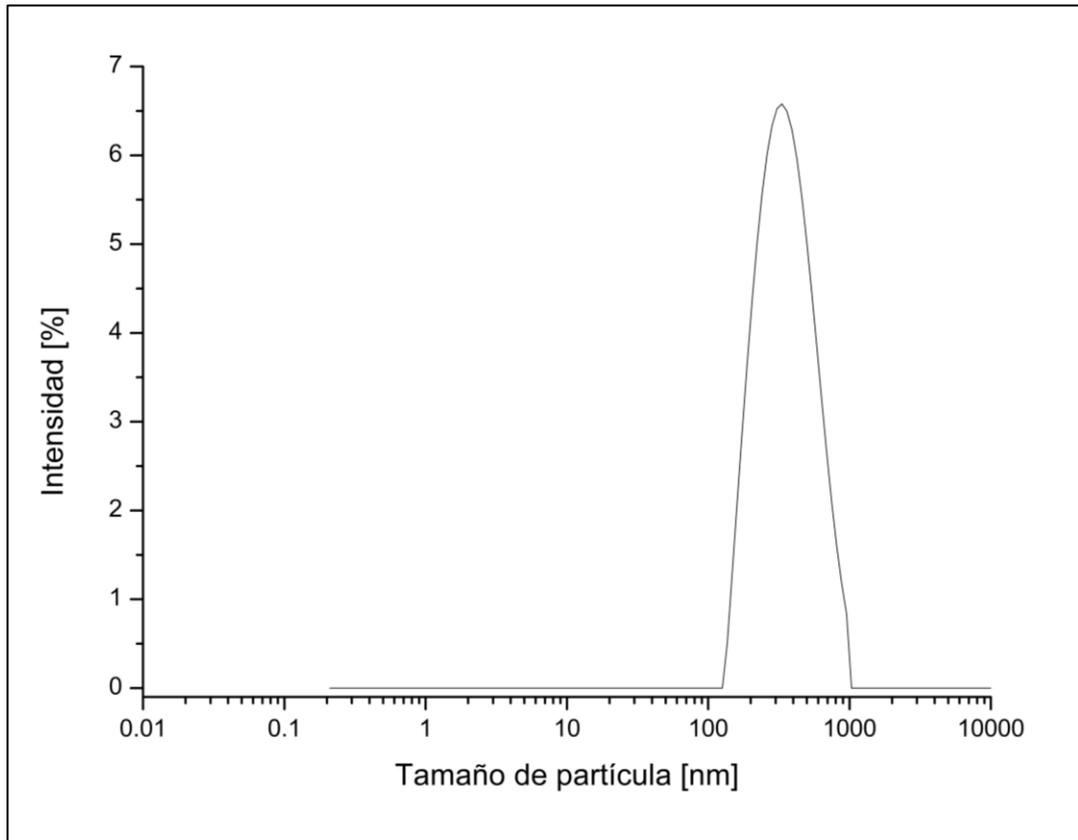


Fig. 15 Gráfica de intensidad obtenida mediante DLS de la distribución del tamaño de partícula para nanopartículas de Eudragit S-100 suspendidas en agua Milli-Q, mostrando un diámetro promedio de 359.2 nm.

Los valores del potencial zeta están típicamente entre el rango de +100 a -100 mV. La magnitud del potencial zeta nos da una predicción de la estabilidad coloidal. Nanopartículas con valores de potencial zeta $>+25$ mV o <-25 mV usualmente tienen altos grados de estabilidad y se previene su aglomeramiento (Shnoudeh et al., 2019).

Haciendo uso de la técnica de dispersión de luz electroforética (ELS) utilizando el mismo analizador que para el ensayo de DLS, se conoció el potencial zeta de las nanopartículas de Eudragit S-100 que se realizaron en este trabajo. En la Fig. 16 se muestra la gráfica de potencial zeta para las nanopartículas de Eudragit S-100. El valor obtenido para estas nanopartículas fue de -3.0 mV. El solvente fue agua Milli-Q (índice de refracción 1.33, viscosidad de 0.8903 mPa.s y una permitividad de 78.37). Si bien, este valor es bajo, sería

difícil determinar con seguridad que la estabilidad coloidal será altamente inestable, y es que, según la teoría de la estabilidad coloidal, dicha estabilidad depende de la suma de las fuerzas atractivas de van der Waals y las fuerzas repulsivas electrostáticas debido a la capa eléctrica doble (capa que se forma en la superficie de la nanopartícula y los iones adyacentes del solvente) y el potencial zeta no ofrece información sobre estas fuerzas. Por ello, se ha encontrado en la literatura coloides estables con potencial zeta bajos y viceversa (Bhattacharjee, 2016). En un estudio, realizado por Asfour y Mohsen (2018b), donde sintetizaron nanopartículas de Eudragit S-100 cargadas con rutina, encontraron que sus nanopartículas desarrollaban cargas desde los -21 mV hasta los -27 mV. En otro estudio, Pool et al. (2012) midieron el potencial zeta de nanopartículas de Eudragit L30-D55 (parecido en estructura química al Eudragit S-100), siendo un polímero aniónico como Eudragit S-100. En su estudio, encontraron que el potencial zeta de sus nanopartículas llegó a alcanzar hasta -31.2 mV. Esto anterior podría reflejar que el sistema desarrollado en esta tesis no llegó a desarrollar una carga que se supone, en principio, refleja la estabilidad coloidal deseada.

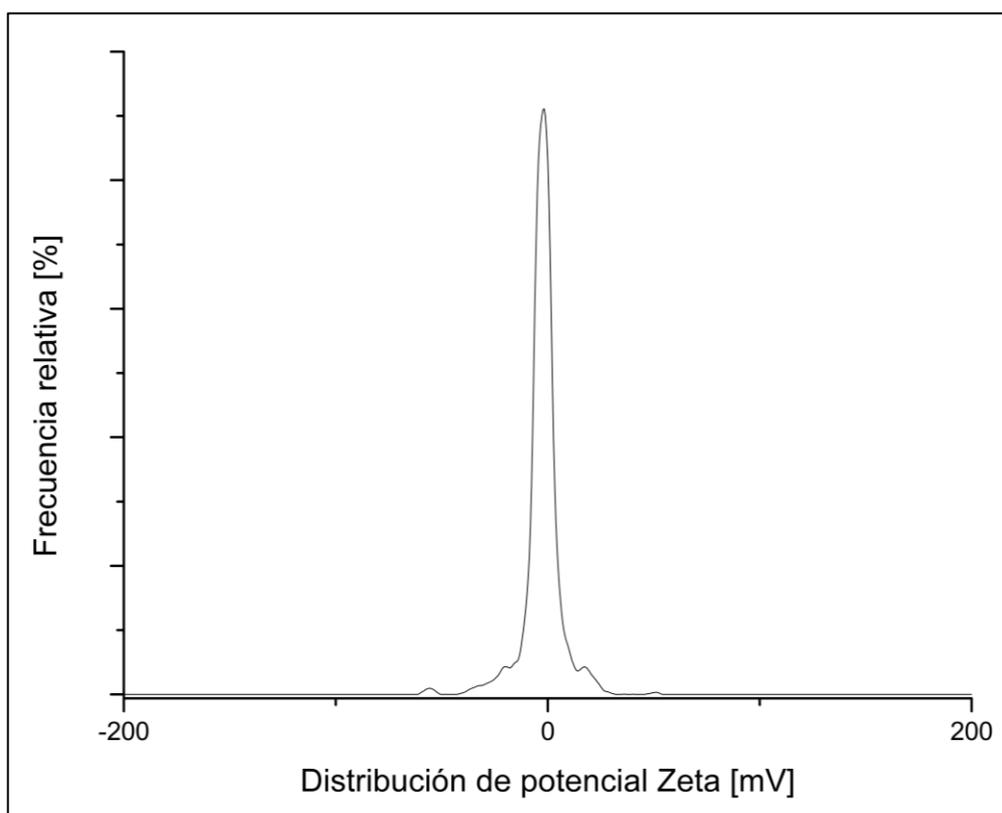


Fig. 16 Potencial zeta de las nanopartículas de Eudragit S-100.

Es bien conocido que el pH es uno de los parámetros que más afectan la medición del potencial zeta, por ello, se realizó una curva de titulación añadiendo una solución de NaOH 0.1 M con un paso de 0.5 entre una medición y la siguiente. En la Fig. 17 se aprecia que la mayor carga desarrollada se presentó a un pH de 7.56 y a 10.14; dicha carga fue de -7.9 mV. En cambio, la menor carga que se obtuvo en las nanopartículas fue de -1.9 mV a un pH de 8.51. Sin embargo, la forma de esta curva no se asemeja a las reportadas en la literatura científica en cuyas gráficas se observa un comportamiento de tipo sigmoideo. De hecho, Barbosa et al. (2019), realizaron una curva de titulación de potencial zeta vs pH del Eudragit S-100 y obtuvieron que su punto isoeléctrico se encontró a un pH de 2 y a un pH de 7 se obtuvo la mayor carga de -27.61 mV, aproximadamente, con una tendencia de tipo sigmoidea como suelen presentar muchos polímeros de este tipo. Para las nanopartículas de Eudragit S-100 desarrolladas en el presente trabajo, el valor de potencial zeta, que podría reflejar la mayor estabilidad coloidal de dichas nanopartículas), fue de -7.9 mV. Esta carga que se desarrolla a $\text{pH} \geq 7$ se debe a que existe una ionización por parte de los ácidos carboxílicos presentes en el Eudragit S-100. Esto es de suma importancia debido a que este polímero entérico se mantiene desionizado en pH ácido y se disuelve en pH de colon, es decir, $\text{pH} \geq 7$ (Barbosa et al., 2019).

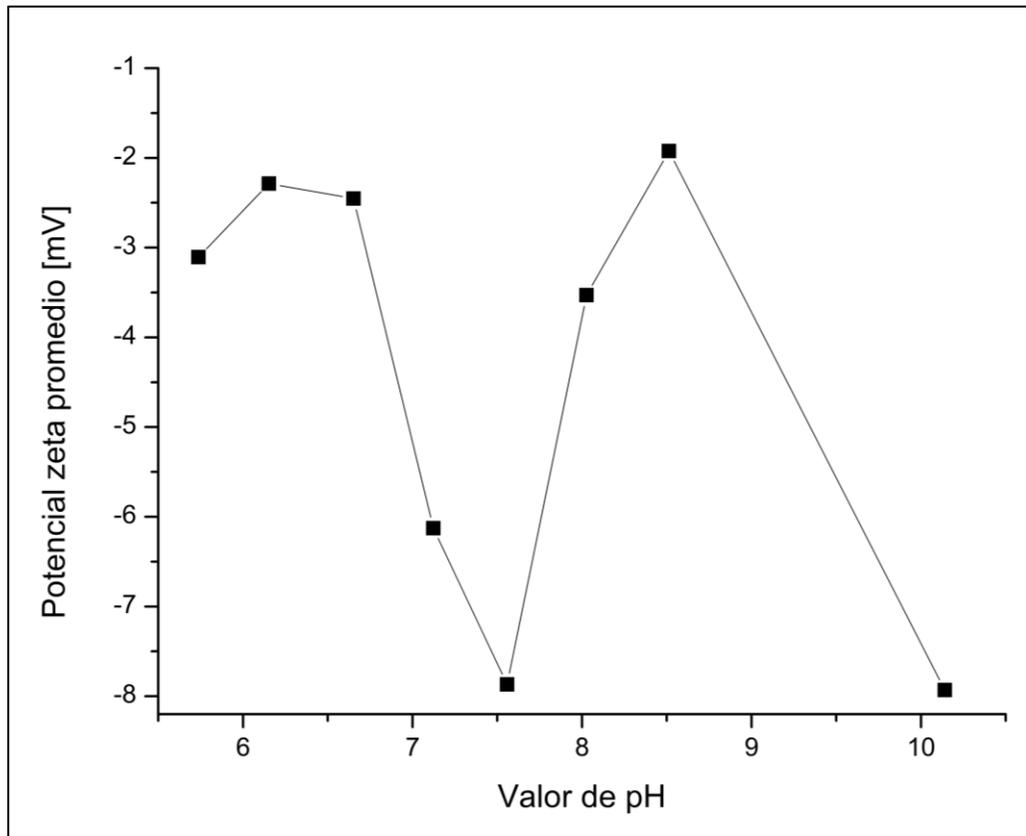


Fig. 17 Curva de potencial zeta vs pH de las nanopartículas de Eudragit S-100.

5.6 Morfología

Los probióticos deshidratados exhiben una mayor durabilidad a largo plazo y pueden ser incorporados en matrices de alimentos con baja humedad (como es el caso de la leche fórmula en la que se piensa implementar, en un futuro, los sistemas que se desarrollaron en el presente estudio) (Marcial-Coba et al., 2019). Por ello, diversas técnicas como la liofilización se han utilizado para el secado de microcápsulas (cargadas con probióticos) con el fin de eliminar la actividad del agua (Holkem et al., 2016). Así, pues, con el fin de evaluar las diferencias en la morfología entre las perlas de alginato liofilizadas de una y de dos capas (recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100) se procedió a la microscopía electrónica de barrido. En la Fig. 18 (a-d) se observan las micrografías de SEM de las perlas de alginato vacías de una sola capa. Su morfología casi esférica con aproximadamente 1 mm de diámetro se aprecia junto con una superficie irregular (cavidades como si se trataran de cráteres) y rugosa.

Por su parte, las perlas de alginato liofilizadas y recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100 se muestran en la Fig. 18 (c y d). En principio, se observa una morfología esférica casi perfecta con una superficie rugosa también. Sin embargo, se aprecian 2 regiones, principalmente, a saber, una región con una matriz polimérica que podría ser el Eudragit S-100 en donde no se formaron las nanopartículas y el polímero se encontraba de manera laminada y la otra región, donde se distinguen protuberancias (con diámetros de 4-5 μm) sobre una superficie lisa. Estas “protuberancias” podrían ser las mismas nanopartículas de Eudragit S-100 recubriendo la superficie de las perlas de alginato de sodio.

Yongsheng et al. (2008) reportaron una morfología similar en sus perlas de alginato de calcio-quitosano liofilizadas con una superficie rugosa y colapsada en el centro.

5.7 Propiedades espectroscópicas.

Las interacciones de enlaces químicos entre estructuras pueden ser estudiadas usando la espectroscopía ATR-FTIR cuando las muestras son colocadas en contacto con elementos de reflexión interna como el seleniuro de zinc (ZnSe) o germanio (Ge). Además, un cambio en la frecuencia de absorción de las bandas podría ser utilizado para identificar cambios en la estructura química (Aguilar, 2013). Es por ello, que esta técnica resultó de especial interés ya que nos permitirá conocer si es que existen interacciones entre las perlas de alginato de sodio y las nanopartículas de Eudragit S-100 para conocer si existe algún tipo de interacción entre dichas partículas. En la Fig. 19 se muestran los espectrogramas del alginato de sodio en polvo, del Eudragit S-100 en polvo también, de las perlas de alginato de calcio y finalmente de las perlas de alginato de calcio recubiertas con las partículas de Eudragit S-100.

En primer lugar, se observa en la Fig. 19 A, vibraciones de estiramiento del enlace O-H en el rango de 3238 cm^{-1} . También se observa vibraciones de estiramiento alifáticas C-H en 2920 cm^{-1} . Otras bandas encontradas en el espectro del alginato de sodio son aquellas en los números de onda 1591 cm^{-1} (vibración asimétrica de grupos COO), 1401 cm^{-1} (vibración de estiramiento simétrica de los grupos COO) y 1032 cm^{-1} (elongación de grupos C-O). Este espectro y sus bandas están dentro de un rango cercano y son comparables con lo obtenido por otros autores (Daemi et al., 2012; Pereira et al., 2011). Para el caso del Eudragit S-100, en la Fig. 19 B se distingue una vibración CHx a 2995 cm^{-1} . Otras vibraciones CHx están en 1480 cm^{-1} y en 1436 cm^{-1} . También, destacan las vibraciones de enlaces C=O de los grupos de

ácidos carboxílicos en 1724 cm^{-1} , así como en 1150 cm^{-1} y en 1250 cm^{-1} . Dichas bandas se pueden corroborar en la hoja de especificaciones del fabricante de este copolímero entérico (Evonik Eudragit L 100 and Eudragit S 100 Specification Sheet, n.d.).

Después, se tienen las bandas de las perlas de alginato de calcio en la Fig. 19 C. Aquí, se distingue la banda en el rango de $3376\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de estiramiento de los enlaces O-H del alginato. También, se observa una banda en 1595 cm^{-1} que se atribuye vibración de estiramiento asimétrico del enlace C-O. En el alginato de sodio, esta banda apareció a 1591 cm^{-1} . Otra banda de interés es la de 1412 cm^{-1} que corresponde al estiramiento simétrico del enlace C-O. Para el alginato de sodio, este estiramiento apareció en 1401 cm^{-1} . De hecho, se puede encontrar en la literatura, que estos cambios, a saber, de 1591 cm^{-1} a 1595 cm^{-1} y el cambio 1401 cm^{-1} a 1412 cm^{-1} , se deben al reemplazamiento del ion Na^+ en los residuos del ácido urónico por el ion divalente Ca^{2+} . Entonces, se involucra el grupo COO^- en el proceso de reticulación mediado por Ca^{2+} del alginato en la formación de la estructura de la caja de huevo (Voo et al., 2015). Finalmente, tenemos que en la Fig. 19 D se encuentran las bandas de las perlas de alginato vacías recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100. Aparece un pico ancho alrededor de 3294 cm^{-1} indicando el estiramiento O-H mientras que en 1738 cm^{-1} se tiene el pico que representa al grupo C=O. El pico en 1436 cm^{-1} vuelve a estar presente, siendo éste, debido a la flexión $-\text{CH}_3$ indicando que el pico característico de Eudragit S-100 fue encontrado en la recubierta de las perlas de alginato de calcio, lo que confirma la presencia del recubrimiento entérico por dichas nanopartículas de Eudragit S-100 (Rehman et al., 2021).

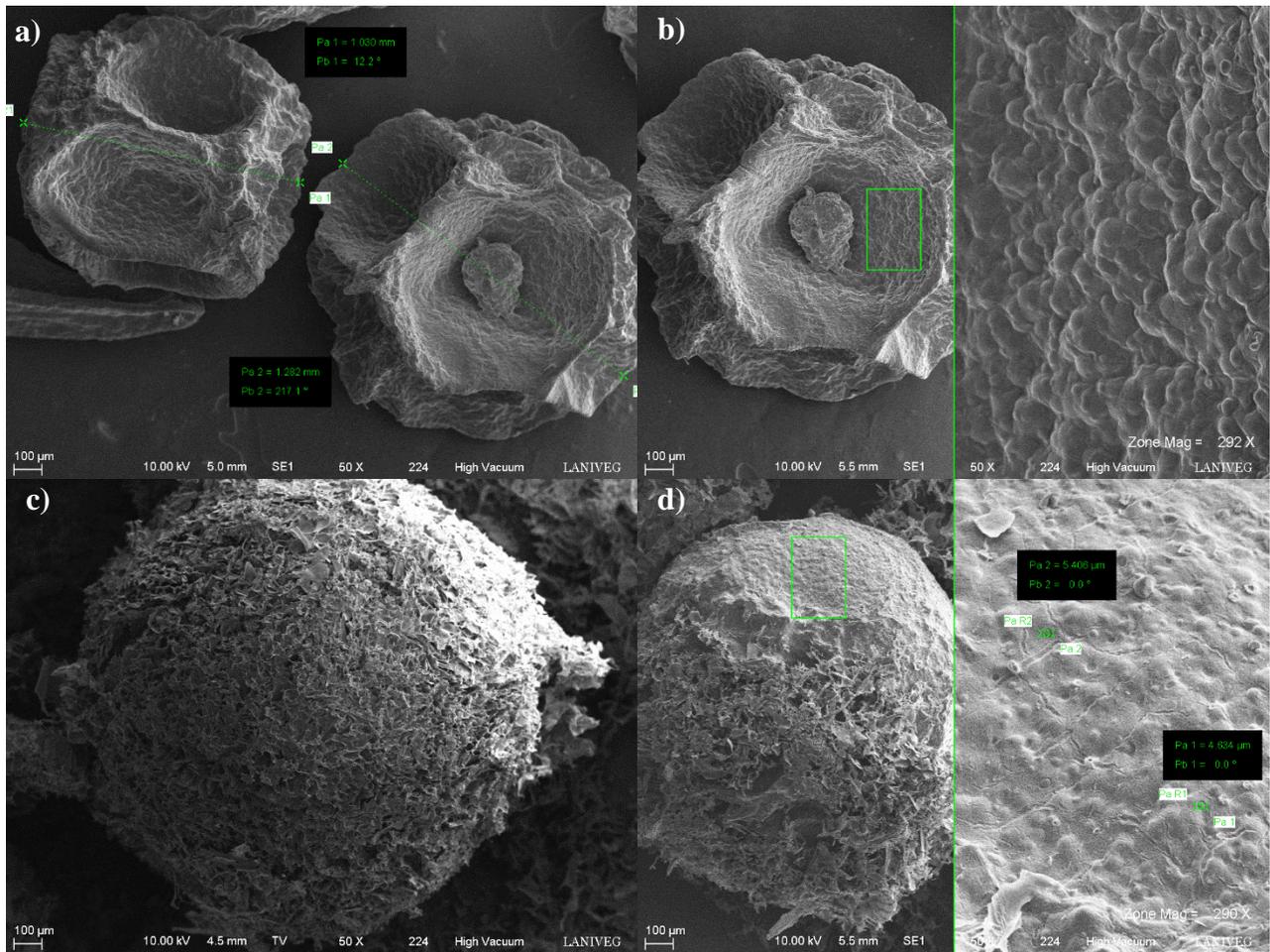


Fig. 18 Micrografías de SEM de perlas de alginato de sodio liofilizadas vacías (a, magnificación 50x). Imágenes de SEM de la superficie de las perlas de alginato de sodio liofilizadas vacías (b, magnificación 292x). Perlas de alginato de sodio recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100 (c, magnificación 50x). Superficie de perla de alginato con nanopartículas de Eudragit S-100 (d, magnificación 290x).

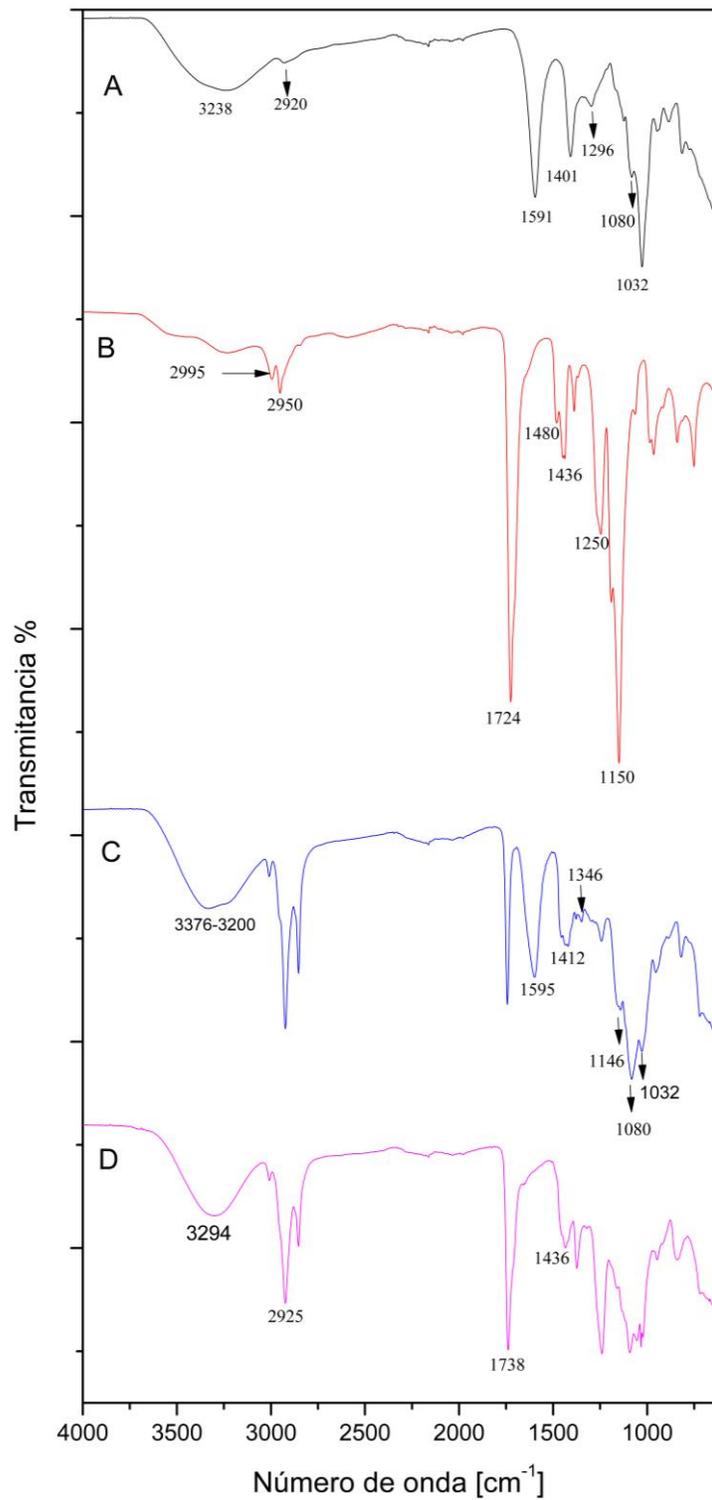


Fig. 19 Espectro FTIR acumulado de **A** alginato de sodio en polvo, **B** Eudragit S-100 en polvo, **C** perlas de alginato de calcio y **D** perlas de alginato de calcio recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100.

6 CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo demuestra que es posible aislar una bacteria probiótica de un producto comercial inoculando dicho producto en un medio de crecimiento como es el caso del caldo LB. Se encontró que *L. gasseri* es una bacteria sensible a una alta concentración de oxígeno, al cambio brusco de pH, a una alta concentración de sales o iones y a la temperatura de incubación. *L. gasseri* puede considerarse segura debido a que no existe actividad de hemólisis, gelatinasa y DNAsa. Resultó de especial importancia la determinación genética de *L. gasseri* mediante la técnica de PCR y haciendo uso del sistema BLAST que permitió analizar la secuencia genética del amplicón obtenido para garantizar que es *L. gasseri* la bacteria probiótica que se aisló.

Se determinó que el uso de un homogeneizador de altas velocidades es una opción que permite crear una correcta emulsión con todos los componentes y poder homogeneizarlos de tal forma que *L. gasseri* se integre con los elementos que conforman la emulsión. Esta dispersión de *L. gasseri* a altas velocidades demuestra reducir la cantidad de células viables a lo largo del proceso de homogeneización, sin embargo, la concentración de bacterias sigue estando por encima de la concentración mínima recomendada para tener un efecto benéfico en la salud. También, el uso de un surfactante como el Tween 40 demostró mejorar la formación y estabilidad de la emulsión cuando se agregaba en una concentración de 1.6 % (p/v).

El recubrimiento de las perlas de alginato de calcio liofilizadas con nanopartículas de Eudragit S-100 podrían mejorar la resistencia por el paso del tracto gastrointestinal debido a que las cavidades y poros quedan recubiertos y es probable que esto evite el ingreso de moléculas, enzimas y otras células a través de dichos poros. Además, el espectro infrarrojo realizado en el sistema recubierto con nanopartículas de Eudragit S-100 muestra que existen interacciones moleculares entre las perlas de alginato de calcio y las nanopartículas lo que indica la formación de enlaces fuertes entre estas especies.

Se espera que se continúe con las pruebas de viabilidad celular y liberación controlada en fluidos gastrointestinales simulados con el fin de evaluar la resistencia que confiere encapsular a *L. gasseri* en un sistema de dos capas como el desarrollado en este trabajo.

A la par, deberán realizarse estudios de almacenamiento acelerado para determinar las condiciones óptimas que garanticen la viabilidad de las células en concentraciones superiores a 1×10^6 UFC durante 6 meses, al menos.

Posteriormente, la adición de *L. gasseri* encapsulada en perlas de alginato de calcio recubiertas con nanopartículas de Eudragit S-100 a fórmulas lácteas para neonatos podría llevarse a cabo realizando pruebas en animales y, posteriormente, en humanos para determinar los potenciales efectos a la salud que pudieran conferir, esto debido a que no se encuentra actualmente en el mercado ni reportado en la literatura científica un sistema con las características descritas en este trabajo de investigación. Con esto, se espera obtener un producto funcional y de alta estabilidad que pueda ser utilizado por neonatos para que su nutrición y establecimiento de microbiota intestinal no se vean comprometidas en el caso que se vean privados de leche materna por diversos motivos.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Afzaal, M., Khan, A. U., Saeed, F., Arshad, M. S., Khan, M. A., Saeed, M., Maan, A. A., Khan, M. K., Ismail, Z., Ahmed, A., Tufail, T., Ateeq, H., & Anjum, F. M. (2020). Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. *Food Science & Nutrition*, 8(3), 1649–1656. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1451>
- Afzaal, M., Saeed, F., Arshad, M. U., Nadeem, M. T., Saeed, M., & Tufail, T. (2019). The Effect of Encapsulation on The Stability of Probiotic Bacteria in Ice Cream and Simulated Gastrointestinal Conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(4), 1348–1354. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9485-9>
- Aguilar, Z. P. (2013). Chapter 2 - Types of Nanomaterials and Corresponding Methods of Synthesis. In Z. P. Aguilar (Ed.), *Nanomaterials for Medical Applications* (pp. 33–82). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385089-8.00002-9>
- Ahirrao, S. P., Gide, P. S., Shrivastav, B., & Sharma, P. (2014). Ionotropic Gelation: A Promising Cross Linking Technique for Hydrogels. *Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology*, 2(1), 1–6.
- Ann, S., & Marise, H. (2019). *Gram Stain Protocols / ASM.org*. American Society for Microbiology. www.asmscience.org
- Ansari, F., Pourjafar, H., Jodat, V., Sahebi, J., & Ataei, A. (2017). Effect of Eudragit S100 nanoparticles and alginate chitosan encapsulation on the viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. *AMB Express*, 7(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0442-x>
- Appanna, V. D., & Appanna, V. D. (2018). Dysbiosis, Probiotics, and Prebiotics: In Diseases and Health. In *Human Microbes - The Power Within* (pp. 81–122). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7684-8_3
- Asfour, M. H., & Mohsen, A. M. (2018a). Formulation and evaluation of pH-sensitive rutin nanospheres against colon carcinoma using HCT-116 cell line. *Journal of Advanced Research*, 9, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.003>
- Asfour, M. H., & Mohsen, A. M. (2018b). Formulation and evaluation of pH-sensitive rutin nanospheres against colon carcinoma using HCT-116 cell line. *Journal of Advanced Research*, 9, 17–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.003>
- Azad, M. A. K., Sarker, M., & Wan, D. (2018). Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *BioMed Research International*, 2018, 8063647. <https://doi.org/10.1155/2018/8063647>
- Badal, V. D., Vaccariello, E. D., Murray, E. R., Yu, K. E., Knight, R., Jeste, D. v., & Nguyen, T. T. (2020). The gut microbiome, aging, and longevity: A systematic review. *Nutrients*, 12(12), 1–25. <https://doi.org/10.3390/NU12123759>

- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, *60*(1), 49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Barbosa, J. A. C., Abdelsadig, M. S. E., Conway, B. R., & Merchant, H. A. (2019). Using zeta potential to study the ionisation behaviour of polymers employed in modified-release dosage forms and estimating their pKa. *International Journal of Pharmaceutics: X*, *1*, 100024. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2019.100024>
- Barbosa, J. A. C., Al-Kauraishi, M. M., Smith, A. M., Conway, B. R., & Merchant, H. A. (2019). Achieving gastroresistance without coating: Formulation of capsule shells from enteric polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *144*, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.09.015>
- Bertelloni, F., Cagnoli, G., & Ebani, V. V. (2021). Virulence and Antimicrobial Resistance in Canine Staphylococcus spp. Isolates. *Microorganisms*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030515>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, *235*, 337–351. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, *4*(4), 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
- Bosco, N., & Noti, M. (2021). The aging gut microbiome and its impact on host immunity. *Genes & Immunity*, *22*(5), 289–303. <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00126-8>
- Canfora, E. E., Jocken, J. W., & Blaak, E. E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews. Endocrinology*, *11*(10), 577–591. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.128>
- Chow, J., Tang, H., & Mazmanian, S. K. (2011). Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Current Opinion in Immunology*, *23*(4), 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.07.010>
- Cristofori, F., Dargenio, V. N., Dargenio, C., Miniello, V. L., Barone, M., & Francavilla, R. (2021). Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.578386>
- da Silva, L. A., Lopes Neto, J. H. P., & Cardarelli, H. R. (2019). Safety and probiotic functionality of isolated goat milk lactic acid bacteria. *Annals of Microbiology*, *69*(13), 1497–1505. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01533-z>
- da Silva, P. T., Fries, L. L. M., de Menezes, C. R., Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, A. F., de Oliveira Bastos, J., & de Bona da Silva, C. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food

technology. *CiÃ Rural*, 44, 1304–1311.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000701304&nrm=iso

- Daemi, H., Barikani, M., & Barmar, M. (2012). *Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles*.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Das, S., David, S., Rajabalaya, R., Mukhopadhyay, H., Halder, T., Palanisamy, M., Khanam, J., & Nanda, A. (2011a). Microencapsulation techniques and its practices. *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 6, 1–23.
- Das, S., David, S., Rajabalaya, R., Mukhopadhyay, H., Halder, T., Palanisamy, M., Khanam, J., & Nanda, A. (2011b). Microencapsulation techniques and its practices. *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 6, 1–23.
- Davarcı, F., Turan, D., Ozcelik, B., & Poncelet, D. (2017). The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique. *Food Hydrocolloids*, 62, 119–127.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.029>
- Definición de NF-kB - Diccionario de cáncer - National Cancer Institute*. (n.d.).
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/nf-kb>
- Evonik Eudragit L 100 and Eudragit S 100 Specification Sheet*. (n.d.). Retrieved April 23, 2022, from <https://studylib.net/doc/25298564/evonik-eudragit-l-100-and-eudragit-s-100-specification-sheet>
- Forsberg, A. (2016). Lactobacillus reuteri, Infant Allergy Prevention and Childhood Immune Maturation. In *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. InTech. <https://doi.org/10.5772/63120>
- Fu, F., & Hu, L. (2017). 15 - Temperature sensitive colour-changed composites. In M. Fan & F. Fu (Eds.), *Advanced High Strength Natural Fibre Composites in Construction* (pp. 405–423). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100411-1.00015-7>
- Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4(1), 149–163.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics4010149>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491–502.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

- Gunyakti, A., & Asan-Ozusaglam, M. (2019a). Lactobacillus gasseri from human milk with probiotic potential and some technological properties. *LWT*, *109*, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.043>
- Gunyakti, A., & Asan-Ozusaglam, M. (2019b). Lactobacillus gasseri from human milk with probiotic potential and some technological properties. *LWT*, *109*, 261–269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.043>
- Harbige, L. S., Pinto, E., Allgrove, J., & Thomas, L. v. (2016). Immune Response of Healthy Adults to the Ingested Probiotic Lactobacillus casei Shirota. *Scandinavian Journal of Immunology*, *84*(6), 353–364. <https://doi.org/10.1111/sji.12495>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & 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*(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Nunes, G. L., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Ferreira Grosso, C. R., & de Menezes, C. R. (2016). Development and characterization of alginate microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, *71*, 302–308. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.012>
- Icaza-Chávez, M. E. (2013). Gut microbiota in health and disease. In *Revista de Gastroenterología de Mexico* (Vol. 78, Issue 4, pp. 240–248). Asociacion Mexicana de Gastroenterología. <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2013.04.004>
- Jamyuang, C., Phoonlapdacha, P., Chongviriyaphan, N., Chanput, W., Nitisinprasert, S., & Nakphaichit, M. (2019). Characterization and probiotic properties of Lactobacilli from human breast milk. *3 Biotech*, *9*(11), 398. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1926-y>
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., & Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *153*(1–2), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.020>
- Jia, K., Tong, X., Wang, R., & Song, X. (2018). The clinical effects of probiotics for inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Medicine*, *97*(51), e13792–e13792. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013792>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, *10*(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

- K Gogineni, V., & Morrow, L. E. (2013). Probiotics: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *Journal of Probiotics & Health*, 01(01), 1–11.
<https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000101>
- Kalui, C., Mathara, J., Kutima, P., Kiiyukia, C., & Wongo, L. (2009). Functional characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* from Ikii, a Kenyan traditional fermented maize porridge. *African Journal of Biotechnology*, 8, 4363–4373.
- Kateete, D. P., Kimani, C. N., Katabazi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S., Nanteza, A., Joloba, M. L., & Najjuka, F. C. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9(1), 23.
<https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-23>
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*, 2013, 481651. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
- Kho, Z. Y., & Lal, S. K. (2018). The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1835.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01835>
- Khosravi Zanjani, M. A., Ehsani, M. R., Ghiassi Tarzi, B., & Sharifan, A. (2018). Promoting Probiotics Survival by Microencapsulation with Hylon Starch and Genipin Cross-linked Coatings in Simulated Gastro-intestinal Condition and Heat Treatment. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 17(2), 753–766.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29881432>
- Khosravi Zanjani, M. A., Ghiassi Tarzi, B., Sharifan, A., & Mohammadi, N. (2014). Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-intestinal Condition. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 13(3), 843–852.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25276184>
- Kim, E., Yang, S.-M., Lim, B., Park, S. H., Rackerby, B., & Kim, H.-Y. (2020). Design of PCR assays to specifically detect and identify 37 *Lactobacillus* species in a single 96 well plate. *BMC Microbiology*, 20(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01781-z>
- Kim, H., Kim, T., Kang, J., Kim, Y., & Kim, H. (2020). Is *Lactobacillus* Gram-Positive? A Case Study of *Lactobacillus iners*. *Microorganisms*, 8(7), 969.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8070969>
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. In *International Dairy Journal* (Vol. 13, Issue 1, pp. 3–13). [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
- Kumar, A., & Dixit, C. K. (2017). 3 - Methods for characterization of nanoparticles. In S. Nimesh, R. Chandra, & N. Gupta (Eds.), *Advances in Nanomedicine for the Delivery*

- of Therapeutic Nucleic Acids* (pp. 43–58). Woodhead Publishing.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1>
- Langevin, D. (2020). *Emulsions, Microemulsions and Foams*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-55681-5>
- Lengyel, M., Kállai-Szabó, N., Antal, V., Laki, A. J., & Antal, I. (2019). Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica*, 87(3). <https://doi.org/10.3390/scipharm87030020>
- Maguire, C. M., Rösslein, M., Wick, P., & Prina-Mello, A. (2018). Characterisation of particles in solution - a perspective on light scattering and comparative technologies. *Science and Technology of Advanced Materials*, 19(1), 732–745.
<https://doi.org/10.1080/14686996.2018.1517587>
- MALVERN INSTRUMENTS. (2001). *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes MRK656-01*.
https://warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/intro_to_dls.pdf
- Marcial-Coba, M. S., Knøchel, S., & Nielsen, D. S. (2019). Low-moisture food matrices as probiotic carriers. *FEMS Microbiology Letters*, 366(2), fnz006.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnz006>
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 27, pp. 15–25). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>
- Martinez, R. M., Hulten, K. G., Bui, U., & Clarridge 3rd, J. E. (2014). Molecular analysis and clinical significance of *Lactobacillus* spp. recovered from clinical specimens presumptively associated with disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), 30–36. <https://doi.org/10.1128/JCM.02072-13>
- McFarland, L. v. (2015). From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 60 Suppl 2, S85-90. <https://doi.org/10.1093/cid/civ054>
- Moossavi, S., & Azad, M. B. (2019). Origins of human milk microbiota: new evidence and arising questions. *Gut Microbes*, 1–10.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1667722>
- Neffe-Skocińska, K., Rzepkowska, A., Szydłowska, A., & Kołożyn-Krajewska, D. (2018). Chapter 3 - Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production. In A. M. Holban & A. M. B. T.-A. and R. F. Grumezescu (Eds.), *Handbook of Food Bioengineering* (pp. 65–94). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811446-9.00003-4>
- Niha, P., S, B. A. E., Augusto, S.-B., & H, A. J. (2018). A Cell Surface Aggregation-Promoting Factor from *Lactobacillus gasseri* Contributes to Inhibition of

- Trichomonas vaginalis Adhesion to Human Vaginal Ectocervical Cells. *Infection and Immunity*, 86(8), e00907-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00907-17>
- Nishida, K., Sawada, D., Kuwano, Y., Tanaka, H., & Rokutan, K. (2019). Health Benefits of Lactobacillus gasseri CP2305 Tablets in Young Adults Exposed to Chronic Stress: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/nu11081859>
- Padilha, M., Danneskiold-Samsøe, B. N., Brejnrod, A., Hoffmann, C., Cabral, P. V., Iaucci, D. J., Sales, H. C., Fisberg, M. R., Cortez, V. R., Brix, S., Taddei, R. C., Kristiansen, K., & Saad, M. S. (2019). The Human Milk Microbiota is Modulated by Maternal Diet. In *Microorganisms* (Vol. 7, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110502>
- Pan, M., Hidalgo-Cantabrana, C., Goh, Y. J., Sanozky-Dawes, R., & Barrangou, R. (2020). Comparative Analysis of Lactobacillus gasseri and Lactobacillus crispatus Isolated From Human Urogenital and Gastrointestinal Tracts. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3146. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03146>
- Pedroso-Santana, S., & Fleitas-Salazar, N. (2020). Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polymer International*, 69(5), 443–447. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pi.5970>
- Pereira, R., Tojeira, A., Vaz, D., Mendes, A., & Bártolo, P. (2011). Preparation and Characterization of Films Based on Alginate and Aloe Vera. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization - INT J POLYM ANAL CHARACT*, 16, 449–464. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2011.599923>
- Pérez-Cano, F. J., Dong, H., & Yaqoob, P. (2010). In vitro immunomodulatory activity of Lactobacillus fermentum CECT5716 and Lactobacillus salivarius CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology*, 215(12), 996–1004. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.01.004>
- Perlmutter, D., & Loberg, Kristin. (2013). *Grain brain : the surprising truth about wheat, carbs, and sugar--your brain's silent killers.*
- Petchsomrit, A., Sermkaew, N., & Wiwattanapatapee, R. (2013). Effect of Alginate and Surfactant on Physical Properties of Oil Entrapped Alginate Bead Formulation of Curcumin. *International Journal of Medical, Pharmaceutical Science and Engineering*, 7, 479–483.
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 10(suppl_1), S49–S66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>
- Pool, H., Quintanar, D., Figueroa, J. de D., H. Bechara, J. E., McClements, D. J., & Mendoza, S. (2012). Polymeric Nanoparticles as Oral Delivery Systems for Encapsulation and Release of Polyphenolic Compounds: Impact on Quercetin Antioxidant Activity & Bioaccessibility. *Food Biophysics*, 7(3), 276–288. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9266-z>

- Probiotics market value in Latin America 2018* / Statista. (n.d.). Retrieved March 15, 2020, from <https://www.statista.com/statistics/972353/probiotics-market-value-latin-america/>
- Qelliny, M. R., Aly, U. F., Elgarhy, O. H., & Khaled, K. A. (2019). Budesonide-Loaded Eudragit S 100 Nanocapsules for the Treatment of Acetic Acid-Induced Colitis in Animal Model. *AAPS PharmSciTech*, 20(6), 237. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1453-5>
- Rehman, S., Ranjha, N. M., Raza, M. R., Hanif, M., Majed, A., & Ameer, N. (2021). Enteric-coated Ca-alginate hydrogel beads: a promising tool for colon targeted drug delivery system. *Polymer Bulletin*, 78(9), 5103–5117. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03359-1>
- Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, R.-U., & Jahid, I. K. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC Microbiology*, 19(1), 253. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1626-0>
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review. In *Food Research International* (Vol. 137). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>
- Ruiz, M. J., Colello, R., Padola, N. L., & Etcheverría, A. I. (2017). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 174–177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019a). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019b). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 344–371. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>
- Schoster, A., Kokotovic, B., Permin, A., Pedersen, P. D., Dal Bello, F., & Guardabassi, L. (2013). In vitro inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. *Anaerobe*, 20, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.006>
- Selvamani, V. (2019). Chapter 15 - Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. In S. S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. K. Mishra, & S. Thomas (Eds.),

Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery (pp. 425–444). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00015-5>

- Shnoudeh, A. J., Hamad, I., Abdo, R. W., Qadumii, L., Jaber, A. Y., Surchi, H. S., & Alkelany, S. Z. (2019). Chapter 15 - Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. In R. K. Tekade (Ed.), *Biomaterials and Bionanotechnology* (pp. 527–612). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9>
- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., & Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 65–77. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21589795>
- Singroha, G., Mishra, S. K., & Malik, R. K. (2017a). Isolation and Characterization of Potential Probiotic Lactobacillus gasseri Strains Isolated from Different Sources. *International Journal of Fermented Foods*, 6(1), 71. <https://doi.org/10.5958/2321-712x.2017.00007.2>
- Singroha, G., Mishra, S. K., & Malik, R. K. (2017b). Isolation and Characterization of Potential Probiotic Lactobacillus gasseri Strains Isolated from Different Sources. *International Journal of Fermented Foods*, 6(1), 71. <https://doi.org/10.5958/2321-712x.2017.00007.2>
- Soto, A., Martín, V., Jiménez, E., Mader, I., Rodríguez, J. M., & Fernández, L. (2014). Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 59(1), 78–88. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000347>
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E. L., & Lynch, S. v. (2015). Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *PLOS ONE*, 10(2), e0117617-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117617>
- Szekalska, M., Puciłowska, A., Szymańska, E., Ciosek, P., & Winnicka, K. (2016). Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science*, 2016, 7697031. <https://doi.org/10.1155/2016/7697031>
- Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients*, 11(7), 1591. <https://doi.org/10.3390/nu11071591>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Malhotra, M., Kahouli, I., & Prakash, S. (2013). Microencapsulation for the Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceutics: Current Status and Future Directions. *Journal of Pharmaceutics*, 2013, 103527. <https://doi.org/10.1155/2013/103527>

- Varela-Pérez, A., Romero-Chapol, O. O., Castillo-Olmos, A. G., García, H. S., Suárez-Quiroz, M. L., Singh, J., Figueroa-Hernández, C. Y., Viveros-Contreras, R., & Cano-Sarmiento, C. (2022). Encapsulation of *Lactobacillus gasseri*: Characterization, Probiotic Survival, In Vitro Evaluation and Viability in Apple Juice. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(5), 740. <https://doi.org/10.3390/foods11050740>
- Voo, W.-P., Lee, B.-B., Idris, A., Islam, A., Tey, B.-T., & Chan, E.-S. (2015). Production of ultra-high concentration calcium alginate beads with prolonged dissolution profile. *RSC Advances*, *5*(46), 36687–36695. <https://doi.org/10.1039/C5RA03862F>
- Wang, H., Wan, Y., Wang, W., Li, W., & Zhu, J. (2018). Effect of calcium ions on the III steps of self-assembly of SA investigated with atomic force microscopy. *International Journal of Food Properties*, *21*(1), 1995–2006. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1494200>
- Ward, T. L., Hosid, S., Ioshikhes, I., & Altosaar, I. (2013). Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC Microbiology*, *13*(1), 116. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-116>
- Wilkins, T., & Sequoia, J. (2017). Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *American Family Physician*, *96*(3), 170–178. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28762696>
- Wilson, J. C., Furlano, R. I., Jick, S. S., & Meier, C. R. (2016). Inflammatory Bowel Disease and the Risk of Autoimmune Diseases. *Journal of Crohn's and Colitis*, *10*(2), 186–193. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv193>
- Wu, Z., Guo, L., Qin, S., & Li, C. (2012). Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *39*(2), 317–327. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1028-2>
- Xiang, S., Fu, J., Ye, K., Zheng, Y., Zhu, X., Chen, J., & Chen, Y. (2019). Effect of *Lactobacillus gasseri* PA3 on gut microbiota in an in vitro colonic simulation. *Food Science & Nutrition*, *7*(12), 3883–3891. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.1236>
- Yadav, R., Puniya, A. K., & Shukla, P. (2016). Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an Indigenous Fermented Beverage Raabadi. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1683. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01683>
- Yongsheng, M., C, P. J., Qi, W., Yongping, X., Xiaoqing, H., Anton, K., & M, S. P. (2008). Microencapsulation of Bacteriophage Felix O1 into Chitosan-Alginate Microspheres for Oral Delivery. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(15), 4799–4805. <https://doi.org/10.1128/AEM.00246-08>

8 ANEXO 1

Secuencia de *L. gasseri* cepa 1118

TAGACGGCTGACTCCTATAAAGGTTATCCCACCGGCTTTGGGTGTTACAGACTCT
CATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTG
CTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACA
GTCCGAACCTGAGAACGGCTTTCAGAGATCCGCTTGCCTTCGCAGGTTTCGCTTCTC
GTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGA
CTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCATTAGAGTGC
CCAACCTAATGATGGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTCTCAGCGTC
CCCGAAGGGAACTCCTAATCTCTTAGGTTTGC ACTGGATGTCAAGACCTGGTAA
GGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
CGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGC GGTCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCTTA
ATGCGTTAGCTGCAGCACTGAGAGGCGGAAACCTCCCAACACTTAGCACTCATC
GTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCATGCTTTCGA
GCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCAT
ATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCA
AGTTCAACAGTTTCTGATGCAATTCTCCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGA
CTTATTGAACCGCCTGCACTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCC
ACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTTCTAAGTAAT
TACCGTCAAATAAAGGCCAGTACTACCTCTATCTTTCTTCACTACCAACAGAGC
TTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGT
CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCA
GTCCCAATGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATTGCCTTGGTAA
GCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAAGAGTGATAGC
AGAACCATCTTTTAAACTCTAGACATGCGTCTAGTGTTGTTATCCGGTATTAGCA
TCTGTTTCCAGGTGTTATCCCAGTCTCTTGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCAC

CCGTCCGCCGCTCGCTTGTATCTAGTTTCATTTGGTGCAAGCACCAAATTCATCT
AGGCAAGCTCGCTCGACTGCA

Secuencia de *L. gasseri* cepa 1119

GTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTGGTGCTTGCACCAAATGAAACTAGATA
CAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCAAGAGACTG
GGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTC
TAGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTGCATTAG
CTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAG
ACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTA
GTAGCTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTA
AAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGG
AGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAGTC
CATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC
GGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGG
TTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAG
TGCAAACCTAAGAGATTAGGAGTTCCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTGTCAATTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGG
CAAGCGGATCTCTGAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCT
ACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTCTGTAACACCCAAA
GCCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCAGCCGTCTAA