



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

Desarrollo de microcápsulas poliméricas multicapa para la encapsulación y liberación controlada de *Lactobacillus gasseri* en un tracto gastrointestinal simulado

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA

Presenta:

Isaac Alejandro Maqueda Cárdenas

Dirigido por:

Dr. Héctor Paul Reyes Pool

Co-Director:

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

30/09/2024

México

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA

Desarrollo de microcápsulas poliméricas multicapa para la encapsulación y liberación controlada de *Lactobacillus gasser* en un tracto gastrointestinal simulado

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA

Presenta:

Isaac Alejandro Maqueda Cárdenas

Dirigido por:

Dr. Héctor Paul Reyes Pool

Co-Director:

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

SINODALES

Dr. Héctor Paul Reyes Pool

Director

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Co-Director

Dr. Fidel Landeros Jaime

Sinodal

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Sinodal

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

30/09/2024

México

ÍNDICE GENERAL

1. ANTECEDENTES.....	12
1.1. Definición de los probióticos	12
1.2. Comercialización de los productos probióticos.....	12
1.3. Generalidades de las bacterias ácido lácticas (BAL) y el género <i>Lactobacillus</i>	14
1.4. Importancia de la lactancia materna en neonatos	14
1.5. Generalidades sobre <i>Lactobacillus gasseri</i> y su transferencia a los neonatos	15
1.6. Estudios sobre cepas de <i>L. gasseri</i> con efectos probióticos	16
1.7. Desafíos en el desarrollo de productos probióticos.....	17
1.8. Tecnología de microencapsulación de probióticos.....	18
1.9. Método de gelificación iónica para la producción de microcápsulas	19
1.10. Generalidades de la microencapsulación de probióticos en alginato de sodio (Alg-Na)	20
1.11. Quitosano y Eudragit S-100 (Eu S-100) como recubrimientos de soporte en la microencapsulación de probióticos	21
1.12. Avances en la microencapsulación de <i>L. gasseri</i>	22
2. HIPÓTESIS	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo general.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. METODOLOGÍA.....	26
4.1. Tinción de Gram	26
4.2. Evaluación de la producción de bacteriocinas.....	26
4.3. Curva de crecimiento y estandarización de las condiciones de incubación para la microencapsulación	27
4.4. Microencapsulación de <i>L. gasseri</i> en Alg-Na	29

4.5.	Aplicación de los recubrimientos de quitosano y Eu S-100 sobre microcápsulas de Alg-Na cargadas con <i>L. gasseri</i>	32
4.6.	Análisis del tamaño de partícula.....	33
4.7.	Ensayos de digestión con <i>L. gasseri</i>	33
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1.	Morfología colonial y tinción de Gram	39
5.2.	Evaluación de la producción de bacteriocinas.....	40
5.3.	Curva de crecimiento y estandarización de las condiciones de incubación para la microencapsulación	41
5.4.	Microencapsulación de <i>L. gasseri</i> en Alg-Na	43
5.5.	Obtención de microcápsulas multicapa cargadas con <i>L. gasseri</i>	51
5.6.	Análisis del tamaño de partícula.....	52
5.7.	Ensayos de digestión con la bacteria libre	56
5.8.	Ensayos de digestión con microcápsulas monocapa y multicapa cargadas con <i>L. gasseri</i>	59
6.	CONCLUSIONES	65
7.	PERSPECTIVAS	66
8.	REFERENCIAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tendencias de comercialización de productos probióticos en el mercado mundial pronosticadas hasta el año 2030.	13
Figura 2. Modelo de "caja de huevos" de la gelificación iónica del alginato de sodio.	20
Figura 3. Evaluación de la producción de bacteriocinas por LG C1119.	27
Figura 4. Estandarización de las condiciones de crecimiento de LG C1119 en medio de cultivo MRS.....	29
Figura 5. Microencapsulación de LG C1119 en una matriz polimérica de Alg-Na mediante el método de emulsión/gelificación iónica.....	31
Figura 6. Modelo estático de digestión de neonato <i>in vitro</i>	34
Figura 7. Ensayos de digestión con LG C1119 en su forma libre en el modelo estático de digestión de neonato <i>in vitro</i>	35
Figura 8. Ensayos de digestión con LG C1119 en su forma microencapsulada en el modelo estático de digestión de neonato <i>in vitro</i>	38
Figura 9. Crecimiento de colonias de LG C1119 en agar MRS (24 h; 37 °C).....	39
Figura 10. Microscopía de células de LG C1119 tratadas con la técnica de tinción de Gram.	40
Figura 11. Evaluación de la producción de bacteriocinas por LG C1119 mediante ensayos de superposición en agar blando.....	40
Figura 12. Curva de crecimiento de LG C1119.....	42
Figura 13. Fotografía de microcápsulas monocapa (Alg-Na) cargadas con LG C1119. ...	43
Figura 14. Recuento de UFC/mL de LG C1119 antes y después del proceso de emulsión.	44
Figura 15. Crecimiento de colonias de LG C1119 en agar MRS en las etapas del proceso de microencapsulación.	46
Figura 16. Recuento de UFC/mL o g recuperadas en las etapas del proceso de microencapsulación de LG C1119..	47
Figura 17. Comparación entre microcápsulas cargadas con LG C1119.	52
Figura 18. Fotografías de microcápsulas cargadas con LG C1119 después de ser liofilizadas.	53
Figura 19. Micrografías de microcápsulas cargadas con LG C1119.	54
Figura 20. Diámetro de las microcápsulas cargadas con LG C1119.....	54
Figura 21. Distribución de tamaños de las microcápsulas cargadas con LG C1119.....	56

Figura 22. Modelos estáticos <i>in vitro</i> de digestión en neonatos y adultos.....	57
Figura 23. Recuento de colonias de LG C1119 en su forma libre expuesta al modelo estático <i>in vitro</i> de digestión de neonato.....	58
Figura 24. Supervivencia conseguida en las microcápsulas cargadas con LG C1119 al finalizar su exposición al modelo estático <i>in vitro</i> de digestión de neonato.....	62
Figura 25. Análisis FODA sobre el protocolo de microencapsulación de LG C1119 y su liberación controlada en el modelo estático de digestión de neonato <i>in vitro</i>	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. pH de las secciones del tracto gastrointestinal (TGI) en humanos.	18
Tabla 2. Clasificación de las microcápsulas con base en su morfología y el número de capas que las constituyen.	19
Tabla 3. Clasificación de diferentes métodos de microencapsulación.	19
Tabla 4. Stocks de los reactivos utilizados en los ensayos de digestión.	34
Tabla 5. Composición de los fluidos simulados para un ensayo de digestión con 2.5 mL de muestra.	36

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Determinación de la cantidad necesaria de cultivo líquido para crecer a LG C1119 a una DO_{595} de 0.05.....	28
Ecuación 2. Determinación de la cantidad de UFC/mL recuperadas de un cultivo líquido de LG C1119.....	29
Ecuación 3. Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE%).....	32
Ecuación 4. Determinación de la reducción porcentual de la viabilidad celular después de la microencapsulación.....	32
Ecuación 5. Determinación de la reducción logarítmica de la viabilidad celular después de la microencapsulación.....	32
Ecuación 6. Determinación de la supervivencia (S%) en los ensayos de digestión.....	37

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Norma y Miguel, por darme las herramientas necesarias para poder concluir mi formación académica. Por su confianza, motivación y amor incondicional.

A mi hermano, Braulio, especialmente por estar siempre pendiente de mi bienestar.

A mi abuela, Raquel, por sus incomparables palabras de ánimo, aliento y superación.

A mis mascotas, Balu y Baguira, por darme tantas alegrías y sorpresas.

A Luis Lopez, por su generosidad, apoyo y acompañamiento en mi proceso de crecimiento personal y laboral durante mi trabajo de investigación.

Al Ing. Daniel Mendoza, por arroparme desde mi incorporación al LAMIMO. Por su valiosa y sincera amistad.

Al Dr. José Cervantes, por su compromiso, esfuerzo y paciencia en la elaboración de la tesis. Por aceptarme en su equipo de trabajo. Por compartir sus conocimientos, experiencias y recomendaciones para lograr la excelencia académica.

Al Dr. Hector Reyes, por permitirme desarrollar este trabajo de investigación. Por sus enseñanzas. Por facilitarme los recursos necesarios para elaborar mis experimentos.

Al Dr. Fidel Landeros y la Dra. Angélica Feregrino por su valiosa participación y retroalimentación para enriquecer la tesis.

Al M. en C. Salvador Ramírez, por su apoyo técnico en LAMIMO. A Ariosto, por facilitarme su asistencia técnica para realizar mis experimentos. Por último, al Proyecto FONDEC FNB202207.

RESUMEN

Lactobacillus gasseri (LG) es un probiótico que mantiene la homeostasis intestinal, estimula el desarrollo del sistema inmunitario y ayuda a controlar el peso de neonatos. Se transfiere por vía entero-mamaria. Sin embargo, la interrupción del parto vaginal y la lactancia materna dificultan su colonización intestinal. La administración oral de probióticos microencapsulados en alginato de sodio puede suplir su transmisión vertical. No obstante, la digestión en el tracto gastrointestinal afecta significativamente la viabilidad bacteriana mediante factores como cambios de pH, degradación enzimática o la acción de las sales biliares. Como consecuencia, limita su potencial terapéutico. El objetivo principal de esta investigación fue crear sistemas monocapa (Alginato de sodio) y multicapa (Alginato de sodio/Quitosano/Eudragit S-100) para la protección y liberación controlada de LG C1119 en un modelo estático de digestión de neonato *in vitro*. Está conformado por 3 fases: boca, estómago e intestino delgado. La eficiencia de encapsulación de LG C1119 fue del 100% ($>1 \times 10^7$ UFC/g). Respecto al tamaño, el sistema multicapa presentó un mayor diámetro y una distribución más amplia. Las pruebas de digestión con LG en su forma libre mostraron que toleró la exposición al ácido gástrico pero no sobrevivió al contacto con las sales biliares en el intestino delgado. Finalmente, las pruebas de digestión con LG en su forma microencapsulada revelaron que las partículas monocapa y multicapa protegieron las células durante la digestión simulada de neonato. Preservaron la viabilidad bacteriana en cantidades $>1 \times 10^6$ UFC/g, equivalente a una supervivencia $>90\%$. Sin embargo, no se logró una adecuada liberación de células en el intestino delgado. El inconveniente se asoció con una incompatibilidad entre los parámetros de la microencapsulación y las condiciones de digestión del modelo.

ABSTRACT

Lactobacillus gasseri (LG) is a probiotic that maintains intestinal homeostasis, stimulates the development of the immune system and helps control the weight of newborns. It is transferred via the entero-mammary route. However, interruption of vaginal birth and breastfeeding make intestinal colonization difficult. The oral administration of probiotics microencapsulated in sodium alginate can replace its vertical transmission. However, digestion in the gastrointestinal tract significantly affects bacterial viability through factors such as pH changes, enzymatic degradation or the action of bile salts. As a consequence, it limits its therapeutic potential. The main objective of this research was to create monolayer (Sodium Alginate) and multilayer (Sodium Alginate/Chitosan/Eudragit S-100) systems for the protection and controlled release of LG C1119 in a static *in vitro* neonatal digestion model. It is made up of 3 phases: mouth, stomach and small intestine. The encapsulation efficiency of LG C1119 was 100% ($>1 \times 10^7$ CFU/g). Regarding size, the multilayer system had a larger diameter and a broader distribution. Digestion tests with LG in its free form showed that it tolerated exposure to gastric acid but did not survive contact with bile salts in the small intestine. Finally, digestion tests with LG in its microencapsulated form revealed that monolayer and multilayer particles protected cells during simulated neonatal digestion. They preserved bacterial viability in quantities $>1 \times 10^6$ CFU/g, equivalent to $>90\%$ survival. However, adequate release of cells in the small intestine was not achieved. The drawback was associated with an incompatibility between the microencapsulation parameters and the digestion conditions of the model.

1. ANTECEDENTES

1.1. Definición de los probióticos

La Organización para la Agricultura y la Alimentación (*FAO*, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (*OMS*), en el 2001, definieron a los probióticos como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped" (*FAO & WHO*, 2001).

La Asociación Científica Internacional para Prebióticos y Probióticos (*ISAPP*, por sus siglas en inglés) publicó un consenso para el uso adecuado del término "probiótico" contemplando la definición de la *FAO/OMS* (Hill et al., 2014). Enfatiza tres características importantes de estos microorganismos: 1) viabilidad celular, 2) cantidad por dosis y 3) beneficios científicamente comprobados en la salud del hospedero.

México, por su parte, emitió un consenso basado en el documento de la *ISAPP* sobre el uso de probióticos en gastroenterología y estableció los "Enunciados generales sobre probióticos" (Valdovinos et al., 2017). En ellos se añaden 2 requisitos: 1) la cepa de un probiótico se debe identificar mediante el género, la especie y la designación alfanumérica y 2) solo aquellos productos cuyo contenido microbiano se identifique como cepas específicas serán considerados probióticos.

1.2. Comercialización de los productos probióticos

Los probióticos son de gran interés comercial debido a que tienen diversos mecanismos biológicos que brindan efectos benéficos a la salud humana, están implicados en la modulación metabólica y del sistema inmunitario, la reconstitución de la microbiota intestinal perturbada, la exclusión competitiva de patógenos, la síntesis de metabolitos bioactivos y la interacción con el eje intestino-cerebro (Damián et al., 2022; Plaza-Díaz et al., 2019; Yoha et al., 2021).

El tamaño del mercado mundial de los productos probióticos se valoró en poco más de un billón de MXN en el 2021, (Grand View Research, 2023) (Fig. 1). Se estima que para finales de 2024 alcanzará más de 1.5 billones de pesos, con la tasa más rápida de retorno de inversión económica registrada hasta ahora, debido a la demanda creciente de alimentos fortificados con probióticos (Yoha et al., 2021).

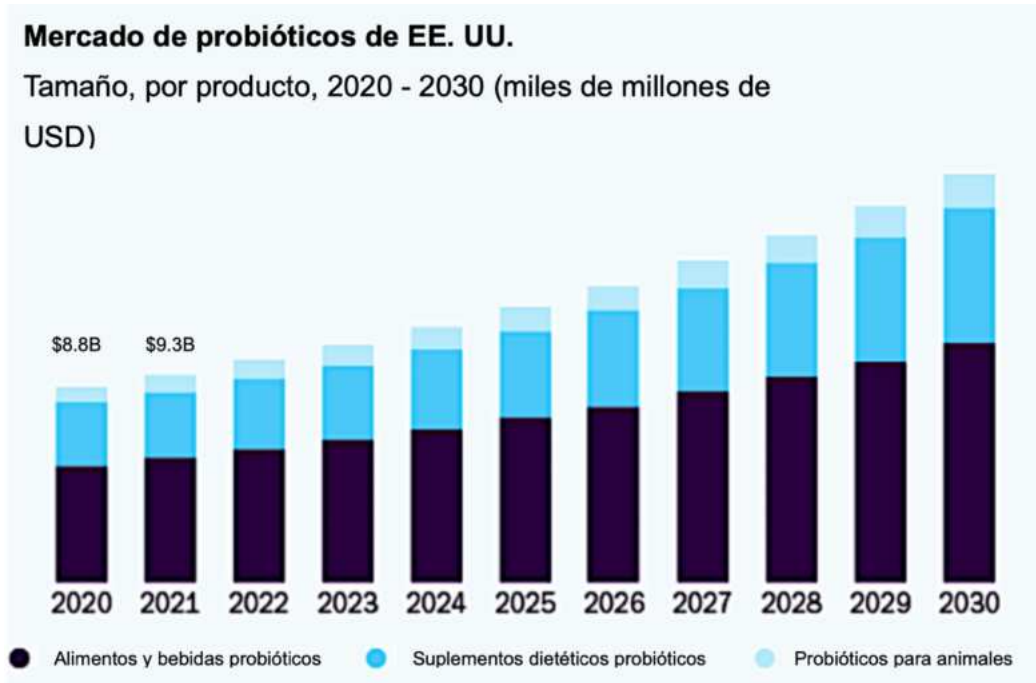


Figura 1. Tendencias de comercialización de productos probióticos en el mercado mundial pronosticadas hasta el año 2030. Destacan tres categorías: 1) alimentos y bebidas probióticos, 2) suplementos dietéticos probióticos y 3) probióticos para alimentación animal. El aumento en la diversificación de presentaciones comerciales, y en su consumo, promueven el interés hacia la atención médica preventiva. Modificado de Grand View Research (2023).

Algunos microorganismos que incluyen estos productos son las bacterias ácido lácticas (BAL; e.j. *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Lactococcus* spp.), las bifidobacterias (e.j. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *B. longum*), las levaduras (e.j. *Saccharomyces cerevisiae*, *S. boulardii*, *S. carisbergensis*) y algunos hongos filamentosos (e.j. *Aspergillus niger*, *A. oryzae*). Se administran por vía oral en presentaciones comerciales como alimentos, suplementos, fármacos, fórmulas infantiles o consorcios bacterianos.

De acuerdo con la *ISAPP*, los probióticos se deben mantener en una cantidad mínima de 1×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por dosis de producto. En el caso del sector alimentario, la cantidad requerida es menor (1×10^6 UFC por porción) porque se suelen ingerir en mayor proporción y es factible alcanzar un consumo equivalente de UFC (Bertazzoni et al., 2013).

1.3. Generalidades de las bacterias ácido lácticas (BAL) y el género *Lactobacillus*

Las BAL son un grupo funcional y genéticamente relacionado que produce ácido láctico como principal producto de la fermentación de azúcares (Francl et al., 2010). La mayoría se clasifican como anaerobias aerotolerantes (Madigan et al., 2022). En la industria alimentaria se utilizan como cultivos iniciadores de productos lácteos fermentados (Jitpakdee et al., 2022). También se encuentran de forma natural en los alimentos (frutas, verduras, cereales, carnes, etc).

Las BAL son "generalmente reconocidas como seguras" (*GRAS*, por sus siglas en inglés) por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (*USFDA*, por sus siglas en inglés). También cuentan con el estatus de "presunción calificada de seguridad" (*QPS*; por sus siglas en inglés) otorgado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*EFSA*, por sus siglas en inglés). Ambos estatus permiten que su uso comercial no presente complicaciones (Dempsey & Corr, 2022).

El género *Lactobacillus* está conformado por bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, no esporulantes, sin cápsula, con morfología bacilar que crecen óptimamente en ambientes ácidos con valores de pH ≤ 4 (Madigan et al., 2022).

Las funciones probióticas de los lactobacilos se ha estudiado porque muestran una asociación mutualista con el ser humano (Al-Yami et al., 2022; Dempsey & Corr, 2022; Gul et al., 2024; Mazziotta et al., 2023). Pueden atravesar el tracto gastrointestinal (TGI), colonizar la mucosa colónica y proliferar. También pueden encontrarse en la cavidad oral, el tracto urogenital femenino y predominan en la región del íleon (Francl et al., 2010).

1.4. Importancia de la lactancia materna en neonatos

Los neonatos son individuos recién nacidos con menos de 4 semanas de edad (Louis et al., 2016). Dependiendo de las semanas de gestación antes del parto, el bebé se puede clasificar como: a término (37-42 semanas), posttérmino (>42 semanas), cerca del término (34-36 semanas) o prematuro (24-34 semanas). Los embarazos suelen tener una duración de 37 a 42 semanas de gestación, en promedio duran 9 meses (40 semanas) (Beade & García, 2024).

La fisiología gastrointestinal de los neonatos se adapta para facilitar la colonización intestinal por los lactobacilos en los primeros meses de vida (Senn et al., 2020). Su densidad

bacteriana aumenta en el TGI después del año. Finalmente, la maduración del sistema inmunitario pueden dificultar la colonización por las BAL después de los 3 años de vida (Houghteling & Walker, 2015; Martín et al., 2012; Senn et al., 2020; Suárez-Martínez et al., 2023).

La lactancia materna es un proceso biológico necesario para la supervivencia de los neonatos. La leche les brinda los nutrientes indispensables para estimular el desarrollo de su sistema inmunológico y sirve como un vehículo para la transferencia vertical de consorcios probióticos que constituyen su microbiota intestinal (Galindo-Sevilla et al., 2021; Rautava, 2020), entre ellos, los lactobacilos y las bifidobacterias (Zhang et al., 2020).

La interrupción de la lactancia materna exclusiva (LME) aumenta la vulnerabilidad a enfermedades infecciosas e impacta negativamente en la correcta absorción de nutrientes (Houghteling & Walker, 2015). Por este motivo, los neonatos deben mantener la LME al menos durante sus primeros 6 meses de vida (OMS & UNICEF, 2023).

Desafortunadamente, la LME se ve interrumpida con frecuencia. El Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (*UNICEF*, por sus siglas en inglés) y el Instituto Nacional de Salud Pública de México reportaron que en el 2016 solo 1 de cada 3 bebés recibió LME hasta los 6 meses.

La OMS & el UNICEF notificaron en el 2020 que la LME disminuyó notablemente debido a la saturación de los sistemas sanitarios por la pandemia de COVID-19. La falta de servicios destinados a asesorar a las madres en la lactancia materna contribuyó a que solo el 41% de los lactantes menores a 6 meses de vida pudieran alimentarse de esta forma y estiman que para el 2025 este porcentaje puede aumentar a un 50%.

1.5. Generalidades sobre *Lactobacillus gasseri* y su transferencia a los neonatos

Lactobacillus gasseri (LG) es una BAL comensal con morfología bacilar alargada y extremos redondeados, mide 0.6-0.8 μm de ancho por 3-5 μm de largo (Azcarate-Peril et al., 2008). La producción industrial de LG puede dificultarse si no se suplementa adecuadamente, debido a que tiene una actividad proteasa débil en su pared celular y sistemas transportadores de aminoácidos deficientes (Arakawa et al., 2015). Para su crecimiento óptimo conviene suministrarle péptidos, particularmente aquellos derivados de la caseína (e.j. triptona), en lugar de proteínas y aminoácidos libres. El caldo Man, Rogosa y Sharpe

(MRS) es un medio de cultivo adecuado para el desarrollo de los lactobacilos y otras BAL (Arakawa et al., 2015).

Lactobacillus gasseri se transfiere al TGI de los neonatos durante el parto vaginal y la lactancia materna (Arakawa et al., 2015). También habita la cavidad oral, el tracto urogenital inferior femenino y la areola mamaria en los adultos (Francl et al., 2010).

Zhang et al. (2020) corroboraron la presencia de LG en muestras de leche materna, así como en las heces de madres y lactantes, por lo cual, denominaron esta vía entero-mamaria de transferencia de microbiota como la “triada” madre-leche materna-lactante.

1.6. Estudios sobre cepas de *L. gasseri* con efectos probióticos

Lactobacillus gasseri es considerada una bacteria probiótica con propiedades relevantes para el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Se han encontrado dos cepas de LG (BNR17 y SBT2055) que ayudan en la pérdida de peso porque aumentan el metabolismo de los lípidos en el intestino delgado y reducen el colesterol sérico (Mahboubi, 2019). La cepa SBT2055 inhibe la actividad de la lipasa pancreática, reduce la leptina sérica y protege la barrera intestinal al disminuir la infiltración de antígenos como el lipopolisacárido (Kawano et al., 2016).

Por otra parte, la cepa DSM 20604 puede producir inulina a partir de sacarosa empleando la inulosacarasa. Esta fibra soluble forma una película gelatinosa en el sistema digestivo que reduce el apetito (Ni et al., 2018). *Lactobacillus gasseri* también puede desconjugar los ácidos biliares y aumentar la excreción de grasas y esteroides en las heces (Mahboubi, 2019).

Lactobacillus gasseri también tiene propiedades inmunomoduladoras, estimula la actividad de los macrófagos y produce bacteriocinas (Mahboubi, 2019; Varela-Pérez et al., 2022). La cepa 4M13 controla la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) y antiinflamatorias (IL-10) (Oh et al., 2018).

Otra cepa denominada NC1501 redujo la inflamación por colitis en un modelo de ratón con deficiencia de IL-10 mediante la producción de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) (Carroll et al., 2007). La enzima mejora la resistencia frente al estrés oxidativo en el intestino grueso y ayuda a disminuir la infiltración de neutrófilos y macrófagos.

Otra función benéfica de LG es la prevención de infecciones. La cepa LG 4/13 induce la producción de IFN- γ , una citocina con actividad antiviral y antiproliferativa implicada en la

respuesta inmune citotóxica (Baltova & Dimitrov, 2014). La cepa ATCC 9857 expresa el factor promotor de agregación APF-2 que inhibe significativamente la adhesión de *Trichomonas vaginalis* a las células ectocervicales vaginales humanas (Phukan et al., 2018). Matsuda et al. (2018) observaron por otra parte un efecto sinérgico de los metabolitos secundarios obtenidos de un cultivo mixto de LG JCM 1131 y *L. crispatus* JCM 1185 sobre la inhibición de la adhesión y formación de biopelículas de *Candida albicans* en células HeLa.

Las cepas LA33 y LA39 extraídas de heces de neonatos lactantes producen una bacteriocina denominada gassericina A (Toba et al., 1991). Esta proteína tiene actividad bactericida contra patógenos transmitidos por alimentos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Pandey et al., 2013).

Diferentes cepas de LG extraídas de neonatos también presentan actividad antagónica contra *Cronobacter sakazakii*, un patógeno oportunista que puede contaminar las fórmulas lácteas infantiles (Ferreira et al., 2011). La presencia de LG en el TGI de neonatos es un soporte para su sistema inmunológico inmaduro.

1.7. Desafíos en el desarrollo de productos probióticos

El principal reto en la creación de productos probióticos es lograr mantener la viabilidad de los microorganismos en una cantidad mínima de 1×10^9 UFC por porción (Bertazzoni et al., 2013; Hill et al., 2014). La protección de los microorganismos durante su procesamiento industrial y el tránsito por el TGI es indispensable. Los cambios de temperatura, pH, humedad, oxidación y la actividad enzimática pueden afectar su viabilidad celular.

El TGI humano se compone por la cavidad oral, la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso (Ogobuiro et al., 2022). Desempeña diferentes funciones para el procesamiento de los alimentos.

Durante la digestión se secretan diferentes sustancias (agua, ácidos, enzimas, tampones, sales) que facilitan la absorción de nutrientes y excreción de productos de desecho. Las diferentes fases de la digestión ocurren en distintas escalas de pH, las cuáles son específicas para cada región del TGI (Tabla 1).

Tabla 1. pH de las secciones del tracto gastrointestinal (TGI) en humanos.

Región del TGI		pH
Esófago		~7.0 ¹
Estómago		1.5-3.5 ²
Intestino delgado	Duodeno	6.0 ^{2,3}
	Yeyuno	7.0 ³
	Íleon	6.7-7.4 ³
Intestino grueso	Ciego	5.6-6.7 ^{2,3}
	Colon	6.0-6.7 ³

¹Cook et al. (2012).

²Sciascia et al. (2016).

³Hua (2020).

El tránsito por el estómago y el intestino delgado produce una alta pérdida de viabilidad celular de los microorganismos. El ácido gástrico, el jugo pancreático, la fuerza iónica, la bilis, la actividad enzimática y la agitación mecánica producen daño celular (Chai et al., 2023; Cotter & Hill, 2003; Han et al., 2021; Yao et al., 2020).

Se crearon los sistemas de liberación controlada a microescala para mejorar su supervivencia. Su propósito es suministrar los probióticos al colon, el sitio donde realizan varias de sus funciones benéficas.

1.8. Tecnología de microencapsulación de probióticos

La microencapsulación se utiliza para capturar partículas sólidas, líquidas o gaseosas en una matriz polimérica cuyo rango de tamaño es de 1 µm a varios milímetros (Bayryamov, 2020). Permite acarrear probióticos para mejorar su estabilidad durante el tránsito por el TGI hasta su liberación en el intestino delgado y protege las células de las condiciones adversas que puedan mermar su función preventiva o terapéutica (Yoha et al., 2022).

La estructura básica de una microcápsula incluye el componente de interés a encapsular (núcleo) y el material encapsulante (material de pared o recubrimiento). También se pueden producir sistemas más complejos (Tabla 2), cuya velocidad de liberación del núcleo depende

de los materiales de pared (e.j. polímeros, lípidos, proteínas, materiales inorgánicos, híbridos orgánicos-inorgánicos) y el método con los que se sintetizaron (Jeyakumari A et al., 2016).

Tabla 2. Clasificación de las microcápsulas con base en su morfología y el número de capas que las constituyen.

Clasificación	Tipo	Descripción
Morfología	Mononuclear ¹	Tienen una sola cámara hueca
	Polinuclear ¹	Tienen varias cámaras huecas grandes
	Matriz ¹	Tienen múltiples cámaras huecas pequeñas dispersas dentro de la microcápsula
Número de capas que constituyen la pared o recubrimiento	Monocapa ²	Sintetizadas empleando solo 1 material de pared
	Multicapa ²	Sintetizadas empleando varios materiales de pared

¹Martínez-Cano et al. (2022).

²Bayryamov (2020).

1.9. Método de gelificación iónica para la producción de microcápsulas

Los diferentes métodos empleados para sintetizar microcápsulas se pueden clasificar en 3 grupos: físico-mecánicos, químicos y fisicoquímicos (Tabla 3) (Bayryamov, 2020; Brignone et al., 2020; Fu & Hu, 2017; Peng et al., 2020). La gelificación iónica es un método fisicoquímico que produce una matriz polimérica tridimensional mediante la interacción electrostática entre cationes divalentes y un polímero iónico.

Tabla 3. Clasificación de diferentes métodos de microencapsulación.

Métodos	Descripción
Físicos o Físico-mecánicos	Secado por aspersion, secado por enfriamiento, suspensión en aire o recubrimiento en lecho fluido, evaporación/extracción de solventes, extrusión.
Químicos	Polimerización <i>in situ</i> , polimerización interfacial, polimerización en suspensión, polimerización en emulsión, polimerización en dispersión.
Físico-químicos	Gelificación iónica, coacervación simple, coacervación compleja, microencapsulación asistida por fluidos supercríticos.

Nota. Adaptado de Bayryamov (2020); Brignone et al. (2020); Fu & Hu (2017); Peng et al. (2020).

La gelificación iónica es un método económico, amigable con el ambiente y que no requiere del uso de disolventes nocivos o temperaturas altas que dañen a los microorganismos (Łętocha et al., 2022). Las partículas se obtienen empleando tres componentes: un material de pared, un agente reticulante y el núcleo (Ortiz-Romero et al., 2021).

1.10. Generalidades de la microencapsulación de probióticos en alginato de sodio (Alg-Na)

El Alg-Na es un biopolímero atractivo en el área de la microencapsulación porque es económico de producir, biodegradable y no tóxico (Martínez-Cano et al., 2022). Además, es biocompatible con los microorganismos y tiene el estatus de *GRAS* (Cook et al., 2012). Consiste en un polisacárido lineal extraído de las paredes celulares de algas pardas y algunas bacterias.

La estructura del Alg-Na está compuesta por ácido β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G), unidos a través de enlaces glucosídicos (1 \rightarrow 4). Al hidratarse actúa como un espesante debido a su alto peso molecular (~10–600 kDa) (Burke et al., 2021). Cuando se expone a una solución reticulante de iones divalentes (e.j. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}) forma un hidrogel a través del mecanismo de gelificación denominado modelo de "caja de huevos" (Martínez-Cano et al., 2022) (Fig. 2).

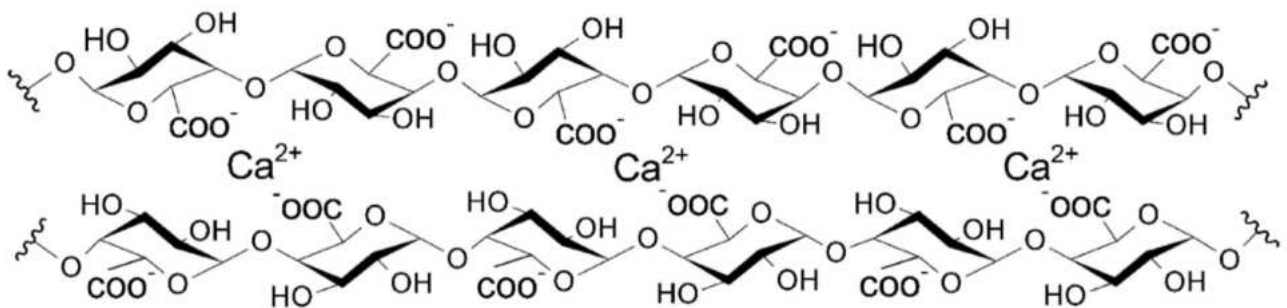


Figura 2. Modelo de "caja de huevos" de la gelificación iónica del alginato de sodio. Los iones de Ca^{2+} se entrelazan electrostáticamente con los grupos carboxilo ($-\text{COOH}$) de dos bloques de ácido α -L-gulurónico (G) del polímero, permitiendo su unión. Los cationes (huevos) quedan rodeado por las cadenas poliméricas (caja de huevo). Tomado de Gawkowska et al. (2018).

La microencapsulación en Alg-Na se ha empleado en la agroindustria para la administración de microorganismos promotores del crecimiento vegetal en hortalizas de interés comercial,

(Martínez-Cano et al., 2022), también para suplementar cultivos de camarón (Vega-Carranza et al., 2021). En cuanto a la industria alimentaria, se ha evaluado su potencial en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales (Burgain et al., 2011; Krasaekoopt et al., 2003; Varela-Pérez et al., 2022). Se plantea que esta tecnología protege las células al amortiguar su contacto con los radicales libres (Cook et al., 2012).

La desventaja de la microencapsulación en Alg-Na es que el biopolímero se hidroliza en condiciones ácidas. Un pH <3.8 produce sinéresis, un fenómeno que provoca la expulsión de agua desde el interior del gel y su eventual ruptura (Toft et al., 1986). Por lo tanto, perjudica la función protectora para los probióticos en la región del estómago.

A pesar de esta desventaja, este sistema ha ofrecido resultados positivos en estudios que evalúan la supervivencia de bacterias en condiciones gastrointestinales simuladas (Holkem et al., 2017; Lotfipour et al., 2012). En ellos utilizan diferentes formulaciones de fluidos digestivos (Cook et al., 2012). Por ejemplo, el fluido salival simulado (FSS), el fluido gástrico simulado (FGS) y el fluido intestinal simulado (FIS).

1.11. Quitosano y Eudragit S-100 (Eu S-100) como recubrimientos de soporte en la microencapsulación de probióticos

El quitosano es un polisacárido lineal catiónico producido comercialmente por desacetilación de la quitina, la cual se obtiene del exoesqueleto del camarón y otros crustáceos marinos. Se compone de unidades distribuidas aleatoriamente de D-glucosamina ancladas mediante enlaces β -(1→4) a N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). Se emplea en la industria alimentaria debido a que no es tóxico, es biodegradable y tiene un bajo costo de producción (Albadran et al., 2015). En solución forma una película de gel utilizada para recubrir superficies aniónicas (Ansari et al., 2017).

El recubrimiento de quitosano sobre microcápsulas de Alg-Na puede brindar a los probióticos una protección adicional durante su exposición al jugo gástrico. Se plantea que el polisacárido mejora su supervivencia porque aumenta la capacidad de amortiguación de las partículas y reduce su permeabilidad (Cook et al., 2013). También puede mejorar significativamente la mucoadhesión de las microcápsulas en el colon (Aranaz et al., 2021; Chen et al., 2013).

La protección conferida por el quitosano disminuye en ambientes ácidos y el recubrimiento se deshace en el estómago. La facilidad con la que se solubiliza el polímero depende de su grado de acetilación, su peso molecular, su cristalinidad, el pH y la temperatura (Aranaz et al., 2021).

Por otra parte, el Eu S-100 es un copolímero aniónico de metacrilato, derivado del ácido metacrílico y metacrilato de metilo (1:2), también es apto para uso alimenticio y no es tóxico (Ansari et al., 2017), es soluble en etanol, pero no en agua o ácidos, se degrada a $\text{pH} \geq 7.0$, idealmente 7.4 (Barbosa et al., 2019; Savardekar & Sherikar, 2020). Se utiliza para la administración de fármacos en el colon, ofrece una liberación controlada y una mejora de la biodisponibilidad (Patra et al., 2017).

Recientemente comenzaron a investigarse las ventajas de utilizar microcápsulas recubiertas con quitosano y Eu S-100 sobre la supervivencia de los probióticos durante su tránsito por el TGI. Por ejemplo, Ansari et al. (2017) reportaron que la encapsulación de *L. rhamnosus* en un sistema de 3 capas (Alg-Na/Quitosano/Eu S-100) le brindó una protección significativamente mayor que un sistema de 2 capas (Alg-Na/Quitosano) en la digestión simulada (FGS; pH 1.55, 2 h / FIS; pH 7.5, 2.5 h). Además, la reducción del recuento de colonias fue significativamente menor en ambos grupos de partículas respecto a la bacteria en su forma libre.

1.12. Avances en la microencapsulación de *L. gasseri*

La microencapsulación de LG es una propuesta nueva y la información disponible es limitada. Varela-Pérez et al. (2022) evaluaron la liberación controlada de este probiótico a partir de un sistema monocapa en un TGI simulado de adulto y la implementación de esta tecnología en una bebida funcional de jugo de manzana

Sintetizaron las microcápsulas empleando el método de emulsión/gelificación iónica. Los componentes que incluyeron fueron: Alg-Na 3% (p/v), suspensión bacteriana de LG (1×10^7 UFC/mL), Tween 80 y aceite vegetal. Para homogeneizar la formulación probaron dos métodos: la agitación magnética (AM; 1150 RPM, 10 min.) y un homogeneizador rotor-estator Ultraturrax® (UT; 4000 RPM, 7.5 min.).

Obtuvieron una eficiencia de encapsulación (EE) de ~65% para ambos métodos. Mantuvieron la viabilidad bacteriana en un 63.10% (AM) y 77% (UT) después del almacenamiento de las microcápsulas en jugo de manzana durante 21 días a 4 °C.

Encontraron que la bacteria en su forma libre no sobrevivió después de su exposición al FGS (pH 3.0; 2 h) en las pruebas de digestión simulada. En cambio, las microcápsulas preservaron la viabilidad bacteriana al 100% (AM) y 79.14% (UT) al finalizar su exposición al FIS (pH 7.0; 2 h).

Por último, concluyeron que la cantidad de inóculo que recuperaron de las partículas no cubrió la dosis mínima necesaria para que el producto alimenticio se comercialice como probiótico (1×10^6 UFC/g).

Una vez expuestos los beneficios que brinda LG a la salud de los neonatos y los hallazgos de la tecnología de microencapsulación sobre la estabilidad de los probióticos, ahora corresponde explorar el efecto de emplear microcápsulas multicapa (Alg-Na/Quitano/Eu S-100) sobre la supervivencia de LG en un TGI simulado de neonato.

2. HIPÓTESIS

Los recubrimientos de quitosano y Eu S-100 sobre microcápsulas de alginato de sodio preservan la viabilidad bacteriana de *L. gasseri* en un modelo estático de digestión de neonato *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar microcápsulas poliméricas multicapa para la protección y liberación controlada de *L. gasseri* en fluidos digestivos de neonato simulados.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1.** Definir las condiciones de experimentación óptimas para desarrollar microcápsulas de Alg-Na cargadas con *L. gasseri*.
- 3.2.2.** Evaluar la eficiencia de encapsulación y viabilidad bacteriana a partir del sistema desarrollado.
- 3.2.3.** Desarrollar microcápsulas multicapa incorporando quitosano y Eu S-100 a partículas de Alg-Na cargadas con *L. gasseri*.
- 3.2.4.** Medir el tamaño de las microcápsulas monocapa y multicapa cargadas con *L. gasseri* mediante microscopía electrónica de barrido.
- 3.2.5.** Evaluar los perfiles de liberación bacteriana a partir de las microcápsulas monocapa y multicapa en las distintas fases de un tracto gastrointestinal simulado de neonato (oral, gástrica, entérica).
- 3.2.6.** Determinar la supervivencia de *L. gasseri* a partir de las microcápsulas monocapa y multicapa al finalizar la digestión simulada de neonato.

4. METODOLOGÍA

Todos los reactivos, utensilios y medios de cultivo se esterilizaron a 120 °C por 25 min. a 20 lb de presión antes de usarse. La cepa de *L. gasseri* denominada LG C1119 se aisló e identificó molecularmente con anterioridad en el Laboratorio de Microbiología Molecular (LAMIMO) de la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada (UMBA) de la UAQ a partir de un suplemento dietético que contenía el probiótico liofilizado (Swanson®).

4.1. Tinción de Gram

Se realizó un frotis bacteriano de LG C1119 en una lámina portaobjetos, se saturó con cristal violeta (1 min.), se lavó con dH₂O, se le aplicó yodo (1 min.), se lavó nuevamente, se decoloró con acetona/etanol 1:1 (v/v) durante 5 s y se le aplicó safranina (1 min.) para hacer el contraste en la muestra. Finalmente, se lavó el colorante y se observó la muestra bajo un microscopio binocular (Modelo DM750).

4.2. Evaluación de la producción de bacteriocinas

La actividad antagónica de LG C1119 contra *Listeria monocytogenes* C1208 o *Salmonella enterica* C827 se evaluó conforme al protocolo descrito por Tulini et al. (2013). Primero, se sembraron diferentes cantidades (2, 10, 20, 40 µL) de un cultivo fresco de LG C1119 (24 h; 37 °C) en dos placas de agar Triptona-Soja (TSA) adicionado con 0.6% (p/v) de extracto de levadura y se dejaron incubar por 48 h a 37 °C. Posteriormente, se les adicionaron 7 mL de agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) inoculados con 100 µL de un cultivo fresco de *L. monocytogenes* C1208 o *S. enterica* C827 ajustados a una DO₆₀₀ de 0.2. Las lecturas de absorbancia se realizaron en el espectrofotómetro UV-Visible Serie GENESYS 10S y se utilizó caldo nutritivo como blanco. Finalmente, las placas se incubaron por 24 h a 37 °C después de que solidificara el agar blando y se buscaron halos de inhibición ≥7 mm, los cuales indican la susceptibilidad de los patógenos a los compuestos antimicrobianos (Fig. 3).

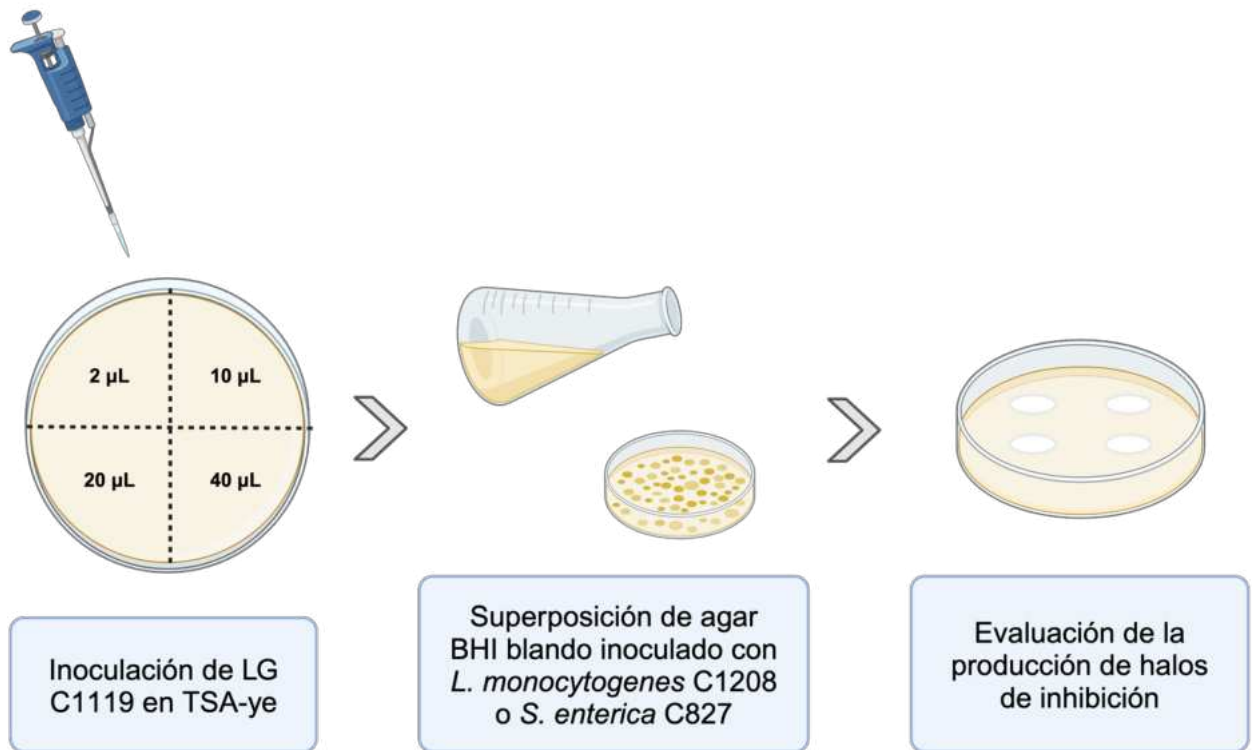


Figura 3. Evaluación de la producción de bacteriocinas por LG C1119. La cepa probiótica se sembró en TSA adicionado con 0.6% (p/v) de extracto de levadura (48 h; 37 °C). Luego, se valoró su efecto antagónico en el crecimiento de *L. monocytogenes* C1208 y *S. enterica* C827 mediante ensayos de superposición en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) blando (24 h; 37 °C). La producción de halos de inhibición ≥ 7 mm indica el efecto antimicrobiano.

4.3. Curva de crecimiento y estandarización de las condiciones de incubación para la microencapsulación

Se incubó a LG C1119 en agar MRS por 24 h a 37 °C y se preparó un cultivo líquido fresco inoculando una colonia en 9 mL de caldo MRS. Después de 24 h a 37 °C con agitación orbital a 150 RPM, se tomó una alícuota (1 mL) para cuantificar la absorbancia de la muestra a una DO_{595} . Se empleó caldo MRS como blanco, se utilizaron palillos, tubos de vidrio con tapa rosca (13x100 mm) y puntas de micropipeta estériles para manipular al microorganismo.

A continuación, se calculó la cantidad necesaria a emplear de cultivo líquido para crecer a LG C1119 en 9 mL de caldo MRS a una DO_{595} de 0.05 (Ec. 1) y se incubaron 15 tubos con caldo a dicha concentración (24 h; 37 °C; 150 RPM).

$$V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1}$$

Ecuación 1. Determinación de la cantidad necesaria de cultivo líquido para crecer a LG C1119 a una DO₅₉₅ de 0.05. Donde C₂ es la DO deseada, V₂ es el volumen (mL) de caldo MRS a preparar a la DO deseada, C₁ es la DO registrada del cultivo líquido fresco y V₁ es el volumen (mL) de cultivo líquido fresco a inocular en caldo MRS para obtener el volumen final a la DO deseada.

Posteriormente, se cuantificó la DO₅₉₅ de 3 tubos diferentes cada 24 h durante un tiempo total de 120 h; el proceso se realizó por duplicado. La curva de crecimiento se generó con la DO₅₉₅ registrada de los tubos de cultivo en función del tiempo al que se tomaron las muestras.

Para determinar la cantidad de UFC/mL recuperadas a partir de un cultivo líquido fresco de LG C1119 (24 h; 37 °C; 150 RPM), se preparó una alícuota de muestra (1 mL) a una DO₅₉₅ de 1.0 y se sembraron 50 µL en dos tubos de 9 mL de caldo MRS; este proceso se realizó por duplicado. Después de la incubación, se hicieron diluciones seriadas a partir de los tubos y se sembraron 100 µL en placas de agar MRS (1x10⁻⁴ a 1x10⁻⁶).

Se emplearon perlas de vidrio para distribuir la muestra de forma homogénea sobre el medio mediante seis movimientos de derecha a izquierda, seis de adelante hacia atrás, seis en sentido horario y seis en sentido antihorario. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C (Fig. 4).

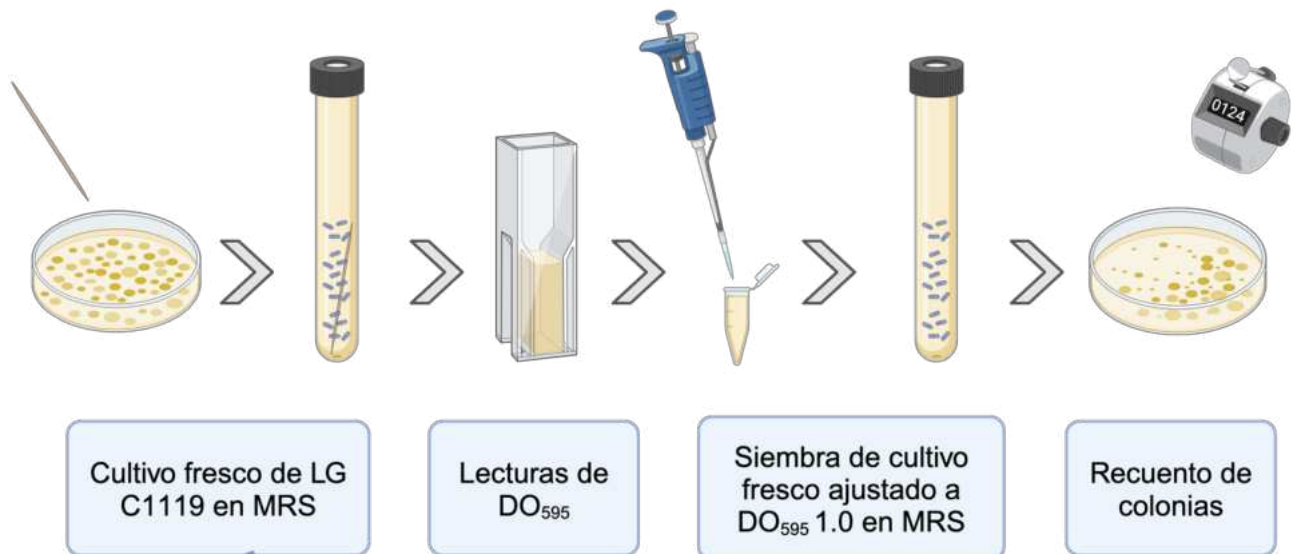


Figura 4. Estandarización de las condiciones de crecimiento de LG C1119 en medio de cultivo MRS. Se incubó por 24 h a 37 °C con agitación orbital a 150 RPM. Las lecturas de absorbancia se realizaron a DO₅₉₅ en el espectrofotómetro UV-Visible Serie GENESYS 10S. Las UFC/mL se calcularon a partir del recuento de colonias de las diluciones 1x10⁻⁴ hasta 1x10⁻⁶.

Finalmente, se realizó el recuento de colonias viables y se calcularon las UFC/mL recuperadas de las diluciones seriadas (Ec. 2).

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{A * B}{C}$$

Ecuación 2. Determinación de la cantidad de UFC/mL recuperadas de un cultivo líquido de LG C1119. Donde *A* es el promedio de colonias contabilizadas en el agar MRS, *B* es el factor de dilución empleado y *C* es el volumen (mL) de cultivo bacteriano empleado.

4.4. Microencapsulación de *L. gasseri* en Alg-Na

Se inoculó un tubo de 9 mL de caldo MRS con una alícuota (50 µL) de un cultivo fresco de LG C1119 ajustado a una DO₅₉₅ de 1.0 y se incubó por 24 h a 37 °C con agitación orbital a 150 RPM. A continuación, el cultivo se centrifugó (5 min., 4 °C; 11,000 RPM) para recuperar una pastilla de células bacterianas, el sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril en un tubo de microcentrífuga (0.85 g NaCl en 0.1 L de dH₂O).

La suspensión se centrifugó (5 min., 4 °C; 8,000 RPM), el sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió nuevamente en 1 mL de solución salina; el proceso se realizó tres veces. Finalmente, la pastilla se resuspendió en un volumen final de 9 mL de solución salina, se prepararon diluciones seriadas hasta 1×10^{-5} y se inocularon alícuotas (100 μ L) en agar MRS para determinar la cantidad de UFC/mL mantenidas después del proceso de lavado.

Se mezclaron 5 mL de la suspensión bacteriana con 500 μ L de aceite de maíz y 500 μ L de Tween 20 empleando un homogeneizador de mano de altas velocidades para preparar la emulsión (2 min.; 12,000 RPM), el equipo se usó en lapsos de 30 s para evitar el sobrecalentamiento de la propela. Se prepararon diluciones seriadas hasta 1×10^{-5} a partir de la emulsión y se inocularon alícuotas (100 μ L) en agar MRS para determinar la cantidad de UFC/mL recuperadas después del proceso de mezclado.

Posteriormente, se depositaron 20 mL de una solución de Alg-Na al 2% (p/v) junto con la emulsión generada en un tubo cónico de 50 mL, se mezclaron mediante un vortex (30 s; 3,400 RPM) y se incorporaron completamente con el homogeneizador (2 min.; 12,000 RPM). Se prepararon diluciones seriadas hasta 1×10^{-4} a partir de la mezcla polimérica y se inocularon alícuotas (100 μ L) en agar MRS para determinar la cantidad de UFC/mL mantenidas previo al proceso de microencapsulación.

La mezcla polimérica se extruyó gota a gota con una jeringa (22G x 32 mm) sobre 25 mL de una solución de CaCl_2 al 2% (p/v) pH 4.0 para producir las microcápsulas. Las partículas se mantuvieron en agitación magnética por 35 min a 200 RPM, después se filtraron a través de un embudo de vidrio con tela Non Woven y se lavaron con dH_2O tres veces (Fig. 5).

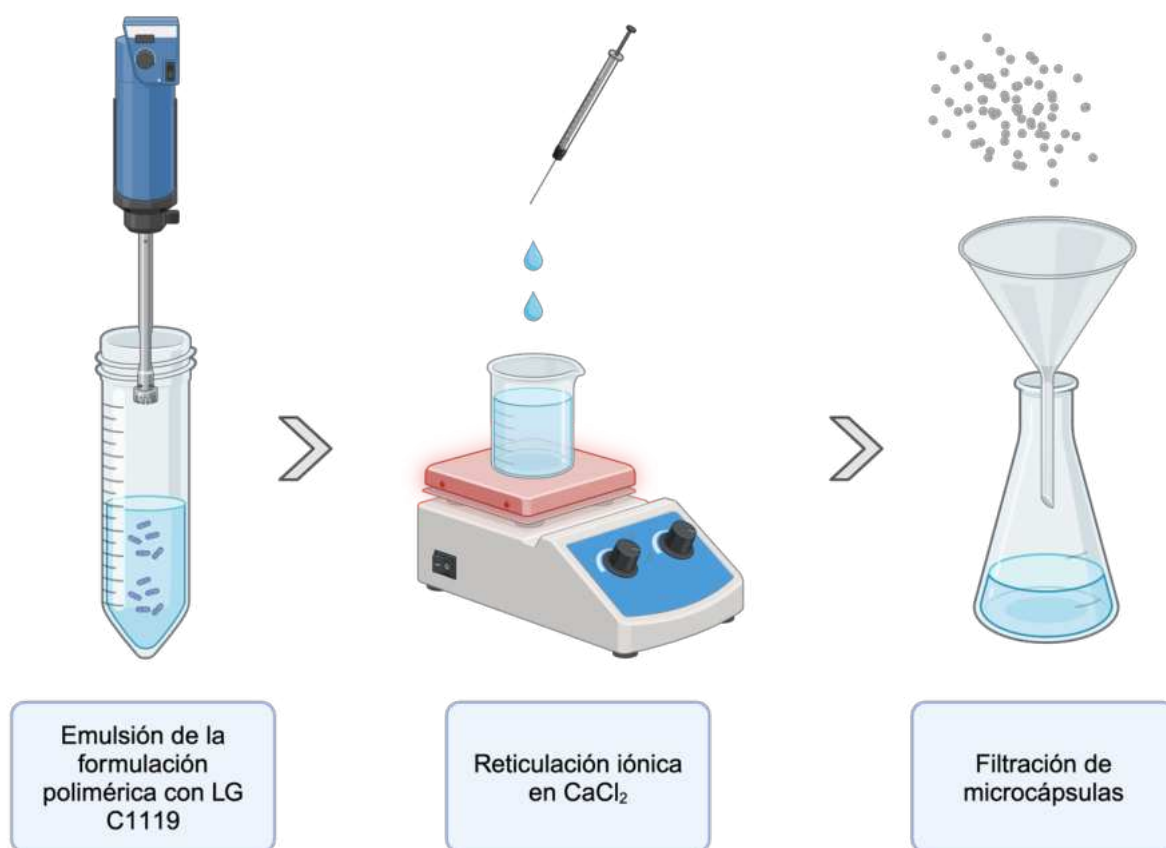


Figura 5. Microencapsulación de LG C1119 en una matriz polimérica de Alg-Na mediante el método de emulsión/gelificación iónica. La emulsión incluyó la suspensión bacteriana, el aceite de maíz y el Tween 20. Se mezclaron con un homogeneizador de mano de altas velocidades (2 min.; 12,000 RPM). La reticulación iónica se realizó en una solución de CaCl₂ (35 min.; 200 RPM).

Se disolvió 1 g de partículas en 9 mL de PBS 0.1 M (pH 7.4) durante 35 min., se prepararon diluciones seriadas hasta 1×10^{-5} y se sembraron alícuotas (100 μ L) en agar MRS para determinar la cantidad de UFC/g encapsuladas. También se tomaron alícuotas (100 μ L) de la solución reticulante y se sembraron en agar MRS para determinar la cantidad de UFC/mL que no se encapsularon; las muestras se tomaron por duplicado en las diferentes etapas del proceso de microencapsulación y las placas se incubaron por 48 h a 37 °C. Finalmente, se calculó el porcentaje de encapsulación de LG C1119 (Ec. 3) y las reducciones porcentual (Ec. 4) y logarítmica (Ec. 5) de la viabilidad celular.

$$EE \% = \left(\frac{\text{Log}_{10} N}{\text{Log}_{10} N_0} \right) * 100$$

Ecuación 3. Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE%). Donde N son las UFC/g liberadas de las microcápsulas y N_0 son las UFC/mL conservadas en la emulsión antes de la microencapsulación. Tomado de Luca & Oroian (2021).

$$R\% = \frac{(A - B) * 100}{A}$$

Ecuación 4. Determinación de la reducción porcentual de la viabilidad celular después de la microencapsulación. Donde A son las colonias viables (UFC/mL) presentes en la emulsión mezclada con Alg-Na y B son las colonias viables liberadas de las microcápsulas (UFC/g). Adaptado de Tanner (2021).

$$R_{\log} = \text{Log}_{10}(A) - \text{Log}_{10}(B)$$

Ecuación 5. Determinación de la reducción logarítmica de la viabilidad celular después de la microencapsulación. Donde A son las colonias viables (UFC/mL) presentes en la emulsión mezclada con Alg-Na y B son las colonias viables liberadas de las microcápsulas (UFC/g). Un valor de reducción log es igual a 1×10^1 , 2 log es igual a 1×10^2 , y así sucesivamente. Adaptado de Tanner (2021).

4.5. Aplicación de los recubrimientos de quitosano y Eu S-100 sobre microcápsulas de Alg-Na cargadas con *L. gasseri*

Se preparó una solución de quitosano de bajo peso molecular al 0.4 % (p/v) pH 5.8 (Ansari et al., 2017). Brevemente, se mezclaron 0.4 g de quitosano, 90 mL de dH₂O y 0.4 mL de ácido acético glacial concentrado, se mantuvieron en agitación magnética (10 min.; 200 RPM) para permitir su disolución. Finalmente, se ajustó el pH de la mezcla a 5.8 con NaOH 4 M y se aforó con dH₂O a un volumen final de 100 mL.

La solución de Eu S-100 se preparó mediante el método de desplazamiento de solvente (Pool et al., 2012), con algunas modificaciones. Primero, se prepararon dos soluciones: acetato de polivinilo (PVA; Mw: 89,000-98,000) al 5% (p/v) en dH₂O y Eu S-100 al 1% (p/v) en EtOH 96% (v/v), ambas se disolvieron mediante agitación magnética (30 min.; 400 RPM). Después, se mezclaron en relación 1:1 (10 min.; 200 RPM) y el EtOH se extrajo mediante

evaporación en baño maría en una campana de extracción de gases (30 min.; 200 RPM; 93 °C).

La aplicación de los recubrimientos de quitosano y Eu S-100 sobre las microcápsulas de Alg-Na cargadas con LG C1119 se realizó con base en un protocolo descrito previamente (Pourjafar et al., 2020). Se depositaron 5 g de partículas en 50 mL de la solución de quitosano y se mantuvieron en agitación magnética (40 min.; 200 RPM), luego se filtraron y se lavaron con dH₂O tres veces.

A continuación, las microcápsulas bicapa se depositaron en 50 mL de la solución de Eu S-100 y se mantuvieron en agitación magnética (4 h; 200 RPM) para aplicar el segundo recubrimiento; se filtraron y lavaron como se describió anteriormente. Finalmente, las microcápsulas multicapa se depositaron en tubos cónicos de 50 mL y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta utilizarse.

4.6. Análisis del tamaño de partícula

Se produjeron lotes de partículas monocapa (Alg-Na) y multicapa (Alg-Na/Quitosano/Eu S-100) cargadas con LG C1119 conforme al protocolo de microencapsulación estandarizado previamente, únicamente se sustituyó la aguja por la de una jeringa para insulina (31G x 6 mm). Posteriormente, las muestras se liofilizaron para su análisis mediante microscopía electrónica de barrido (*SEM*, por sus siglas en inglés) y se midió el diámetro (mm) de 100 unidades seleccionadas al azar de ambos sistemas.

4.7. Ensayos de digestión con *L. gasseri*

Se construyó un modelo estático de digestión de neonato *in vitro* para evaluar la supervivencia (S%) de LG C1119 en su forma libre y microencapsulada posterior a la exposición a tres fases: Fluido Salival Simulado (FSS), Fluido Gástrico Simulado (FGS) y Fluido Intestinal Simulado (FIS) (Fig. 6).

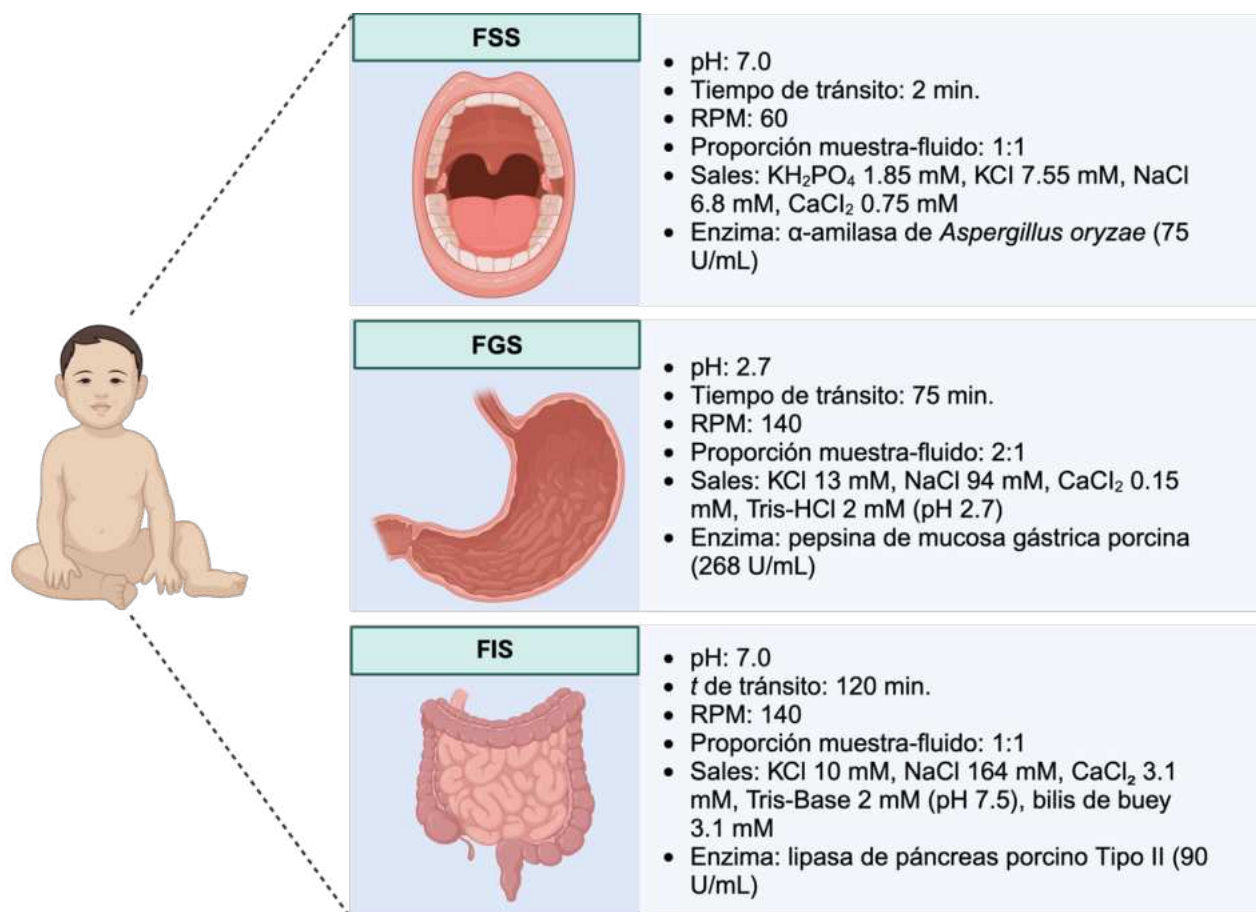


Figura 6. Modelo estático de digestión de neonato *in vitro*. Los componentes y condiciones de operación del modelo se recabaron de diferentes reportes sobre la fisiología gastrointestinal de recién nacidos (Bourlieu et al., 2014; de Oliveira et al., 2016; Feng et al., 2022; W. Liu et al., 2019; Ménard et al., 2018; Wang et al., 2022). Las soluciones de sales y las enzimas se pre-calientan a 37 °C previo a su uso, las muestras se mantienen en agitación orbital durante el tránsito por cada fase. FSS, Fluido Salival Simulado; FGS, Fluido Gástrico Simulado; FIS, Fluido Intestinal Simulado; RPM, revoluciones por minuto.

En la Tabla 4 se muestran los stocks utilizados para preparar los fluidos digestivos simulados. La α -Amilasa y la lipasa pancreática se disolvieron en dH_2O , la pepsina se disolvió en HCl 0.01 N; se almacenaron a -20 °C una vez preparadas hasta utilizarse.

Tabla 4. Stocks de los reactivos utilizados en los ensayos de digestión.

Sales	KCl 500 mM, NaCl 1 M, NaCl 2 M, KH_2PO_4 200 mM, CaCl_2 100 mM
Tampones	Tris-Base 80 mM (pH 7.5), Tris-HCl 80 mM (pH 2.7).
Ácidos y Bases	HCl 1 M, HCl 50%, NaOH 4 M

Enzimas	α -Amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i> 10x (300 U/mL), pepsina de mucosa gástrica porcina 10x (2500 U/mL), lipasa de páncreas porcino Tipo II (1250 U/mL).
Sales biliares	Bilis de buey 28 mM

Nota. Se utilizó caldo Verde Brillante Bilis 2% como fuente de la bilis de buey, el cuál contiene 20 g/L del compuesto de interés a una concentración 28 mM/Kg (Hu et al., 2018).

Primero, se evaluó la supervivencia de LG C1119 en su forma libre en el modelo de digestión. Se probaron dos tratamientos, uno con las enzimas y bilis presentes (E/B+), otro sin ambas (E/B-). El grupo control utilizó un volúmen de células (2.5 mL) que no se sometió a la digestión (Fig. 7).

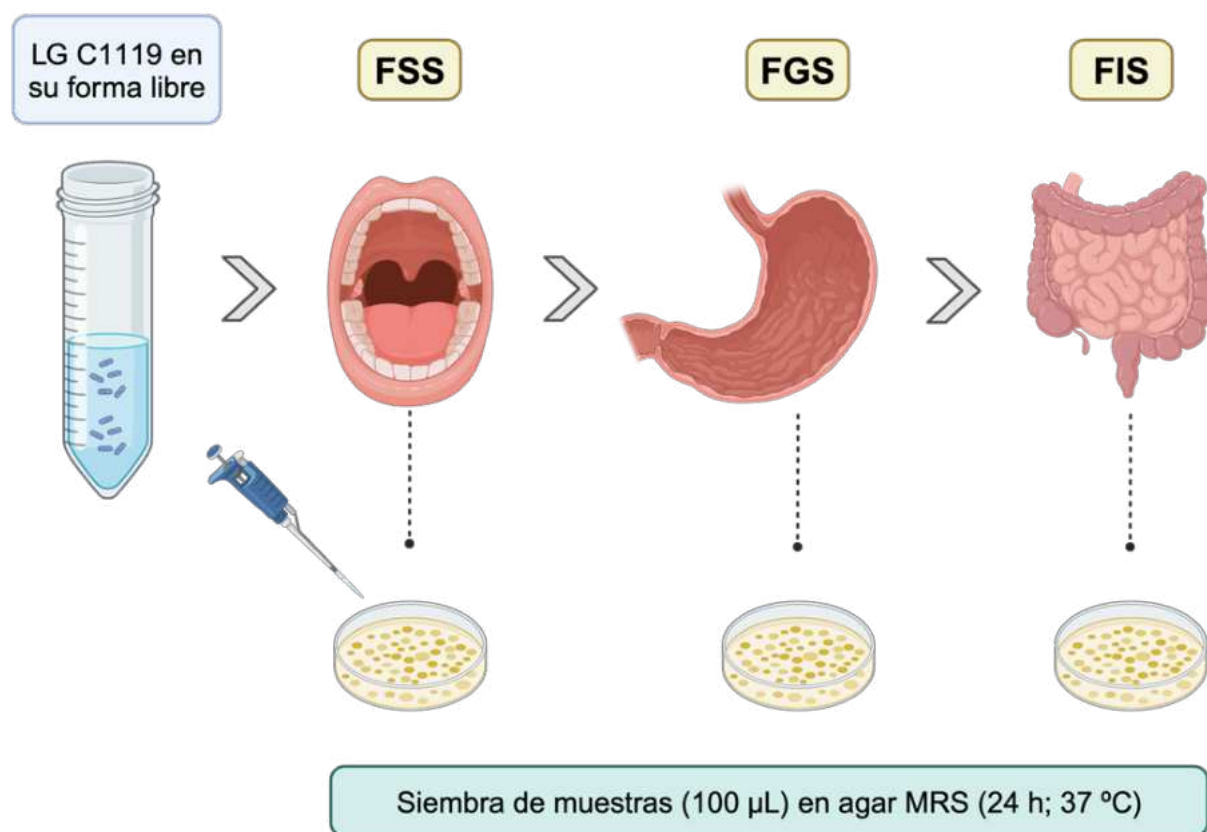


Figura 7. Ensayos de digestión con LG C1119 en su forma libre en el modelo estático de digestión de neonato *in vitro*. Se evaluó la supervivencia (S%) en los fluidos digestivos simulados. Se probaron dos tratamientos: E/B-, enzimas y bilis de bovino ausentes; E/B+, enzimas y bilis de bovino presentes. Al finalizar la exposición a cada fase, se tomaron alícuotas (100 μ L) y se sembraron en agar MRS (24 h; 37 $^{\circ}$ C) para contar las colonias viables. FSS, Fluido Salival Simulado; FGS, Fluido Gástrico Simulado; FIS, Fluido Intestinal Simulado; (-), Ausente; (+), Presente.

Los ensayos se realizaron en tubos cónicos de 50 mL con 2.5 mL de una suspensión bacteriana obtenida a partir de un cultivo fresco ajustado a una DO₅₉₅ de 1.0. Las células se expusieron sucesivamente a las tres fases simuladas en un mismo tubo, primero se incorporaron las sales y los tampones, después se ajustó el pH, luego se añadieron las enzimas y finalmente se aforó con dH₂O al volumen final necesario para alcanzar la proporción muestra-fluido especificada para cada fase; el caldo Verde Brillante Bilis 2% se incorporó antes que la enzima en la fase del FIS.

En la Tabla 5 se especifican las cantidades de los stocks de reactivos utilizadas para alcanzar las concentraciones requeridas en cada fase. En el caso del segundo tratamiento (E/B-), las cantidades de enzimas y bilis se reemplazaron por volúmenes iguales de dH₂O.

Tabla 5. Composición de los fluidos simulados para un ensayo de digestión con 2.5 mL de muestra.

Fase	Vol. (mL) de muestra	Vol. (mL) de fluido digestivo	Vol. (mL) total de digestión	Reactivos contenidos en el fluido digestivo	Vol. (mL) tomado de los stocks
FSS	2.5	2.5	5	KCl	0.151
				NaCl 1 M	0.068
				KH ₂ PO ₄	0.093
				HCl 1 M	0.0075
				CaCl ₂	0.075
				dH ₂ O	0.856
				α-Amilasa	1.25
FGS	5	2.5	7.5	KCl	0.195
				NaCl 2 M	0.353
				Tris-HCl	0.188
				HCl 50%	0.0036
				CaCl ₂	0.011

				dH ₂ O	0.946
				Pepsina	0.804
FIS	7.5	7.5	15	KCl	0.3
				NaCl 1 M	2.46
				Tris-Base	0.375
				NaOH 4 M	0.025
				CaCl ₂	0.465
				dH ₂ O	1.137
				Bilis	1.658
				Lipasa	1.080

Nota. En el FGS y el FIS, la muestra corresponde al volumen inicial de células más el fluido digestivo de la fase anterior.

Finalmente, se calculó el porcentaje de supervivencia (Ec. 6).

$$S\% = \left(\frac{\text{Log}_{10} ND}{\text{Log}_{10} N} \right) * 100$$

Ecuación 6. Determinación de la supervivencia (S%) en los ensayos de digestión. Donde *ND* son las UFC/mL o g recuperadas post-digestión y *N* son las UFC/mL o g registradas en el control. Adaptado de Lotfipour et al. (2012).

Por otra parte, se evaluó la supervivencia de LG C1119 en su forma microencapsulada en los sistemas monocapa (Alg-Na) y multicapa (Alg-Na/Quitosano/Eu S-100) después de la digestión (Fig. 8). Los ensayos se realizaron con 2.5 g de partículas. El grupo control utilizado consistió en una cantidad de microcápsulas (2.5 g) que no se sometió a la digestión. La composición de los fluidos simulados fue la misma de la Tabla 5.

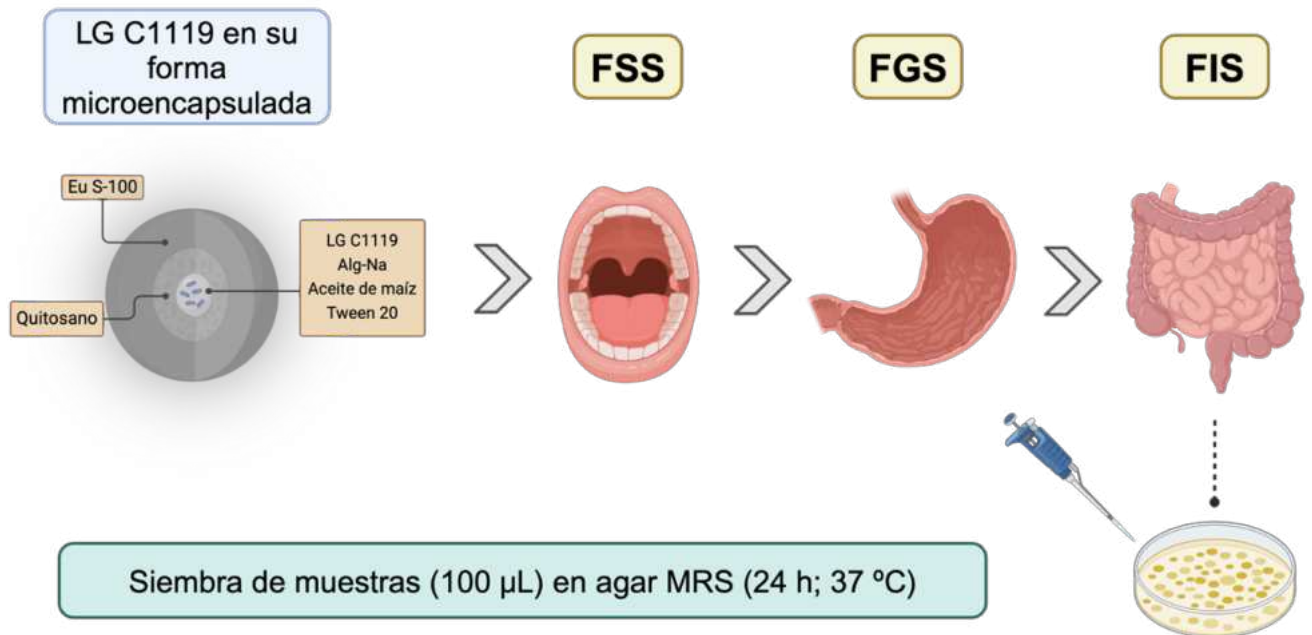


Figura 8. Ensayos de digestión con LG C1119 en su forma microencapsulada en el modelo estático de digestión de neonato *in vitro*. Se evaluó la supervivencia (S%) conservada en los sistemas monocapa (Alg-Na) y multicapa (Alg-Na/Quitosano/Eu S-100). Las pruebas se realizaron con las enzimas y bilis de bovino presentes. Las partículas se filtraron con un embudo de vidrio con tela Non Woven y se lavaron con dH₂O tres veces después de la exposición al FIS. Luego, se disolvieron en PBS 0.1 M (pH 7.4), se tomaron alícuotas (100 µL) y se sembraron en agar MRS (24 h; 37 °C) para contar las colonias viables. FSS, Fluido Salival Simulado; FGS, Fluido Gástrico Simulado; FIS, Fluido Intestinal Simulado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Morfología colonial y tinción de Gram

La morfología colonial en agar MRS es irregular, elevada y con borde ondulado (Fig. 9). Poseen brillo, pigmentación color crema, textura lisa y consistencia suave. Su tamaño es pequeño ($\geq 1\text{mm}$, $< 2\text{mm}$) (Rothschild, 2020).

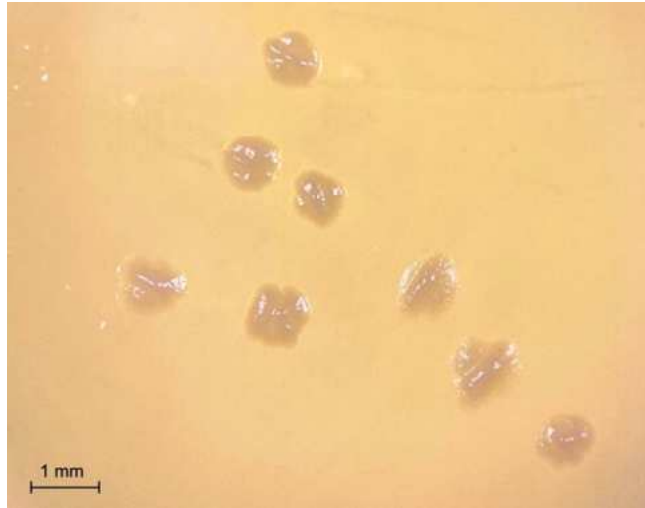


Figura 9. Crecimiento de colonias de LG C1119 en agar MRS (24 h; 37 °C). La imagen se capturó en un estereomicroscopio (Modelo EZ4 D, Leica). Barra de escala = 1 mm.

Las células se identificaron como bacterias Gram positivas con una morfología bacilar típica del género *Lactobacillus* (Madigan et al., 2022). La morfología de los bacilos es curva, fina, alargada, con extremos redondeados, y se agrupan en cadena (Fig. 10).

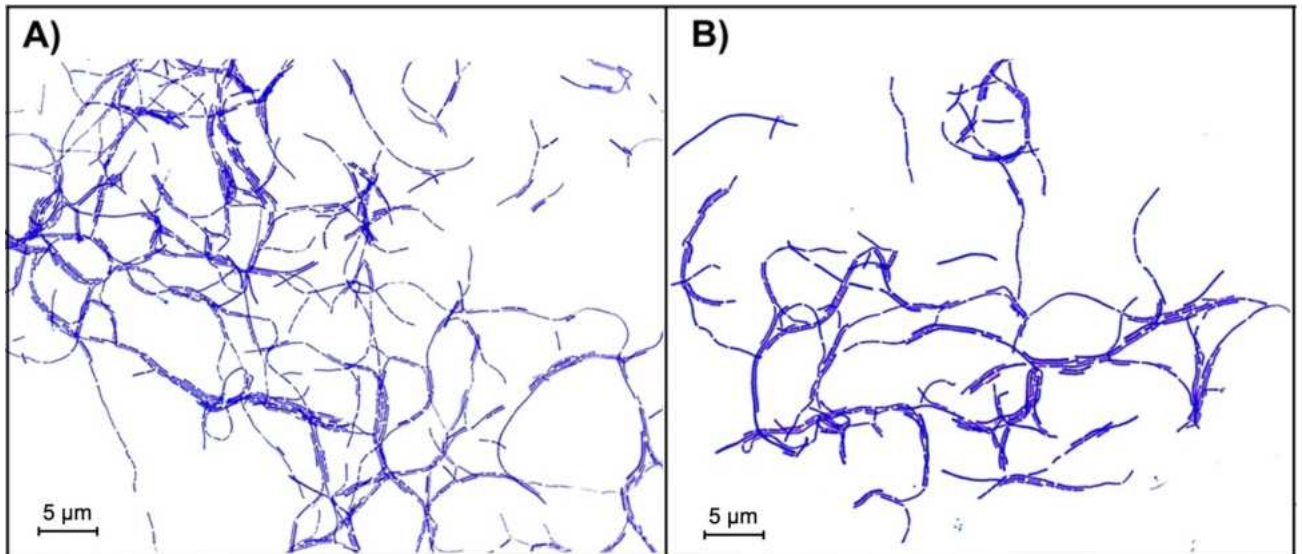


Figura 10. Microscopía de células de LG C1119 tratadas con la técnica de tinción de Gram. A) Frotis realizado a partir de un cultivo fresco. B) Frotis realizado a partir de colonias recuperadas de microcápsulas de Alg-Na. Fotografías tomadas con una cámara Leica ICC50 HD acoplada a un microscopio binocular (Modelo DM750). Magnificación 100x. Barra de escala = 5 µm.

5.2. Evaluación de la producción de bacteriocinas

La ausencia de halos de inhibición indica que LG C1119 no produjo bacteriocinas que fueran capaces de afectar el crecimiento de *L. monocytogenes* C1208 o *S. enterica* C827 (Fig. 11).

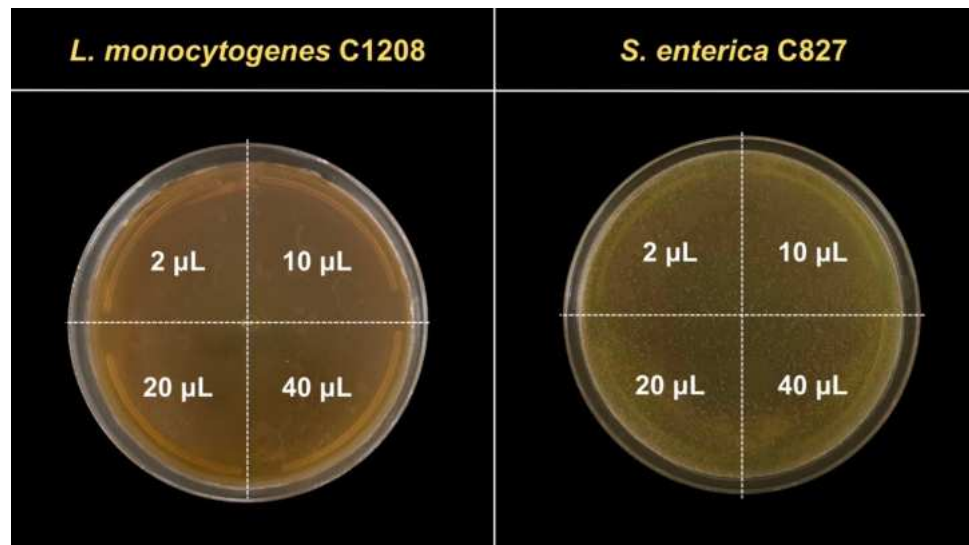


Figura 11. Evaluación de la producción de bacteriocinas por LG C1119 mediante ensayos de superposición en agar blando. La cepa probiótica se inoculó en TSA adicionado con 0.6% (p/v) de extracto de levadura (48 h; 37 °C). Después, se cubrió con agar BHI blando inoculado con *L. monocytogenes* C1208 o *S. enterica* C827 (DO₆₀₀ 0.2). Ambas pruebas dieron un resultado negativo a la producción de halos de inhibición ≥ 7 mm posterior a la incubación (24 h; 37 °C).

La producción de bacteriocinas está regulada por factores como el pH, la temperatura de incubación y los nutrientes disponibles en el medio de cultivo (Yang et al., 2018). En este trabajo se incubó a LG C1119 en TSA (pH 7.3) por 48 h a 37 °C y su crecimiento fue mínimo. Se especula que la bacteria no se desarrolló en condiciones óptimas durante la evaluación de la producción de compuestos antimicrobianos, el TSA es un medio de cultivo general y no de enriquecimiento de lactobacilos. Por otra parte, las células se inocularon en el medio de cultivo con un pH inicial menos ácido que el óptimo para el crecimiento de BAL; provocando una extensión de la fase de latencia en la curva de crecimiento de LG (Yang et al., 2018). Se sugiere realizar una inoculación en agar MRS (pH 6.2) por 24 h a 37 °C para evaluar nuevamente la producción de bacteriocinas.

No se descarta que LG C1119 sea bacteriocinógena porque otras cepas de la misma especie han mostrado actividad antimicrobiana frente a diferentes patógenos. Por ejemplo, la cepa LG-C45 brindó un efecto inhibitorio contra 10 cepas diferentes de *Listeria monocytogenes* (Poimenidou et al., 2023). La cepa LG LM19 interfiere en el crecimiento de *Clostridium perfringens* NCTC 3110, *Cronobacter sakazakii* NCTC 11467, *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 y *Micrococcus luteus* FI10640 (Garcia-Gutierrez et al., 2020).

5.3. Curva de crecimiento y estandarización de las condiciones de incubación para la microencapsulación

Se midió el crecimiento de LG C1119 en un tiempo total de 120 h. El incremento máximo de la DO₅₉₅ ocurrió a las 48 h de incubación (Fig. 12). Después, disminuyó hasta un valor <1.0.

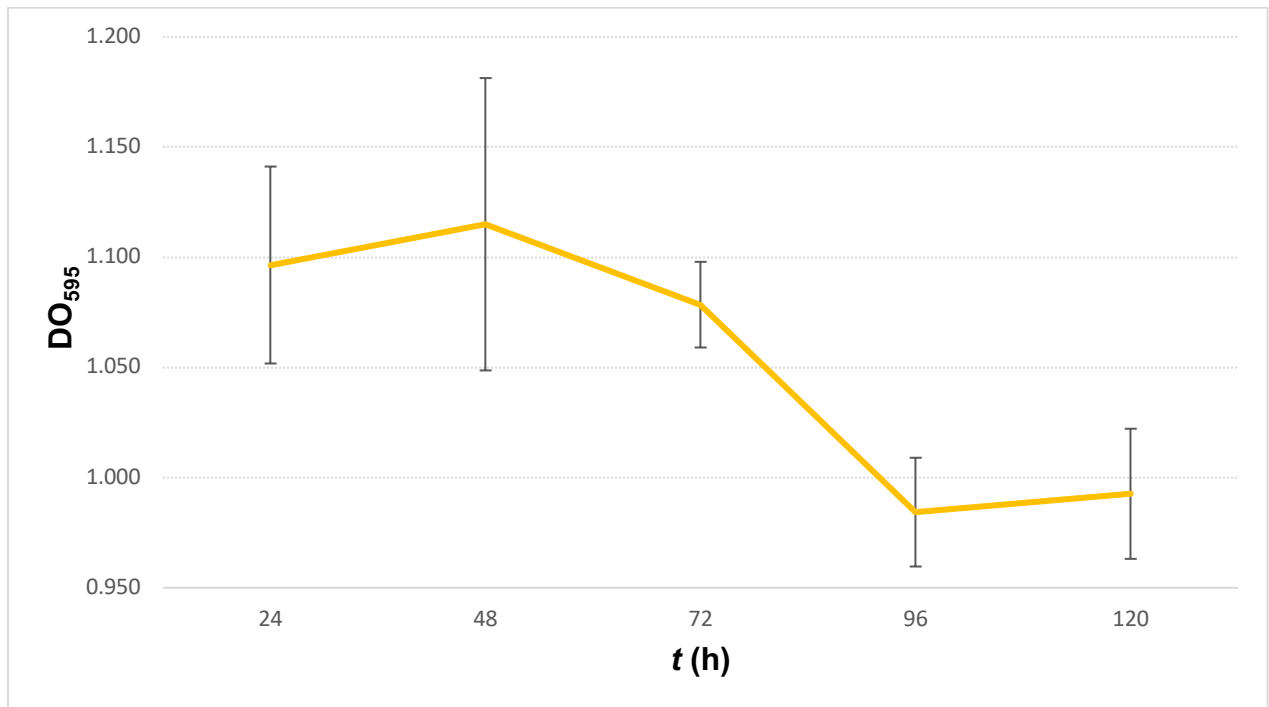


Figura 12. Curva de crecimiento de LG C1119. Se inoculó en caldo MRS (120 h; 37 °C; 150 RPM) y se cuantificó la DO₅₉₅ de 3 muestras diferentes cada 24 h. DO₅₉₅, densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm; t; tiempo. Las líneas verticales en cada periodo de tiempo indican la desviación estándar.

La prueba se realizó por duplicado.

Anteriormente se reveló que la tasa de crecimiento bacteriano de LG varía en función de la fuente de carbohidratos que consume (Francl et al., 2010), y cada cepa expresa diferentes transportadores *PTS* (*phosphotransferase transporter system*, por su traducción en inglés) para metabolizarlos (Bron et al., 2004; Denou et al., 2008; Lorca et al., 2007).

El medio de cultivo MRS (DIBICO) que se utilizó en esta tesis contiene glucosa como fuente de carbono. Las diferentes cepas de LG metabolizan este azúcar de forma similar, independientemente de los transportadores *PTS* que codifican (Francl et al., 2010).

Está documentado que la fase exponencial del crecimiento bacteriano de LG en caldo MRS ocurre desde las 20 h de incubación, con un tiempo de duplicación celular de ~1.16 h (Jurado-Gómez et al., 2016a).

Las muestras de LG C1119 tomadas a las 24 y 48 h de incubación a 37 °C arrojaron valores de DO₅₉₅ de 1.097 y 1.115, respectivamente. Previamente se registraron lecturas más bajas

($DO_{600} < 0.8$) para diferentes cepas de LG incubadas en caldo MRS semisintético suplementado con 1% de glucosa (p/v) por 24 h a 37 °C (Francl et al., 2010).

Finalmente, las condiciones de incubación de LG C1119 en caldo MRS elegidas para los siguientes experimentos fueron: 24 h a 37 °C con agitación orbital a 150 RPM. El crecimiento promedio obtenido a partir de un cultivo fresco fue de 1.70×10^8 UFC/mL (≥ 7 log) siguiendo estos parámetros. Las cantidades reportadas a las 48 h de incubación en otras cepas de LG fueron desde 1×10^7 hasta 1×10^8 UFC/mL (Arakawa et al., 2015).

5.4. Microencapsulación de *L. gasseri* en Alg-Na

Se diseñó una formulación polimérica para producir microcápsulas cargadas con LG C1119 (Fig. 13).



Figura 13. Fotografía de microcápsulas monocapa (Alg-Na) cargadas con LG C1119. La imagen se capturó en un estereomicroscopio (Modelo EZ4 D, Leica). Barra de escala = 1 mm.

Se evaluó si la técnica de emulsión utilizada no fue perjudicial para la viabilidad bacteriana, debido a que en estudios previos se encontró que diferentes condiciones de homogeneización afectaron la carga microbiana (Ding & Shah, 2009; Ribeiro et al., 2014; Romero-Chapol et al., 2022; Varela-Pérez et al., 2022).

La velocidad de agitación y el tiempo de uso del equipo pueden perjudicar la estabilidad del probiótico, los recuentos obtenidos de células viables son más altos a menor velocidad y tiempo de mezclado (Ding & Shah, 2009). Para este trabajo se optó por manejar una

velocidad de agitación alta en lapsos de tiempo cortos porque el cabezal de dispersión del equipo genera calor si se manipula por un tiempo prolongado. Las altas temperaturas desnaturalizan las proteínas de la bacteria, su material genético, su membrana celular y afectan rutas metabólicas cruciales para su supervivencia (Guo et al., 2024; Madigan et al., 2022).

Se realizó una prueba T pareada para comparar la cantidad de UFC/mL recuperadas antes y después de la emulsión. Los resultados indicaron que el procedimiento no afectó significativamente la viabilidad bacteriana ($p > 0.05$), la cuál se conservó en un $100.28 \pm 3.85\%$. La cantidad de cultivo se mantuvo $>1 \times 10^7$ UFC/mL (Fig. 14). El equipo funcionó para la incorporación del cultivo bacteriano de LG C1119 en la emulsión de aceite en agua.

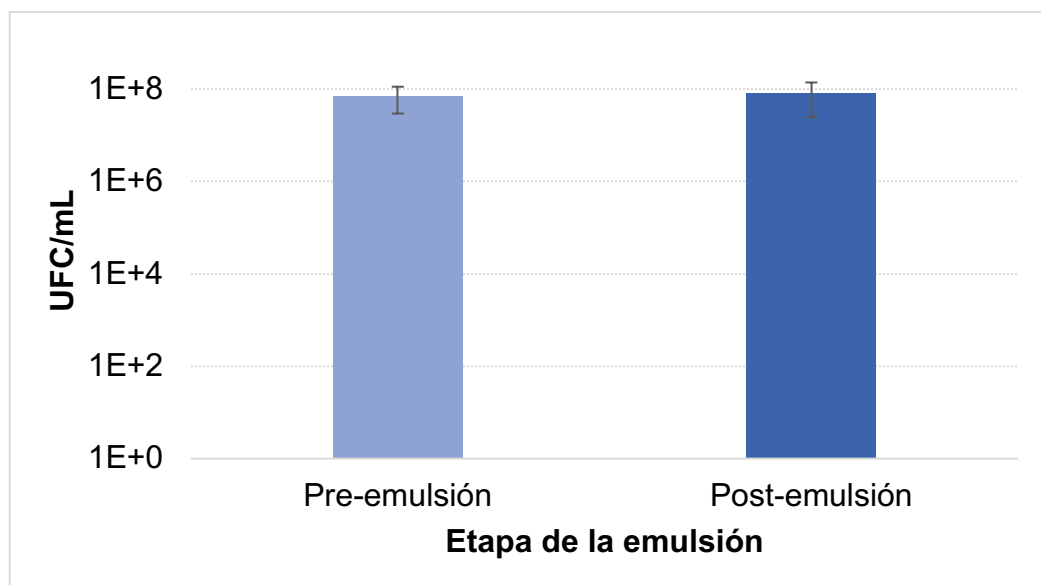


Figura 14. Recuento de UFC/mL de LG C1119 antes y después del proceso de emulsión. La bacteria se inoculó en agar MRS (24 h; 37 °C). Se utilizó el homogeneizador de mano de altas velocidades (2 min.; 12,000 RPM;) para mezclar la suspensión bacteriana, el aceite de maíz y el Tween 20. La cantidad de cultivo se mantuvo $>1 \times 10^7$ UFC/mL. Las líneas verticales en cada barra indican la desviación estándar. La prueba se realizó por cuadruplicado.

La emulsión se mantuvo estable durante el tiempo necesario para realizar la microencapsulación, pero su almacenamiento a 4 °C por 18 h produce una separación de fases como resultado del desbalance del equilibrio hidrofílico-lipofílico (*HLB*, por sus siglas en inglés) (ICI Americas Inc., 1976). Los valores de *HLB* de la fase dispersa y la fase continua deben ser cercanos para una mayor estabilidad de la emulsión.

El aceite de maíz y el Tween 20 tienen valores de *HLB* de 9 y 16.7, respectivamente (ICI Americas Inc., 1976; Silva et al., 2013). A pesar de que el emulsionante es ~84% hidrofílico, la falta de compatibilidad entre los componentes produce la floculación (Loi et al., 2019). El aceite de maíz requiere combinarse con un surfactante con un valor de *HLB* de $\sim 10 \pm 1$ para obtener una emulsión más estable en mezclas acuosas (ICI Americas Inc., 1976).

Continuando con el protocolo, se evaluó la recuperación de colonias viables de LG C1119 en las diferentes etapas del proceso de microencapsulación para determinar las diluciones seriadas que se tomarían como referencia en las siguientes pruebas (Fig. 15).

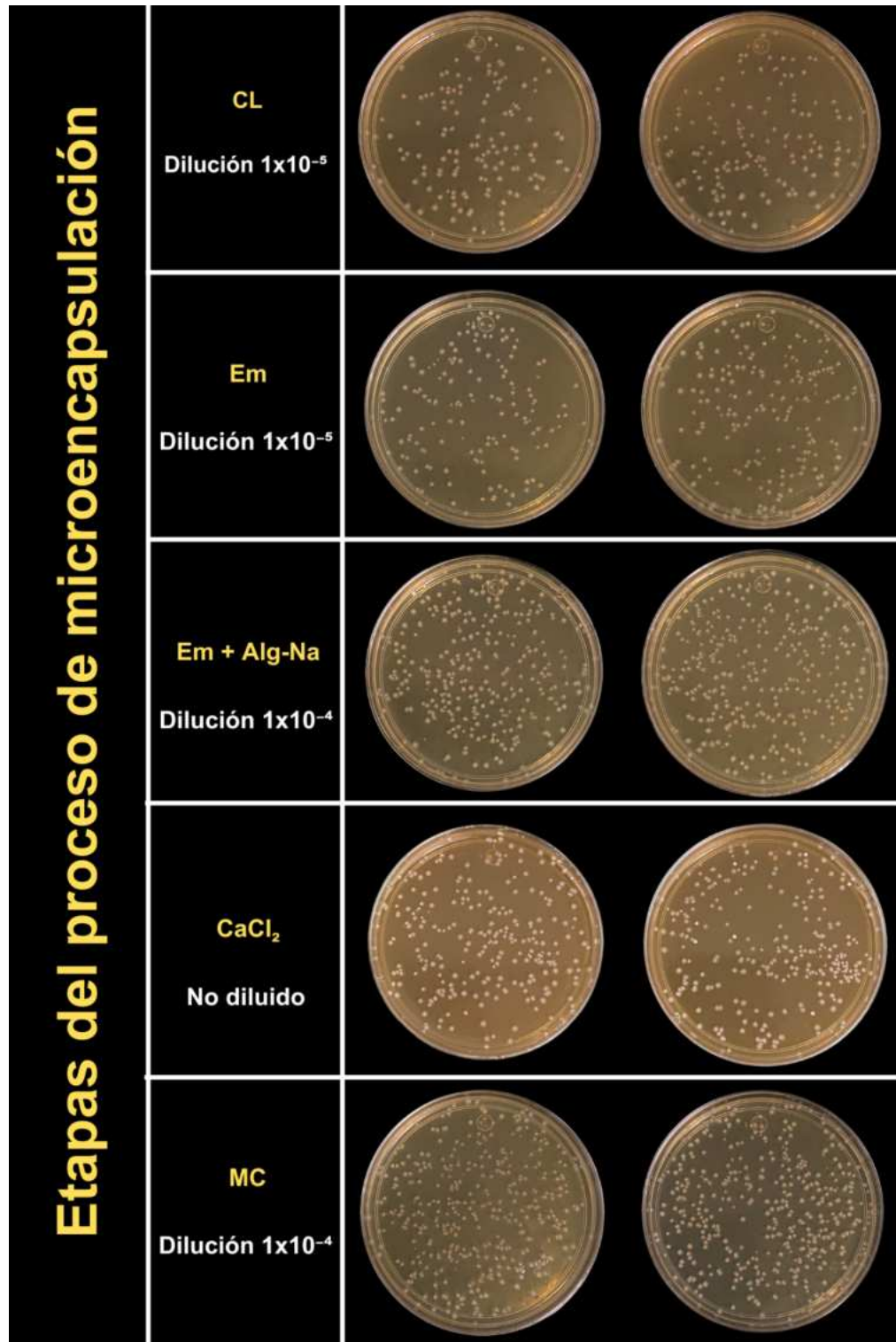


Figura 15. Crecimiento de colonias de LG C1119 en agar MRS en las etapas del proceso de microencapsulación. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C. CL, cultivo libre; Em, emulsión; Em + Alg-Na, emulsión mezclada con alginato de sodio; CaCl₂, cloruro de calcio; MC, microcápsulas. El muestreo se realizó por duplicado.

A continuación, se realizó el recuento de colonias correspondiente (Fig. 16), se calculó la eficiencia de encapsulación (Ec. 3), y las reducciones en la viabilidad celular al finalizar el proceso de microencapsulación (Ec. 4 y 5).

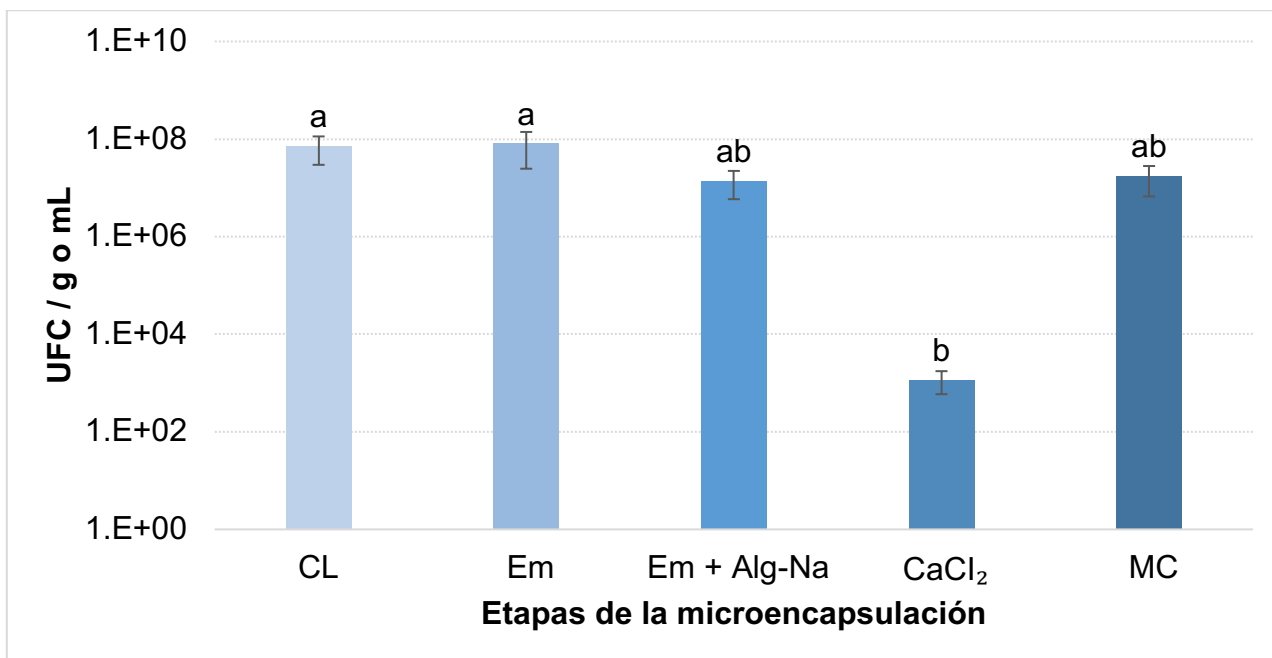


Figura 16. Recuento de UFC/mL o g recuperadas en las etapas del proceso de microencapsulación de LG C1119. Las muestras se sembraron en agar MRS (24 h; 37 °C). Los promedios de UFC calculados fueron: 7.14×10^7 (CL), 8.23×10^7 (Em), 1.40×10^7 (Em + Alg-Na), 1.17×10^3 (CaCl₂) y 1.73×10^7 (MC). CL, cultivo libre; Em, emulsión; Em + Alg-Na, emulsión mezclada con alginato de sodio; CaCl₂, cloruro de calcio; MC, microcápsulas. Las líneas verticales en cada barra indican la desviación estándar. Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$). La prueba se realizó por cuadruplicado.

Los resultados revelaron que se capturó una alta concentración de suspensión bacteriana en las microcápsulas ($>1 \times 10^7$ UFC/g), por cada 10 millones de UFC/g retenidas se pierden únicamente mil bacterias en el CaCl₂ (0.01%).

Se comparó la cantidad de UFC/mL o g recuperadas antes y después de la microencapsulación mediante otra prueba T pareada. No hubo una diferencia significativa en la carga bacteriana al finalizar la microencapsulación ($p > 0.05$), por lo tanto, el protocolo estandarizado funcionó adecuadamente.

La EE fue del $100.89 \pm 4.38\%$, por lo que el rendimiento fue óptimo a comparación de los valores reportados en trabajos publicados anteriormente (Chávarri et al., 2010; Varela-Pérez et al., 2022). En dichos casos los problemas de captura pueden deberse al uso de concentraciones mínimas de CaCl_2 (<0.1 M) durante la reticulación iónica; provocando una disminución en la porosidad de la matriz polimérica. Así mismo, el uso prolongado del equipo ultra-turrax (4000 RPM; 7.5 min.) afectó la estabilidad de la bacteria en la formación de sus emulsiones.

La cantidad de UFC/g recuperadas de las partículas aumentó un 23.63% (0.09 log) respecto a la emulsión mezclada con Alg-Na. LG C1119 es una bacteria inmóvil y su rápida precipitación en la mezcla polimérica pudo obstaculizar la distribución homogénea al momento de tomar las muestras, resultando en el incremento inusual de colonias (Madigan et al., 2022). Se sugiere probar estrategias alternativas de muestreo que contemplen la alta viscosidad de la mezcla polimérica, a pesar de que se contemplaron las recomendaciones para el análisis microbiológico de muestras semisólidas dispuestas en la NORMA Oficial Mexicana *NOM-110-SSA1-1994* (Meljem, 1994).

Los hallazgos en la microencapsulación obtenidos en esta investigación fueron el resultado de una adecuada selección de parámetros tecnológicos que determinan características como el tamaño, forma, estabilidad y EE (Choukaife et al., 2020; Łętocha et al., 2022). Estos fueron: A) concentración de la solución de Alg-Na, B) tipo de agente reticulante y su concentración, C) pH en la reticulación iónica, D) inclusión de aceite, E) inclusión de surfactante, F) tiempo de reticulación iónica, G) distancia entre la aguja y la solución reticulante y H) velocidad de agitación durante la emulsión y la reticulación iónica.

El uso de Alg-Na en una concentración al 2% (p/v) aumenta el valor de la EE ($\geq 98\%$) y mejora la supervivencia de los probióticos en pruebas de digestión simulada (Lotfipour et al., 2012; Mandal et al., 2006). El uso de concentraciones más bajas incrementa la probabilidad de obtener partículas ovoides (Chan et al., 2011). Por el contrario, emplear concentraciones más altas provoca la formación de partículas con forma de gota (Mahmoud et al., 2020).

Con respecto al tipo de agente reticulante se ha reportado que solo algunos cationes divalentes (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+}) pueden generar partículas esféricas (Chan et al., 2011).

Entre estos, el Ca^{2+} tiene la menor afinidad química hacia los grupos carboxilo (-COOH) presentes en el Alg-Na (Haug et al., 1970); esto provoca que las microcápsulas se compacten menos, su tamaño aumente y almacenen más agua durante la reticulación iónica.

La investigación desarrollada en esta tesis utilizó CaCl_2 al 2% (p/v) para lograr una EE $\geq 95\%$ (Lotfipour et al., 2012). Es una sal económica y con estatus GRAS (Łętocha et al., 2022). La solución se acidificó a pH 4.0 para formar partículas esféricas, más resistentes, de menor tamaño y mayor porosidad (Chuang et al., 2017; Kumar & Saquib, 2020; Ramdhan et al., 2019).

Es importante destacar que el efecto de la concentración del agente reticulante sobre el tamaño de partícula se somete a discusión. Por un lado se argumenta que a mayor concentración de Ca^{2+} , el tamaño de las microcápsulas y su distribución disminuyen (Choukaife et al., 2020). Por otro, se plantea que una alta concentración del catión permite que se formen más estructuras de “caja de huevos” al interior de la microcápsula y aumente su tamaño (Patil & Sawant, 2009). El aumento del Ca^{2+} disponible durante la reticulación iónica también aumenta la porosidad de la matriz polimérica y extiende la liberación del ingrediente encapsulado (Choukaife et al., 2020; Peretz et al., 2014).

El aceite de maíz y el Tween 20 se ocuparon en relación 1:1 al 2% (v/v) en esta tesis, de acuerdo con las recomendaciones de Albanese (2023). El cambio de la relación entre las cantidades de estos componentes puede anticipar la coalescencia, un proceso irreversible que provoca la separación de fases de la emulsión (Loi et al., 2019). Por otra parte, el uso de una concentración $>2\%$ puede perjudicar el rendimiento de producción de las microcápsulas (Liu et al., 2003).

Los aceites vegetales y surfactantes afectan el tamaño de partícula y su distribución al modificar la viscosidad del gel (Łętocha et al., 2022). Un aumento de concentración de estos componentes ofrece un efecto dual, pueden mejorar la estabilidad de la emulsión, reducir el tamaño de partícula y aumentar la tolerancia de las bacterias al ácido (Alnaief et al., 2011; Corcoran et al., 2007); a costa de reducir la esfericidad de las microcápsulas y prolongar su tiempo de gelificación por un retraso de la difusión de Ca^{2+} en el gelificante (Liu et al., 2003).

El aumento de viscosidad de la emulsión también amplía la distribución de tamaños de las partículas (Liu et al., 2003; Wang et al., 2005); sin embargo, la reducción o el aumento del diámetro de las microcápsulas no depende únicamente de un solo parámetro tecnológico, sino de un conjunto de los mismos.

El Tween 20 confiere a los probióticos tolerancia contra la alta presión hidrostática y evita que su membrana citoplasmática experimente la transición a una fase de gel inducida por el cambio en la presión; por lo tanto, previene un aumento en su permeabilidad, una disminución en la fluidez y el mal funcionamiento de las proteínas de membrana (Reitermayer et al., 2018).

Se utilizó un tiempo de reticulación de 35 min. en esta tesis, el cuál promueve una alta EE y protección del probiótico contra el ácido gástrico (Lotfipour et al., 2012). Además, cubre el tiempo necesario para la gelificación completa del Alg-Na (30 min.) (Reddy & Pandit, 2013).

Los efectos del tiempo de reticulación sobre las propiedades de las microcápsulas son controversiales, algunos artículos encontraron que modifica propiedades como el tamaño de partícula, la estabilidad o la EE (Choukaife et al., 2020; Gedam et al., 2018; Mali et al., 2010; Patil & Sawant, 2009). Por ejemplo, el aumento del tiempo de exposición al Ca^{2+} produce partículas con una estructura más porosa y resistente, aumenta la EE y extiende la liberación controlada del componente de interés (Pylostomou et al., 2023). Se argumenta que la disposición prolongada del catión permite que se formen más estructuras de “caja de huevos” al interior de la microcápsula y aumente su tamaño (Patil & Sawant, 2009). Por el contrario, existen reportes que concluyeron que la duración de la reticulación iónica no tuvo efectos significativos sobre las propiedades mencionadas (Lin et al., 2016; Yasmin et al., 2019).

Se utilizó una distancia de goteo de ~20 cm en esta investigación, apropiada para producir microcápsulas con un diámetro ≤ 1 mm (Ansari et al., 2017; Pourjafar et al., 2020). Se reveló anteriormente que la distancia entre la aguja y la solución reticulante influye sobre el tamaño y la forma de las microcápsulas, una menor distancia durante la extrusión permite que se formen partículas más pequeñas y esféricas (Teimouri et al., 2022).

La velocidad de agitación durante la emulsión y la reticulación iónica es el último parámetro que influye en la microencapsulación. Es posible reducir el tamaño de partícula y su distribución al elevar la velocidad de emulsión (Ahmed et al., 2013; Łętocha et al., 2022; Perumal, 2001; Zhai et al., 2013).

Una velocidad de agitación alta (e.j. ≥ 500 RPM) durante la reticulación iónica propicia la formación de microcápsulas con formas irregulares o de gota, a causa de su agregación (Lin et al., 2016); la agitación a 150 RPM corrige este inconveniente y permite obtener formas más esféricas.

El conjunto de los componentes de la formulación, sus concentraciones y las condiciones de manipulación de las microcápsulas utilizadas en este trabajo permitieron obtener resultados satisfactorios de viabilidad bacteriana y EE.

5.5. Obtención de microcápsulas multicapa cargadas con *L. gasseri*

Las interacciones Alg-Na/Quitosano y Quitosano/Eu S-100 ocurren mediante enlaces electrostáticos entre los grupos funcionales de los materiales de pared. Los aniones carboxilato ($-\text{COO}^-$) del alginato y los grupos amino ($-\text{NH}_2$) del quitosano se atraen (Bai & Wu, 2022; Hermanto et al., 2020).

El Eu S-100 tiene carga eléctrica negativa y se enlaza al quitosano de igual forma que el Alg-Na (Ansari et al., 2017). Los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) del PVA también interactúan con otra porción de grupos amino y forman el enlace NH_3^+-O^- (Chetouani et al., 2017; Ismail et al., 2017); además de enlaces intermoleculares de hidrógeno (Nathan et al., 2023).

Los sistemas de microencapsulación generados presentaron una morfología esférica y color blanco (Fig. 17A-B), se reveló que las partículas multicapa se hinchan después de almacenarlas en dH_2O por 15 h a 4 °C (Fig. 17C), y se rompen fácilmente al aplicarles presión. La cualidad de frágil no se observó en las partículas monocapa, incluso después de almacenarlas en agua por un tiempo más prolongado (72 h); al aplastarlas se aplanan pero no revientan.

La diferencia de hinchamiento surgió porque el recubrimiento de quitosano en las partículas multicapa tiene una gran capacidad de absorción de agua (Mohamad et al., 2013), además,

el PVA incrementa la retención de líquidos en los compósitos con quitosano (Ali & Gherissi, 2017); ambos materiales favorecen una hidratación rápida de la matriz polimérica.

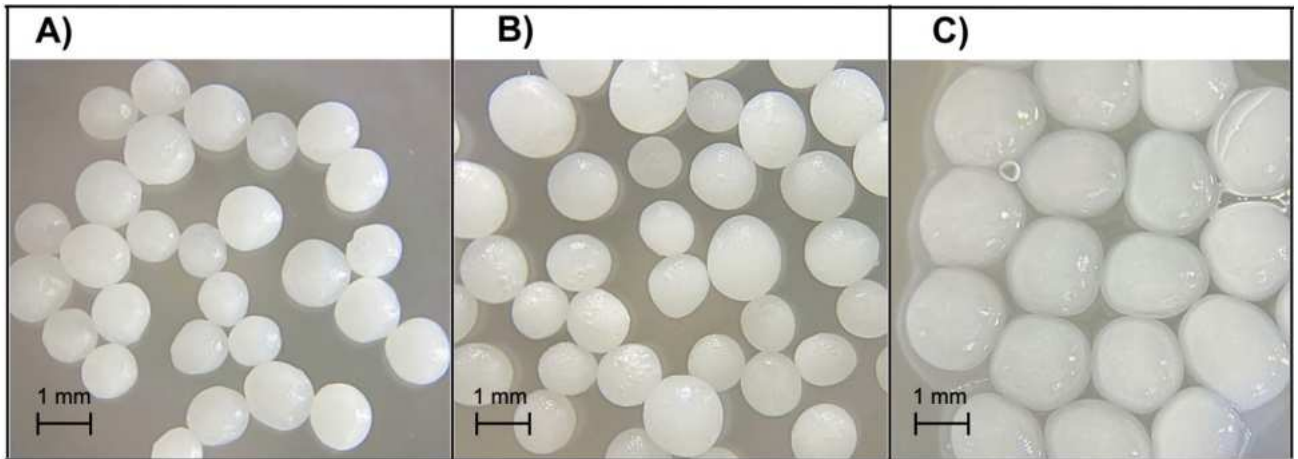


Figura 17. Comparación entre microcápsulas cargadas con LG C1119. A) Partículas monocapa (Alg-Na). B) Partículas multicapa (Alg-Na/Quitosano/Eu S-100). C) Partículas multicapa mantenidas en dH₂O (15 h; 4 °C). Las imágenes se capturaron en un estereomicroscopio (Modelo EZ4 D, Leica). Barra de escala = 1 mm.

La EE de LG C1119 se calculó en los sistemas de microencapsulación generados, los valores obtenidos fueron $94.71 \pm 7.90\%$ y $89.25 \pm 7.35\%$ para las partículas monocapa y multicapa, respectivamente. Los resultados de una prueba T no pareada indicaron que no hubo una diferencia significativa en los promedios de EE entre los tratamientos ($p > 0.05$).

La diferencia mínima de los valores de EE puede estar relacionada con el peso de las microcápsulas, el compósito retiene más agua en su estructura y disminuye la cantidad de partículas que conforman 1 g de muestra. Se especula que las microcápsulas monocapa contienen una mayor cantidad de UFC/g que las multicapa para un mismo peso.

5.6. Análisis del tamaño de partícula

Se liofilizaron lotes de microcápsulas monocapa y multicapa (Fig. 18), ambos tenían un aspecto similar en su forma hidratada (Fig. 18C). Las partículas monocapa perdieron la morfología esférica después de eliminarles el agua (Fig. 18A), el sistema multicapa conservó mejor su esfericidad y algunas partículas mostraron la característica forma de gota (Fig. 18B) (Albadran et al., 2015; Mahmoud et al., 2020).

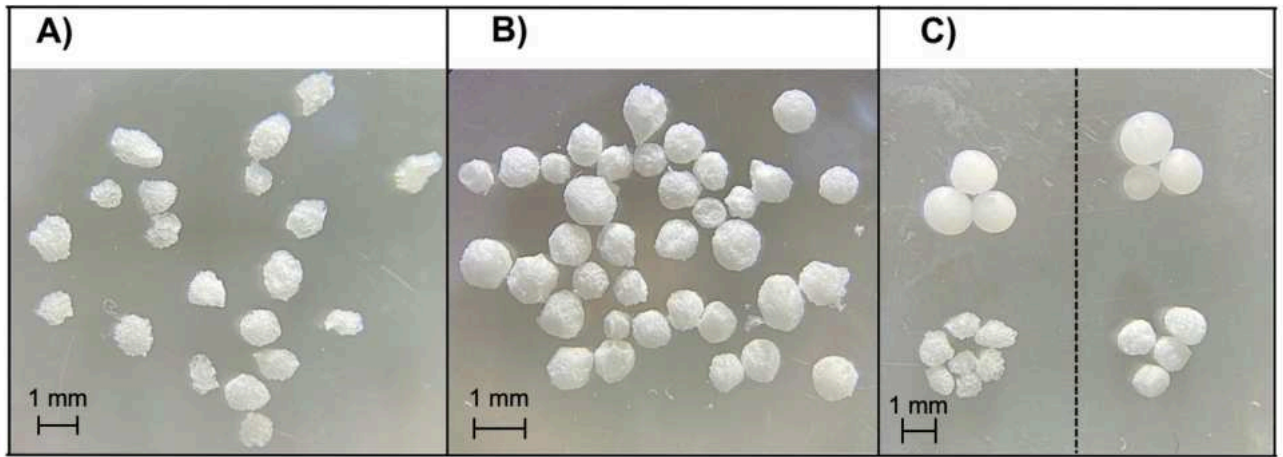


Figura 18. Fotografías de microcápsulas cargadas con LG C1119 después de ser liofilizadas. A) Microcápsulas monocapa (Alg-Na). B) Microcápsulas multicapa (Alg-Na/Quitosano/Eu S-100). C) Comparación del aspecto previo y posterior a la liofilización de las microcápsulas monocapa (panel izquierdo) y multicapa (panel derecho). Las imágenes se capturaron en un estereomicroscopio (Modelo EZ4 D, Leica). Barra de escala = 1 mm.

Las imágenes de las microcápsulas analizadas mediante *SEM* se muestran en la Fig. 19. Las partículas monocapa (Fig. 19A) tenían una forma menos esférica y una superficie más rugosa que las partículas multicapa (Fig. 19B). El cambio de aspecto después de la liofilización es común en los compósitos de Alg-Na/Quitosano (Fareez et al., 2015; Yeung et al., 2016), no obstante, el recubrimiento de Eu S-100 ayuda a conservar una textura más lisa (Ansari et al., 2017).

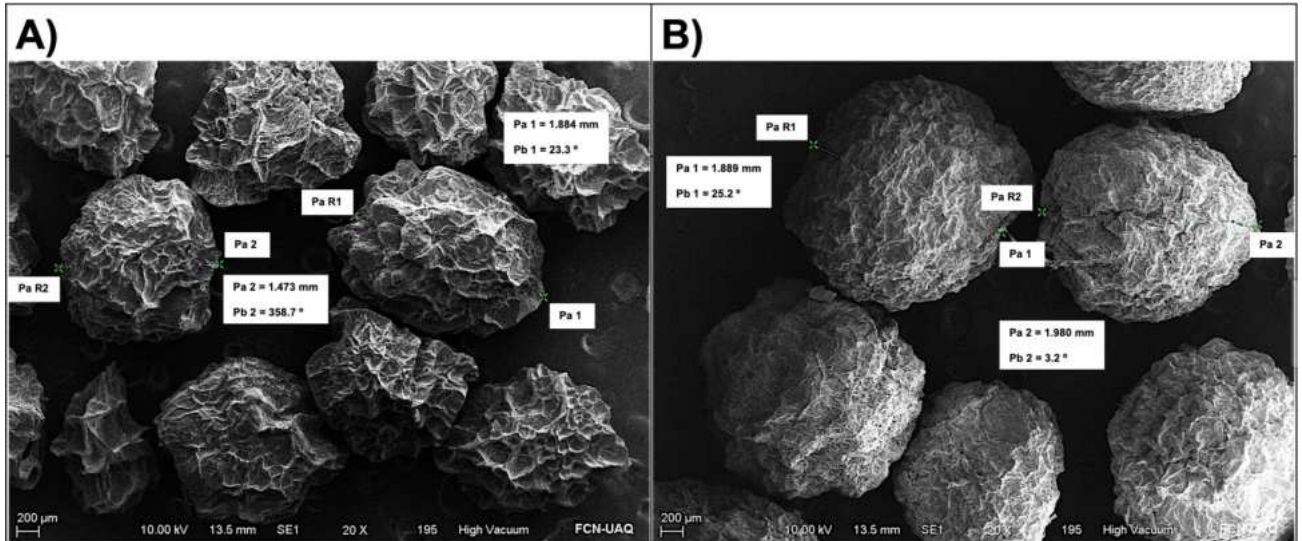


Figura 19. Micrografías de microcápsulas cargadas con LG C1119. Las muestras se liofilizaron para analizarlas mediante SEM. A) Microcápsulas monocapa (Alg-Na). B) Microcápsulas multicapa (Alg-Na/Quitosano/Eu S-100). Barra de escala = 200 µm.

El análisis del diámetro promedio reveló que las partículas multicapa eran un 48.53% más grandes que las monocapa (Fig. 20), el aumento de dimensión fue indicativo de la aplicación exitosa de las capas adicionales a través de interacciones electrostáticas entre los diferentes recubrimientos (Lee et al., 2019).

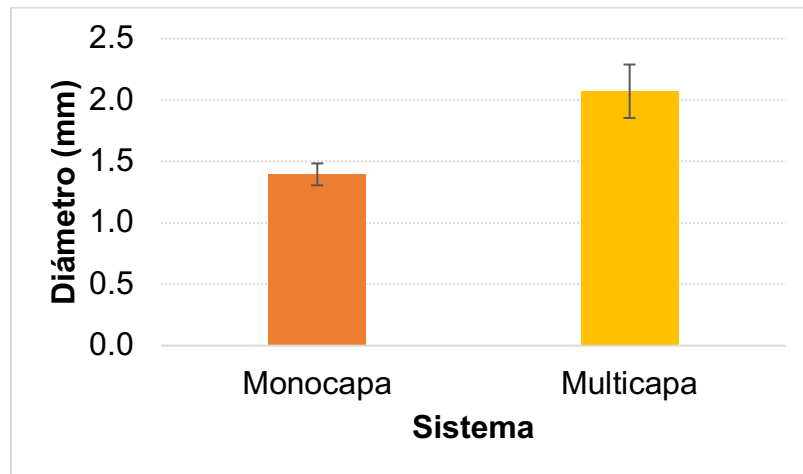


Figura 20. Diámetro de las microcápsulas cargadas con LG C1119. El promedio se calculó a partir del análisis de 100 partículas seleccionadas al azar de los sistemas monocapa y multicapa. Se obtuvieron valores de 1.395 y 2.072 mm, respectivamente. Monocapa (Alg-Na); Multicapa (Alg-Na/Quitosano/Eu S-100). Las líneas verticales en cada barra indican la desviación estándar.

Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para comparar los diámetros de los sistemas y los resultados indicaron que sus tamaños sí fueron significativamente diferentes ($p < 0.0001$), no obstante, ambas partículas presentaron una dimensión adecuada para retrasar la difusión del ácido gástrico en el gel y preservar la estabilidad de la bacteria (Ortakci & Sert, 2012).

Los tamaños de los sistemas también fueron mayores a los reportados en trabajos previos (Ansari et al., 2017; Fareez et al., 2015; Rahmati, 2019, 2020; Samat et al., 2020); en comparación con la formulación empleada en esta tesis, no incluyeron aceites ni surfactantes. El aumento en la viscosidad de la mezcla polimérica por el uso de estos componentes puede provocar la diferencia de los rangos de tamaño obtenidos respecto a dichos reportes (Łętocha et al., 2022; Wang et al., 2005). Se puede utilizar una aguja de menor grosor durante la extrusión o acortar la distancia entre la aguja y la solución reticulante si se requiere reducir el diámetro de las microcápsulas y hacerlas más esféricas (Anani et al., 2022; Rahmati, 2019, 2020; Teimouri et al., 2022).

El histograma de la distribución de tamaños de las microcápsulas se muestra en la Fig. 21, las partículas monocapa tuvieron una distribución estrecha y el 90% de la muestra se ubicó en un rango de tamaño de 1.286-1.486 mm. Por el contrario, la distribución de las partículas multicapa fue más amplia y la mayor parte de la muestra (37%) se encontró en el rango de tamaño de 1.886-2.086 mm.

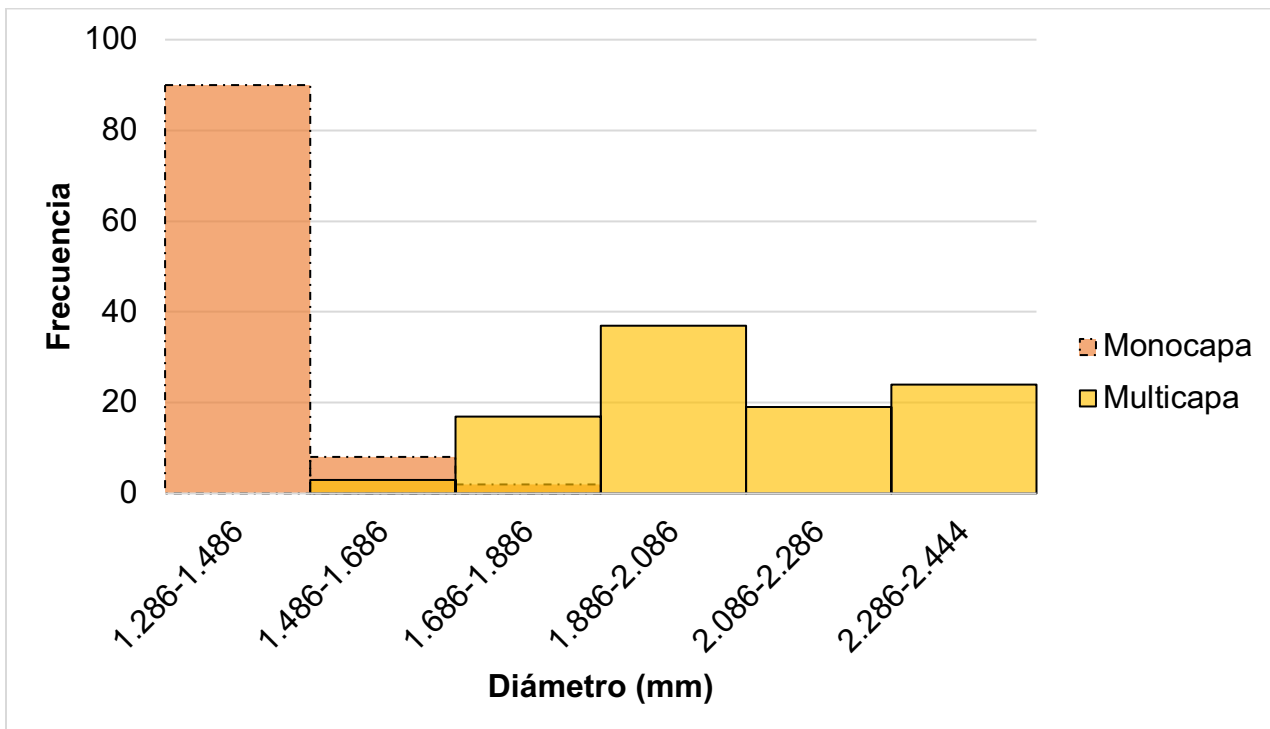


Figura 21. Distribución de tamaños de las microcápsulas cargadas con LG C1119. Se contempló el diámetro de 100 partículas seleccionadas al azar de los sistemas monocapa y multicapa. Se eligieron intervalos de 0.2 mm para evaluar la distribución de frecuencias. Se generaron 6 grupos en total. Monocapa (Alg-Na); Multicapa (Alg-Na/Quitosano/Eu S-100).

Los resultados de estas pruebas revelaron tres puntos importantes en conjunto. Primero, que la aplicación de los recubrimientos de quitosano y Eu S-100 permitió conservar una morfología más esférica y lisa en las microcápsulas de Alg-Na liofilizadas. Segundo, que estos recubrimientos incrementaron significativamente el tamaño de partícula. Tercero, que las partículas multicapa tuvieron una distribución de tamaños más amplia.

5.7. Ensayos de digestión con la bacteria libre

Brodkorb et al. (2019) publicaron en *Nature* un protocolo estandarizado para la simulación estática de la digestión en adultos. Se basa en un consenso internacional desarrollado por la red COST INFOGEST. Es un referente para evaluar la desintegración de diferentes matrices alimentarias, incluidas aquellas con probióticos (Varela-Pérez et al., 2022).

El panorama para los neonatos es distinto porque no se ha determinado un consenso sobre la simulación de su digestión. En 2018, Ménard et al. publicaron la primera aproximación hacia un protocolo de digestión estática *in vitro* de neonato. También se han publicado

diferentes modelos, principalmente para fórmulas lácteas infantiles, pero varían en las condiciones de operación y los componentes de los fluidos digestivos (Brodkorb et al., 2019; Cheong et al., 2018; de Oliveira et al., 2016; Feng et al., 2022; Lee et al., 2019; Liu et al., 2019; Mat et al., 2016; Minekus et al., 2014; Sassene et al., 2016; Wang et al., 2022; Yu et al., 2014).

El modelo de digestión diseñado en la tesis se contrasta con el modelo de adulto aprobado por COST INFOGEST en la Fig. 22. La fase oral suele omitirse en la simulación de neonatos porque únicamente degluten alimentos líquidos y el tiempo de contacto con la cavidad bucal es limitado (Bourlieu et al., 2014; Cheong et al., 2018; Liu et al., 2019; Ménard et al., 2018; Shani-Levi et al., 2017). Se estima que es de 5 a 10 s como máximo (Cheong et al., 2018; Shani-Levi et al., 2017). Sin embargo, la fase del FSS se incluyó conforme a las recomendaciones del consenso internacional de digestión de adultos (Brodkorb et al., 2019).

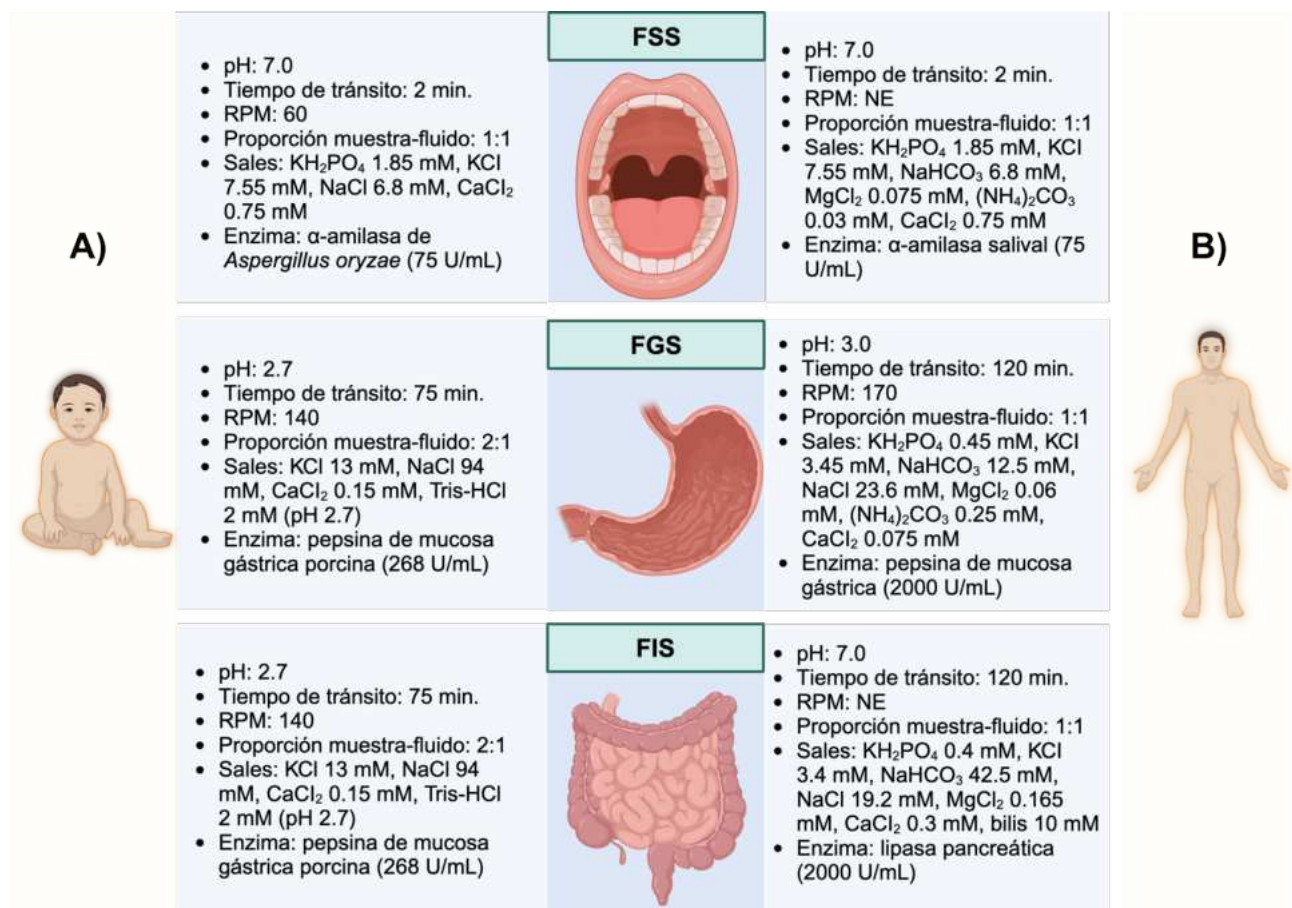


Figura 22. Modelos estáticos *in vitro* de digestión en neonatos y adultos. Ambos se componen por 3 fases: FSS, FGS y FIS. A) Neonato (Brodkorb et al., 2019; Cheong et al., 2018; de Oliveira et al., 2016; Feng et al., 2022; Lee et al., 2019; Liu et al., 2019; Mat et al., 2016; Ménard et al., 2018; Minekus et al.,

2014; Sassene et al., 2016; Wang et al., 2022; Yu et al., 2014). B) Adulto (Brodkorb et al., 2019; Liu et al., 2019; Ménard et al., 2018; Minekus et al., 2014; Varela-Pérez et al., 2022). NE, no especificado; FSS, Fluido Salival Simulado; FGS, Fluido Gástrico simulado; FIS, Fluido Intestinal.

Los recuentos de UFC/mL de LG C1119 en su forma libre en las fases de la digestión simulada se muestran en la Fig. 23. La viabilidad bacteriana se mantuvo alta en ambos tratamientos al finalizar la exposición al FSS y el FGS (E/B-, 1.57×10^6 UFC/mL; E/B+, 1.14×10^8 UFC/mL). Después del tránsito por el FIS se conservaron 1.68×10^5 UFC/mL en E/B-. La supervivencia fue del $63.75 \pm 3.71\%$, con una reducción logarítmica de 2.96 respecto al control (cultivo libre). En E/B+ hubo una pérdida total de la viabilidad bacteriana ($S = 0\%$).

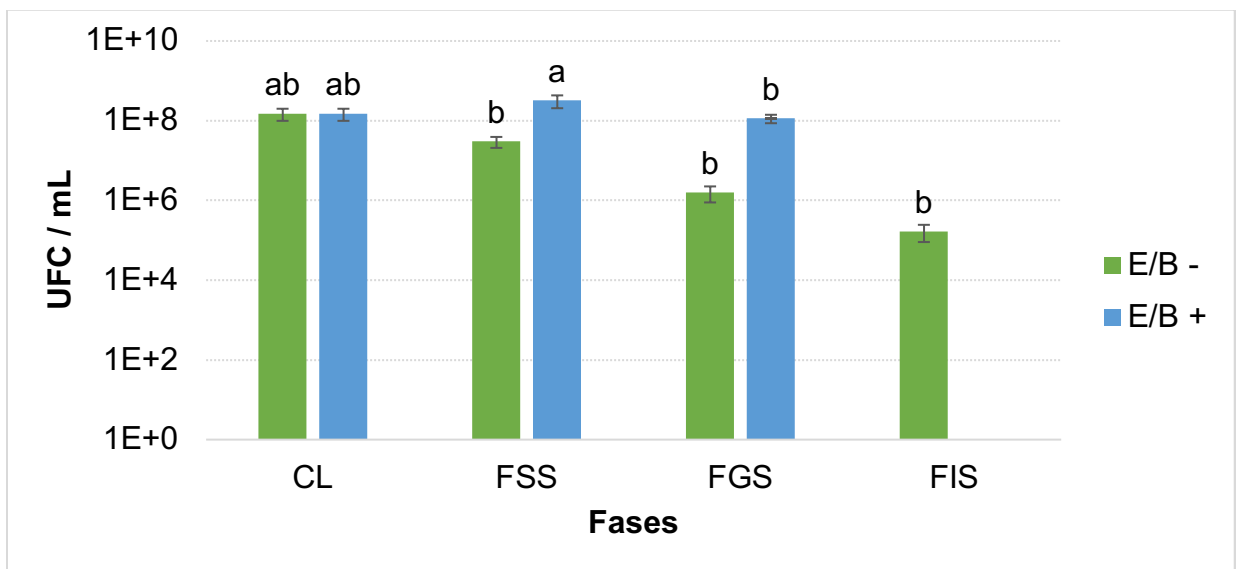


Figura 23. Recuento de colonias de LG C1119 en su forma libre expuesta al modelo estático *in vitro* de digestión de neonato. La bacteria se incubó en agar MRS (24 h; 37 °C). CL, cultivo libre; FSS, fluido salival simulado; FGS, fluido gástrico simulado; FIS, fluido intestinal simulado; E/B-, enzimas y bilis de bovino ausentes; E/B+, enzimas y bilis de bovino presentes. Las líneas verticales en cada barra indican la desviación estándar. Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$). La prueba se realizó por duplicado.

LG C1119 toleró la exposición al ácido gástrico, tiene mecanismos alcalinizantes que pueden protegerla durante su tránsito por el estómago. Por ejemplo, LGZ1029 codifica el sistema completo de la bomba de protones F_1F_0 -ATPasa (*atpA-atpH*) y dos

intercambiadores Na^+/H^+ (Wu et al., 2023); estas proteínas permiten bombear H^+ fuera de la célula para mantener un pH intracelular estable. Así mismo, sus sistemas de resistencia al ácido (e.j. descarboxilación de aminoácidos) facilitan su adaptación al FGS (Du et al., 2021; Papadimitriou et al., 2016; Romano et al., 2012; Wu et al., 2023).

El contacto de LG C1119 con las sales biliares y el colorante verde brillante en la fase entérica afectó su viabilidad bacteriana. Los posibles mecanismos antimicrobianos implicados son: la alteración de la integridad de la membrana celular, la disipación del potencial iónico transmembrana, la reducción del gradiente de pH transmembrana y el agotamiento del ATP intracelular (Chai et al., 2023). El colorante inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas fermentadoras de lactosa (de Boer, 1999).

También se plantea que la digestión lipídica dañó las células porque sus lipoproteínas de membrana contienen triacilgliceroles (O'Neal et al., 2020), las sales biliares emulsionan las gotículas de lípidos y permiten la formación de micelas en este proceso. Luego, la lipasa pancreática se ancla en la interfaz agua-aceite de estas estructuras e hidroliza los enlaces éster en las posiciones 1 a 3 de las moléculas de triacilglicerol (Chapus et al., 1988; Da Costa, 2003; Sastre et al., 2005).

5.8. Ensayos de digestión con microcápsulas monocapa y multicapa cargadas con *L. gasseri*

Los seres humanos no producen alginasa para deshacer las microcápsulas de Alg-Na (Lee & Mooney, 2012), las sales biliares que se secretan en el intestino delgado se encargan de destruirlas cuando entran en contacto con el polímero mediante un intercambio iónico del Ca^{2+} que sostiene las estructuras de “caja de huevos” por el Na^+ que está enlazado a los ácidos biliares (Giridhar & Pandit, 2013; Reddy & Pandit, 2013; K. C. G. Silva et al., 2018; Voo et al., 2015).

Los cationes divalentes son puentes de unión entre bloques G del alginato porque interactúan con hasta 2 grupos carboxilo de diferentes cadenas poliméricas (Łętocha et al., 2022), en cambio, el Na^+ puede enlazarse únicamente a uno. La sustitución del Ca^{2+} disminuye la reticulación de la microcápsula y permite que retenga más agua, el elongamiento excesivo de la matriz polimérica eventualmente provoca que reviente.

Las microcápsulas tardarán más en destruirse si se forman a partir de una solución de Alg-Na altamente concentrada o si tienen un tiempo de reticulación prolongado debido a que contendrán más iones de Ca^{2+} entrecruzados (Luca & Oroian, 2021; Rayment et al., 2009; Reddy & Pandit, 2013; Voo et al., 2015). No obstante, la aplicación de recubrimientos adicionales de quitosano o PVA puede acelerar la disolución del gel (Nathan et al., 2023).

El Alg-Na, *per se*, no interactúa electrostáticamente con las sales biliares porque carece de grupos funcionales para enlazarse a los aniones carboxilato que contienen (Murata et al., 1999). Las microcápsulas se hinchan en la fase entérica debido a que el biopolímero responde a los cambios de pH, y en consecuencia, la bilis puede infiltrarse (Giridhar & Pandit, 2013; Kumar & Saquib, 2020; Reddy & Pandit, 2013). Los grupos amino del quitosano favorecen la absorción de bilis en el caso de las microcápsulas multicapa.

En el FGS las partículas se exponen a un pH inferior al pKa del alginato (4.4), la protonación de los aniones carboxilato ($-\text{COO}^-$) de los bloques G de la matriz polimérica produce la compactación del gel por la disminución de la repulsión electrostática (Kumar & Saquib, 2020; Luca & Oroian, 2021; Rayment et al., 2009; Reddy & Pandit, 2013); este suceso disminuye la fuga de células y retrasa el contacto con el ácido gástrico.

Después, en el FIS, las microcápsulas se descomprimen y se hinchan por la infiltración de agua (Giridhar & Pandit, 2013; Rayment et al., 2009; Reddy & Pandit, 2013; Romero-Chapol et al., 2022; Varela-Pérez et al., 2022). Conforme el alginato se expone a un ambiente menos ácido ($\text{pH} > 4.4$), los grupos carboxilo ($-\text{COOH}$) se disocian, y producen aniones carboxilato y cationes hidronio (H_3O^+). La repulsión electrostática incrementa en consecuencia y provoca la expansión de la matriz polimérica.

En las pruebas de digestión de microcápsulas realizadas en este trabajo ninguno de los sistemas se deshizo, la liberación acumulada de LG C1119 después de la exposición de las partículas monocapa y multicapa a los fluidos digestivos fue de 7.50×10^1 UFC/g y 1.55×10^2 UFC/g, respectivamente.

Los informes previos donde reportaron una liberación exitosa de probióticos microencapsulados en el intestino delgado simularon la digestión de un adulto (Chun et al., 2014; Romero-Chapol et al., 2022; K. C. G. Silva et al., 2018; Varela-Pérez et al., 2022); sin

embargo, en otros trabajos requirieron usar PBS o citrato de sodio para destruir el polímero y liberar las células (Ansari et al., 2017; Chávarri et al., 2010; Jiménez-Pranteda et al., 2012; Lee et al., 2019; Lotfipour et al., 2012; Marques da Silva et al., 2018; Pourjafar et al., 2020; Rahmati, 2019, 2020).

Luca & Oroian (2021) argumentan que, aunque los diferentes modelos en estas investigaciones simulaban la fisiología gastrointestinal de un adulto, es complicado comparar los resultados obtenidos porque varían en la composición de los fluidos digestivos y las condiciones de operación.

Vega-Carranza et al. (2021) discutieron que las amilasas pueden hidrolizar los enlaces glicosídicos del Alg-Na, no obstante, en las pruebas realizadas no se observó ninguna afección estructural a las microcápsulas durante su exposición al FSS (pH 7.0; 2 min.) porque el alginato no contiene almidón que pueda ser digerido por la amilasa salival (des Gachons & Breslin, 2016).

Las partículas también resistieron la exposición al ácido gástrico (pH 2.7; 75 min.). Varela-Pérez et al. (2022) obtuvieron un resultado similar al exponer partículas de Alg-Na 3% (p/v) que contenían LG ATCC 19992 al FSS (pH 7.0; 2 min.) y el FGS (pH 3.0; 2 h). Romero-Chapol et al. (2022) tampoco observaron la degradación de sus microcápsulas después de exponerlas a ambas fases. Incluso, con un pH ≤ 2 las partículas pueden mantenerse intactas y conservar su forma esférica (Chun et al., 2014; Urbanska et al., 2007; Voo et al., 2015).

El aceite de maíz igualmente protege a los probióticos del ácido gástrico (Corcoran et al., 2007), se compone en un 25% de ácido oleico (Wrigley et al., 2016); un ácido graso que también forma parte de la membrana de las células eucariotas y procariotas (O'Neal et al., 2020). Su estructura se reduce a ácido esteárico al interactuar con iones H^+ (Ayodele, 2017). Es probable que el contenido de ácido oleico del aceite de maíz se reduzca antes que el de la bacteria durante la exposición de las microcápsulas al ácido gástrico, disminuyendo el deterioro de su membrana celular.

La digestión en la fase entérica (pH 7.0; 120 min.) tampoco fue suficiente para deshacer las microcápsulas, la falta de liberación controlada puede deberse a una incompatibilidad entre los parámetros de la microencapsulación y las condiciones de digestión del modelo. Se

plantea que, cuando las partículas se exponen a una concentración más alta de bilis, se deshacen más rápido (Łętocha et al., 2022; Voo et al., 2015).

Un neonato secreta una tercera parte de la concentración de bilis de un adulto (10 mM y 3.1 mM, respectivamente) (Fig. 22), es incapaz de digerir microcápsulas altamente reticuladas porque dispone de menos Na^+ para destruirlas en el intestino delgado.

Así mismo, se especula que las partículas obtenidas a partir de la formulación diseñada son microporosas y tienen una liberación prolongada de su contenido. La alta compactación del gel pudo retrasar el intercambio iónico indispensable para desmontar las estructuras de “caja de huevos” del Alg-Na.

Se obtuvo una mayor supervivencia de LG C1119 en el sistema monocapa en cuanto a la protección al finalizar la digestión (Fig. 24) y se reveló que no hubo una diferencia significativa en el S% entre los tratamientos mediante una prueba T no pareada ($p > 0.05$).

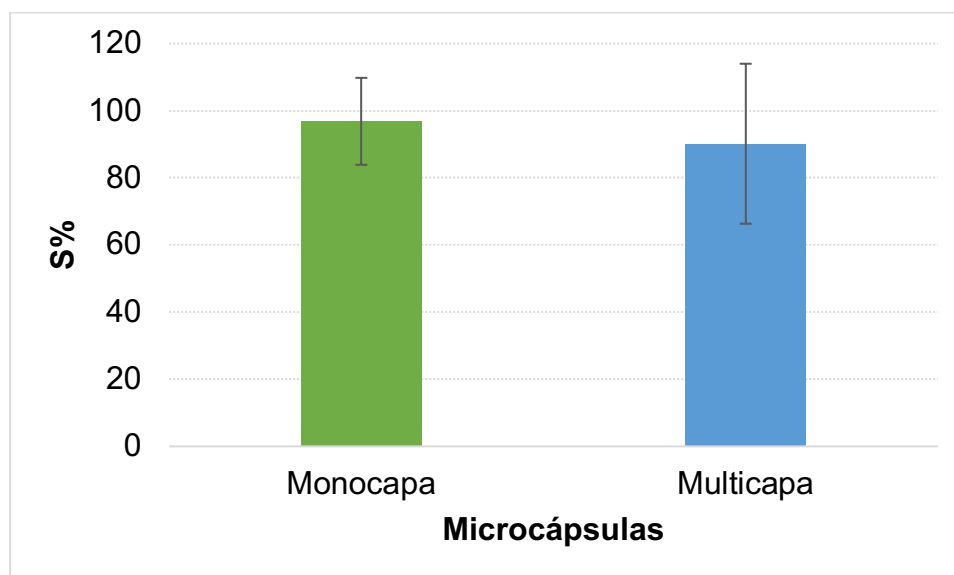


Figura 24. Supervivencia conseguida en las microcápsulas cargadas con LG C1119 al finalizar su exposición al modelo estático *in vitro* de digestión de neonato. Los promedios fueron 96.85% (Monocapa; Alg-Na) y 90.17% (Multicapa; Alg-Na/Quitosano/Eu S-100). Los recuentos de colonias se realizaron en agar MRS (24 h; 37 °C). S%; porcentaje de supervivencia. Las líneas verticales en cada barra indican la desviación estándar. La prueba se realizó por triplicado.

En las partículas monocapa y multicapa se preservaron 4.53×10^6 UFC/g y 3.97×10^6 UFC/g, respectivamente. Ambas mantuvieron una viabilidad bacteriana adecuada para productos

alimenticios (Bertazzoni et al., 2013; Yoha et al., 2021), pero la alta recuperación de colonias a partir de las microcápsulas corroboró el problema de la liberación de su contenido.

Se especula que los recubrimientos de quitosano y Eu S-100 provocaron la diferencia mínima de la supervivencia bacteriana en las microcápsulas multicapa porque anticiparon el contacto de las células con la bilis y el colorante verde brillante (Murata et al., 1999; Nathan et al., 2023). Los grupos amino del polisacárido atraen a los aniones carboxilato de los ácidos biliares y el PVA aumenta la permeabilidad de la matriz polimérica.

Los resultados de estas pruebas indicaron en conjunto que las microcápsulas monocapa y multicapa preservaron la viabilidad bacteriana de LG C1119 durante la digestión simulada de neonato en cantidades $>1 \times 10^6$ UFC/g, pero no se encontró una diferencia significativa en la supervivencia entre los sistemas; ambos ofrecieron valores $>90\%$.

Se argumenta que los recubrimientos de quitosano y Eu S-100 ejercen un efecto dual sobre la protección de los probióticos, por una parte retardan la exposición de las células al ácido gástrico; por otra, alteran la permeabilidad de las partículas y facilitan la infiltración de las sales biliares.

Las condiciones del modelo de digestión no fueron suficientes para deshacer las microcápsulas en la fase entérica, la matriz polimérica retuvo las células. Es necesario modificar las concentraciones de algunos componentes de la formulación (Alg-Na, CaCl_2) para facilitar la liberación controlada de la bacteria.

Se remarca la importancia de contemplar aquellos parámetros tecnológicos de la microencapsulación que pueden complicar la liberación controlada de los probióticos en el intestino delgado. Es indispensable encontrar un equilibrio entre las funciones de protección y liberación que ofrecen los sistemas de microencapsulación.

Los aciertos, obstáculos y áreas de oportunidad sobre la aplicación de la tecnología de microencapsulación para la liberación controlada de *L. gasseri* en el TGI de neonatos se señalan en la Fig. 25.



Figura 25. Análisis FODA sobre el protocolo de microencapsulación de LG C1119 y su liberación controlada en el modelo estático de digestión de neonato *in vitro*. F, fortalezas; O, oportunidades; D, debilidades y A, amenazas.

6. CONCLUSIONES

- 6.1.** El presente trabajo estableció las bases metodológicas para la producción de un sistema de microencapsulación multicapa de LG C1119 en una matriz polimérica compuesta por Alg-Na, quitosano y Eu S-100.
- 6.2.** Los métodos de homogeneización y gelificación iónica fueron óptimos para producir emulsiones con probióticos y obtener una excelente eficiencia de encapsulación.
- 6.3.** Los ensayos de viabilidad bacteriana durante el tránsito por el TGI simulado de neonatos mostraron que los prototipos monocapa y multicapa ofrecieron una protección adecuada al probiótico contra los factores adversos de la digestión (pH, sales biliares).
- 6.4.** Los inconvenientes en las pruebas de liberación controlada revelaron la importancia de diseñar sistemas de encapsulación que se adapten a la digestión de grupos poblacionales específicos, la fisiología gastrointestinal de los recién nacidos es diferente a la de los adultos; por lo tanto, cambia su capacidad para deshacer las partículas.
- 6.5.** Hasta el momento, esta investigación representa uno de los primeros esfuerzos para evaluar la liberación controlada de probióticos en un TGI simulado de neonatos a partir de micropartículas de Alg-Na. Esta estrategia innovadora de administración de probióticos tiene un gran potencial para solventar la interrupción de transferencia de microbiota intestinal durante la lactancia materna.

7. PERSPECTIVAS

Se sugiere implementar algunas modificaciones en la metodología para futuras investigaciones y realizar nuevos experimentos.

- 7.1. Pruebas de producción de bacteriocinas: sembrar a LG C1119 en agar MRS en lugar de TSA-ye para que crezca adecuadamente. También, incrementar las cantidades inoculadas en las placas (50, 75, 100, 150 μ L) para mejorar la acción antimicrobiana contra los patógenos (Jurado-Gómez et al., 2016b). Por último, inocular el agar BHI con alícuotas (100 μ L) de los cultivos de *L. monocytogenes* C1208 o *S. enterica* C827 que estén ajustados a escala McFarland 0.5 (1.50×10^8 UFC/mL).
- 7.2. Producción de microcápsulas: disminuir la concentración de las soluciones de Alg-Na y/o CaCl_2 , además de acortar el tiempo de reticulación iónica. Esto puede acelerar la desestabilización del polímero durante el intercambio iónico de Ca^{2+} por Na^+ en la fase del FIS y anticipar la liberación de células en el modelo de digestión (Choukaife et al., 2020). También se propone sustituir el Tween 20 por Tween 80 para aumentar aún más la protección contra el ácido gástrico (Corcoran et al., 2007). El reemplazo del aceite de maíz por el de oliva igualmente mejoraría la estabilidad bacteriana porque tiene un mayor contenido de ácido oleico (72%) (Wrigley et al., 2016).
- 7.3. Pruebas de vida de anaquel: evaluar la viabilidad bacteriana de LG C1119 en las microcápsulas almacenadas durante diferentes intervalos de tiempo (7, 14, 21, 30 días) a diferentes temperaturas (4, 25, 37 $^{\circ}\text{C}$) (Luca & Oroian, 2021; Vega-Carranza et al., 2021). Se propone utilizar las partículas en su forma hidratada y liofilizada para determinar modificaciones en la supervivencia (Lee et al., 2019).

8. REFERENCIAS

- Ahmed, M. M., El-Rasoul, S. A., Auda, S. H., & Ibrahim, M. A. (2013). Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ*, 21(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.08.004>
- Albadran, H. A., Chatzifragkou, A., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2015). Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 74, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.016>
- Albanese, J. (2023). *The Cosmetic Chemist*. http://www.thecosmeticchemist.com/education/formulation_science/introduction_to_the_hlb_system.html
- Ali, M., & Gherissi, A. (2017). Synthesis and Characterization of the Composite Material PVA/Chitosan/5% Sorbitol with Different Ratio of Chitosan. *International Journal of Mechanical & Mechatronics Engineering*.
- Alnaief, M., Alzaitoun, M. A., García-González, C. A., & Smirnova, I. (2011). Preparation of biodegradable nanoporous microspherical aerogel based on alginate. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 1011–1018. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.060>
- Al-Yami, A. M., Al-Mousa, A. T., Al-Otaibi, S. A., & Khalifa, A. Y. (2022). *Lactobacillus* Species as Probiotics: Isolation Sources and Health Benefits. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(4), 2270–2291. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.4.19>
- Anani, J., Noby, H., Zkria, A., Yoshitake, T., & Elkady, M. (2022). Monothetic Analysis and Response Surface Methodology Optimization of Calcium Alginate Microcapsules Characteristics. *Polymers 2022, Vol. 14, Page 709*, 14(4), 709. <https://doi.org/10.3390/POLYM14040709>
- 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, 144. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0442-x>
- Arakawa, K., Matsunaga, K., Takihiro, S., Moritoki, A., Ryuto, S., Kawai, Y., Masuda, T., & Miyamoto, T. (2015). *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1593–1603. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8860>

- Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*, 13(19), 3256. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>
- Ayodele, O. B. (2017). Influence of oxalate ligand functionalization on Co/ZSM-5 activity in Fischer Tropsch synthesis and hydrodeoxygenation of oleic acid into hydrocarbon fuels. *Scientific Reports*, 7(1), 10008. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09706-z>
- Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E., Yong, J. G., Tallon, R., Sanozky-Dawes, R. B., Pfeiler, E. A., O'Flaherty, S., Buck, B. L., Dobson, A., Duong, T., Miller, M. J., Barrangou, R., & Klaenhammer, T. R. (2008). Analysis of the Genome Sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 Reveals the Molecular Basis of an Autochthonous Intestinal Organism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4610. <https://doi.org/10.1128/AEM.00054-08>
- Baltova, K., & Dimitrov, Z. (2014). Probiotic and cultural characteristic of strain *Lactobacillus gasseri* 4/13 of human origin. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 28(6), 1084–1088. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.974303>
- Barbosa, J. A. C., Al-Kauraiishi, 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>
- Bayryamov, S. G. (2020). *Microencapsulation of natural oils by a coacervation technique using gelatin as shell material*. 5. https://dl.uctm.edu/journal/node/j2020-6/2_19-52_p_1985-1989.pdf
- Beade, A., & García, C. (2024, June 14). *El embarazo. La espera tiene un costo* | Procuraduría Federal del Consumidor | Gobierno | [gob.mx](https://www.gob.mx/profeco/articulos/el-embarazo-la-espera-tiene-un-costo-34555?idiom=es#). Procuraduría Federal Del Consumidor. <https://www.gob.mx/profeco/articulos/el-embarazo-la-espera-tiene-un-costo-34555?idiom=es#>
- Bertazzoni, E., Donelli, G., Midtvedt, T., Nicoli, J., & Sanz, Y. (2013). Probiotics and clinical effects: is the number what counts? *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)*, 25(4), 194–212. <https://doi.org/10.1179/1973947813Y.0000000078>
- Bourlieu, C., Ménard, O., Bouzerzour, K., Mandalari, G., Macierzanka, A., Mackie, A. R., & Dupont, D. (2014). Specificity of Infant Digestive Conditions: Some Clues for Developing Relevant In Vitro Models. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(11), 1427–1457. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.640757>

- Brignone, S. G., Ravetti, S., & Palma, S. D. (2020). *Microencapsulación/ recubrimiento de sistemas particulados de uso farmacéutico*.
<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/143385>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Bron, P. A., Grangette, C., Mercenier, A., De Vos, W. M., & Kleerebezem, M. (2004). Identification of *Lactobacillus plantarum* Genes That Are Induced in the Gastrointestinal Tract of Mice. *Journal of Bacteriology*, 186(17), 5721.
<https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5721-5729.2004>
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>
- Burke, R., Kelly Alan, Lavelle Christophe, & This vo Kientza, H. (2021). *Handbook of molecular gastronomy: Scientific Foundations, Educational Practices, and Culinary Applications* (Vol. 1). Taylor & Francis Group.
- Carroll, I. M., Andrus, J. M., Bruno-Bárcena, J. M., Klaenhammer, T. R., Hassan, H. M., & Threadgill, D. S. (2007). Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(4), G729–G738. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00132.2007>
- Chai, L.-N. ; Wu, H. ; Wang, X.-J. ; He, L.-J. ; Guo, C.-F., Martinez-Rodriguez, J., Chai, L.-N., Wu, H., Wang, X.-J., He, L.-J., & Guo, C.-F. (2023). The Mechanism of Antimicrobial Activity of Conjugated Bile Acids against Lactic Acid Bacilli. *Microorganisms 2023, Vol. 11, Page 1823, 11(7)*, 1823.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11071823>
- Chan, E.-S., Lim, T.-K., Voo, W.-P., Pogaku, R., Tey, B. T., & Zhang, Z. (2011). Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness. *Particuology*, 9(3), 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2010.12.002>
- Chapus, C., Rovey, M., Sarda, L., & Verger, R. (1988). Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie*, 70(9), 1223–1233. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90188-5](https://doi.org/10.1016/0300-9084(88)90188-5)

- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & Villarán, M. del C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *142*(1–2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022>
- Chen, S., Cao, Y., Ferguson, L. R., Shu, Q., & Garg, S. (2013). Evaluation of mucoadhesive coatings of chitosan and thiolated chitosan for the colonic delivery of microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Microencapsulation*, *30*(2), 103–115. <https://doi.org/10.3109/02652048.2012.700959>
- Cheong, L.-Z., Jiang, C., He, X., Song, S., & Lai, O.-M. (2018). Lipid Profiling, Particle Size Determination, and in Vitro Simulated Gastrointestinal Lipolysis of Mature Human Milk and Infant Formula. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(45), 12042–12050. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03998>
- Chetouani, A., Elkolli, M., Bounekhel, M., & Benachour, D. (2017). Chitosan/oxidized pectin/PVA blend film: mechanical and biological properties. *Polymer Bulletin*, *74*(10), 4297–4310. <https://doi.org/10.1007/S00289-017-1953-Y/METRICS>
- Choukaife, H., Doolaanea, A. A., & Alfatama, M. (2020). Alginate Nanoformulation: Influence of Process and Selected Variables. *Pharmaceuticals*, *13*(11), 335. <https://doi.org/10.3390/ph13110335>
- Chuang, J.-J., Huang, Y.-Y., Lo, S.-H., Hsu, T.-F., Huang, W.-Y., Huang, S.-L., & Lin, Y.-S. (2017). Effects of pH on the Shape of Alginate Particles and Its Release Behavior. *International Journal of Polymer Science*, *2017*, e3902704. <https://doi.org/10.1155/2017/3902704>
- Chun, H., Kim, C.-H., & Cho, Y.-H. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* DKL 109 using External Ionic Gelation Method. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *34*(5), 692–699. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.5.692>
- Cook, M. T., Saratoon, T., Tzortzis, G., Edwards, A., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2013). CLSM Method for the Dynamic Observation of pH Change within Polymer Matrices for Oral Delivery. *Biomacromolecules*, *14*(2), 387–393. <https://doi.org/10.1021/bm301569r>
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *162*(1), 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>

- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2007). Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. *Microbiology*, 153(1), 291–299. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28966-0>
- Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 429. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003>
- Da Costa, T. H. M. (2003). FATS | Digestion, Absorption, and Transport. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2274–2278. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00443-0>
- Damián, M. R., Cortes-Perez, N. G., Quintana, E. T., Ortiz-Moreno, A., Noguez, C. G., Cruceño-Casarrubias, C. E., Pardo, M. E. S., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2022). Functional Foods, Nutraceuticals and Probiotics: A Focus on Human Health. *Microorganisms 2022, Vol. 10, Page 1065, 10(5)*, 1065. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10051065>
- de Boer, E. (1999). Enterobacteriaceae, coliforms and E. coli | Classical and Modern Methods for Detection/Enumeration. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 610–617. <https://doi.org/10.1006/RWFM.1999.0515>
- de Oliveira, S. C., Deglaire, A., Ménard, O., Bellanger, A., Rousseau, F., Henry, G., Dirson, E., Carrière, F., Dupont, D., & Bourlieu, C. (2016). Holder pasteurization impacts the proteolysis, lipolysis and disintegration of human milk under in vitro dynamic term newborn digestion. *Food Research International*, 88, 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.022>
- Dempsey, E., & Corr, S. C. (2022). Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Frontiers in Immunology*, 13, 840245. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.840245/BIBTEX>
- Denou, E., Pridmore, R. D., Berger, B., Panoff, J. M., Arigoni, F., & Brüssow, H. (2008). Identification of Genes Associated with the Long-Gut-Persistence Phenotype of the Probiotic Lactobacillus johnsonii Strain NCC533 Using a Combination of Genomics and Transcriptome Analysis. *Journal of Bacteriology*, 190(9), 3161. <https://doi.org/10.1128/JB.01637-07>
- Ding, W. k., & Shah, N. p. (2009). Effect of Homogenization Techniques on Reducing the Size of Microcapsules and the Survival of Probiotic Bacteria Therein. *Journal of Food Science*, 74(6), M231–M236. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01195.x>

- Du, C., Huo, X., Gu, H., Wu, D., & Hu, Y. (2021). Acid resistance system CadBA is implicated in acid tolerance and biofilm formation and is identified as a new virulence factor of *Edwardsiella tarda*. *Veterinary Research*, 52(1), 117. <https://doi.org/10.1186/S13567-021-00987-X>
- FAO, & WHO. (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*.
- Fareez, I. M., Lim, S. M., Mishra, R. K., & Ramasamy, K. (2015). Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1419–1428. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.054>
- Feng, L., Ye, W., Zhang, K., Qu, D., Liu, W., Wu, M., & Han, J. (2022). In vitro Digestion Characteristics of Hydrolyzed Infant Formula and Its Effects on the Growth and Development in Mice. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.912207>
- Ferreira, C. L., Grześkowiak, L., Collado, M. C., & Salminen, S. (2011). In vitro evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens. *Journal of Food Protection*, 74(9), 1482–1487. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-074>
- Francl, A. L., Thongaram, T., & Miller, M. J. (2010). The PTS transporters of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323. *BMC Microbiology*, 10(1), 77. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-77>
- 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://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081004111000157>
- Galindo-Sevilla, N. del C., Contreras-Carretero, N. A., Rojas-Bernabé, A., & Mancilla-Ramírez, J. (2021). Lactancia materna y COVID-19. *Gaceta de México*, 157(2), 5436. <https://doi.org/10.24875/GMM.20000665>
- Garcia-Gutierrez, E., O'Connor, P. M., Colquhoun, I. J., Vior, N. M., Rodríguez, J. M., Mayer, M. J., Cotter, P. D., & Narbad, A. (2020). Production of multiple bacteriocins, including the novel bacteriocin gassericin M, by *Lactobacillus gasseri* LM19, a strain isolated from human milk. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(9), 3869–3884. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10493-3/FIGURES/6>

- Gawkowska, D., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2018). Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review. *Polymers*, 10(7).
<https://doi.org/10.3390/POLYM10070762>
- Gedam, S., Jadhav, P., Talele, S., & Jadhav, A. (2018). Effect of crosslinking agent on development of gastroretentive mucoadhesive microspheres of risedronate sodium. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 133–140.
<https://doi.org/10.22159/ijap.2018v10i4.26071>
- Giridhar, R. S., & Pandit, A. S. (2013). Effect of Curing Agent on Sodium Alginate Blends Using Barium Chloride as Crosslinking Agent and Study of Swelling, Thermal, and Morphological Properties. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62(14), 743–748. <https://doi.org/10.1080/00914037.2013.769236>
- Grand View Research. (2023). *Probiotics Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Probiotic Food & Beverages, Probiotic Dietary Supplements), By Ingredient (Bacteria, Yeast), By End Use, By Distribution Channel, And Segment Forecasts, 2021-2030*. Probiotics Market Size, Share & Growth Analysis Report 2030.
<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/probiotics-market>
- Gul, S. ;, Durante-Mangoni, E., Gul, S., & Durante-Mangoni, E. (2024). Unraveling the Puzzle: Health Benefits of Probiotics—A Comprehensive Review. *Journal of Clinical Medicine 2024, Vol. 13, Page 1436, 13(5)*, 1436.
<https://doi.org/10.3390/JCM13051436>
- Guo, H., Zhou, Y., Xie, Q., Chen, H., En Zhang, M. ', Yu, L., Yan, G., Chen, Y., Lin, X., Zhang, Y., & Hong, Z. (2024). Protective Effects of Laminaria japonica Polysaccharide Composite Microcapsules on the Survival of Lactobacillus plantarum during Simulated Gastrointestinal Digestion and Heat Treatment. *Marine Drugs 2024, Vol. 22, Page 308, 22(7)*, 308. <https://doi.org/10.3390/MD22070308>
- Han, S., Lu, Y., Xie, J., Fei, Y., Zheng, G., Wang, Z., Liu, J., Lv, L., Ling, Z., Berglund, B., Yao, M., & Li, L. (2021). Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 609722. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.609722/BIBTEX>
- Haug, A., Smidsrød, O., Högdahl, B., Øye, H. A., Rasmussen, S. E., Sunde, E., & Sørensen, N. A. (1970). Selectivity of Some Anionic Polymers for Divalent Metal Ions. *Acta Chemica Scandinavica*, 24, 843–854.
<https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.24-0843>

- 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., Barin, J. S., Moraes Flores, É. M., Muller, E. I., Codevilla, C. F., Jacob-Lopes, E., Ferreira Grosso, C. R., & de Menezes, C. R. (2017). Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT - Food Science and Technology*, *76*, 216–221.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.013>
- Houghteling, P. D., & Walker, W. A. (2015). Why is initial bacterial colonization of the intestine important to the infant's and child's health? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *60*(3), 294.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000597>
- Hu, P.-L., Yuan, Y.-H., Yue, T.-L., & Guo, C.-F. (2018). Bile acid patterns in commercially available oxgall powders used for the evaluation of the bile tolerance ability of potential probiotics. *PLOS ONE*, *13*(3), e0192964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192964>
- Hua, S. (2020). Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 524.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00524>
- ICI Americas Inc. (1976). *The HLB SYSTEM a time-saving guide to emulsifier selection*.
- Ismail, A. S., Darwish, M. S. A., & Ismail, E. A. (2017). Synthesis and characterization of hydrophilic chitosan-polyvinyl acetate blends and their sorption performance in binary methanol–water mixture. *Egyptian Journal of Petroleum*, *26*(1), 17–22.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPE.2016.02.006>
- Jeyakumari A, Zynudheen AA, & Parvathy U. (2016). Microencapsulation of bioactive food ingredients and controlled release-a review. *MOJ Food Processing & Technology*, *Volume 2*(Issue 6). <https://doi.org/10.15406/MOJFPT.2016.02.00059>
- Jiménez-Pranteda, M. L., Poncelet, D., Náder-Macías, M. E., Arcos, A., Aguilera, M., Monteoliva-Sánchez, M., & Ramos-Cormenzana, A. (2012). Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *113*(2), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.10.010>

- Jitpakdee, J., Kantachote, D., Kanzaki, H., & Nitoda, T. (2022). Potential of lactic acid bacteria to produce functional fermented whey beverage with putative health promoting attributes. *LWT*, *160*, 113269. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113269>
- Jurado-Gámez, H., Martínez-Benavides, J., Romero-Benavides, D. A., Morillo-Garcés, J. A., Orbes-Villacorte, A. E., & Mesías-Pantoja, L. N. (2016a). Cinética de fermentación, pruebas de desafío in vitro y efecto de inhibición de *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992. *Veterinaria y Zootecnia*, *10*(2), 72–89.
- Jurado-Gámez, H. A., Romero-Benavides, D. A., & Morillo-Garces, J. A. (2016b). Inhibición de *Lactobacillus gasseri* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* bajo condiciones in vitro. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, *63*(2), 95–112. <https://doi.org/10.15446/RFMVZ.V63N2.59357>
- Kawano, M., Miyoshi, M., Ogawa, A., Sakai, F., & Kadooka, Y. (2016). *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet. *Journal of Nutritional Science*, *5*, e23. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.12>
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, *13*(1), 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
- Kumar, A., & Saquib, H. (2020). *Alginates in Drug Delivery*. Academic Press.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, *37*(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2011.06.003>
- Lee, Y., Ji, Y. R., Lee, S., Choi, M.-J., & Cho, Y. (2019). Microencapsulation of Probiotic *Lactobacillus acidophilus* KBL409 by Extrusion Technology to Enhance Survival under Simulated Intestinal and Freeze-Drying Conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(5), 721–730. <https://doi.org/10.4014/jmb.1903.03018>
- Łętocha, A., Miastkowska, M., & Sikora, E. (2022). Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Polymers*, *14*(18), 3834. <https://doi.org/10.3390/polym14183834>
- Lin, S.-F., Chen, Y.-C., Chen, R.-N., Chen, L.-C., Ho, H.-O., Tsung, Y.-H., Sheu, M.-T., & Liu, D.-Z. (2016). Improving the Stability of Astaxanthin by Microencapsulation in Calcium Alginate Beads. *PLOS ONE*, *11*(4), e0153685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153685>

- Liu, W., Ye, A., Han, F., & Han, J. (2019). Advances and challenges in liposome digestion: Surface interaction, biological fate, and GIT modeling. *Advances in Colloid and Interface Science*, 263, 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.007>
- Liu, X. D., Bao, D. C., Xue, W. M., Xiong, Y., Yu, W. T., Yu, X. J., Ma, X. J., & Yuan, Q. (2003). Preparation of uniform calcium alginate gel beads by membrane emulsification coupled with internal gelation. *Journal of Applied Polymer Science*, 87(5), 848–852. <https://doi.org/10.1002/app.11537>
- Loi, C. C., Eyres, G. T., & Birch, E. J. (2019). Protein-Stabilised Emulsions. In L. Melton, F. Shahidi, & P. Varelis (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 404–409). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965224906>
- Lorca, G. L., Barabote, R. D., Zlotopolski, V., Tran, C., Winnen, B., Hvorup, R. N., Stonestrom, A. J., Nguyen, E., Huang, L.-W., Kim, D. S., & Saier, M. H. (2007). Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(6), 1342–1366. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.02.007>
- Lotfipour, F., Mirzaeei, S., & Maghsoodi, M. (2012). Evaluation of the effect of CaCl₂ and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of Lactobacillus acidophilus loaded alginate beads using response surface analysis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2(1), 71–78. <https://doi.org/10.5681/apb.2012.010>
- Louis, E. K. St., Frey, L. C., Britton, J. W., Frey, L. C., Hopp, J. L., Korb, P., Koubeissi, M. Z., Lievens, W. E., Pestana-Knight, E. M., & Louis, E. K. St. (2016). *The Developmental EEG: Premature, Neonatal, Infant, and Children*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK390356/>
- Luca, L., & Oroian, M. (2021). Influence of Different Prebiotics on Viability of Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum and Lactobacillus rhamnosus Encapsulated in Alginate Microcapsules. *Foods*, 10(4), 710. <https://doi.org/10.3390/foods10040710>
- Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, W. M., & Stahl, D. (2022). *BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS* (16th ed.). Pearson Education Limited.
- Mahboubi, M. (2019). Lactobacillus gasseri as a Functional Food and Its Role in Obesity. *International Journal of Medical Reviews*, 6(2), 59–64. <https://doi.org/10.29252/IJMR-060206>
- Mahmoud, M., Abdallah, N. A., El-Shafei, K., Tawfik, N. F., & El-Sayed, H. S. (2020). Survivability of alginate-microencapsulated Lactobacillus plantarum during storage,

- simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Heliyon*, 6(3), e03541.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03541>
- Mali, K., Dias, R., Ghorpade, V., & Havaladar, V. (2010). Sodium alginate microspheres containing multicomponent inclusion complex of domperidone. *Latin American Journal of Pharmacy*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Sodium-alginate-microspheres-containing-inclusion-Mali-Dias/310e3ad0346a2b6415d0429b372cf8eac77dddfb>
- Mandal, S., Puniya, A. K., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16(10), 1190–1195. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.005>
- Marques da Silva, T., Jacob Lopes, E., Codevilla, C. F., Cichoski, A. J., Flores, É. M. de M., Motta, M. H., da Silva, C. de B., Grosso, C. R. F., & de Menezes, C. R. (2018). Development and characterization of microcapsules containing *Bifidobacterium Bb-12* produced by complex coacervation followed by freeze drying. *LWT*, 90, 412–417. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.057>
- Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R. del, Fernández, L., Rodríguez, J. M., & Jiménez, E. (2012). Sharing of Bacterial Strains Between Breast Milk and Infant Feces. *Journal of Human Lactation*, 28(1), 36–44. <https://doi.org/10.1177/0890334411424729>
- Martínez-Cano, B., Mendoza-Meneses, C. J., García-Trejo, J. F., Macías-Bobadilla, G., Aguirre-Becerra, H., Soto-Zarazúa, G. M., & Feregrino-Pérez, A. A. (2022). Review and Perspectives of the Use of Alginate as a Polymer Matrix for Microorganisms Applied in Agro-Industry. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(13), 4248. <https://doi.org/10.3390/molecules27134248>
- Mat, D. J. L., Le Feunteun, S., Michon, C., & Souchon, I. (2016). In vitro digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids. *Food Research International*, 88, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.002>
- Matsuda, Y., Cho, O., Sugita, T., Ogishima, D., & Takeda, S. (2018). Culture Supernatants of *Lactobacillus gasseri* and *L. crispatus* Inhibit *Candida albicans* Biofilm Formation and Adhesion to HeLa Cells. *Mycopathologia*, 183(4), 691–700. <https://doi.org/10.1007/s11046-018-0259-4>
- Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., & Rotondo, J. C. (2023). Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/CELLS12010184>

- Meljem Moctezuma, J. (1994). *NORMA Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*. <https://www.fao.org/faolex/results/details/es/c/LEX-FAOC013544/>
- Ménard, O., Bourlieu, C., De Oliveira, S. C., Dellarosa, N., Laghi, L., Carrière, F., Capozzi, F., Dupont, D., & Deglaire, A. (2018). A first step towards a consensus static in vitro model for simulating full-term infant digestion. *Food Chemistry*, *240*, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.145>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, *5*(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Mohamad, N., Nor Nadiah, A. H., Jeefferie, A. R., & Mohd Fairuz, D. (2013). Effect of chitosan gelatinization temperature on water absorption and water retention of chitosan based urea fertilizer. *International Journal of Automotive and Mechanical Engineering*, *8*(1), 1357–1366. <https://doi.org/10.15282/IJAME.8.2013.23.0111>
- Murata, Y., Toniwa, S., Miyamoto, E., & Kawashima, S. (1999). Preparation of alginate gel beads containing chitosan salt and their function. *International Journal of Pharmaceutics*, *176*(2), 265–268. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00308-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00308-1)
- Nathan, K. G., Genasan, K., & Kamarul, T. (2023). Polyvinyl Alcohol-Chitosan Scaffold for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Application: A Review. *Marine Drugs* *2023*, Vol. 21, Page 304, *21*(5), 304. <https://doi.org/10.3390/MD21050304>
- Ni, D., Zhu, Y., Xu, W., Bai, Y., Zhang, T., & Mu, W. (2018). Biosynthesis of inulin from sucrose using inulosucrase from *Lactobacillus gasseri* DSM 20604. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 1209–1218. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.11.120>
- Ogobuiro, I., Gonzales, J., & Tuma, F. (2022). *Physiology, Gastrointestinal*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537103/>
- Oh, N. S., Joung, J. Y., Lee, J. Y., & Kim, Y. (2018). Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. *PloS One*, *13*(2), e0192021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192021>

- OMS, & UNICEF. (2020). *La OMS y el UNICEF advierten de que los países no están acabando con la comercialización nociva de los sucedáneos de la leche materna*. <https://www.who.int/es/news/item/27-05-2020-countries-failing-to-stop-harmful-marketing-of-breast-milk-substitutes-warn-who-and-unicef>
- OMS, & UNICEF. (2023). *Lactancia materna*. <https://www.unicef.org/mexico/lactancia-materna>
- O'Neal, A. J., Butler, L. R., Rolandelli, A., Gilk, S. D., & Pedra, J. H. F. (2020). Lipid hijacking: A unifying theme in vector-borne diseases. *ELife*, 9, e61675. <https://doi.org/10.7554/eLife.61675>
- Ortakci, F., & Sert, S. (2012). Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6918–6925. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5710>
- Ortiz-Romero, N., Ochoa-Martínez, L. A., González-Herrera, S. M., Rutiaga-Quiñones, O. M., & Gallegos-Infante, J. A. (2021). Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática. *TecnoLógicas*, 24(52), e1962. <https://doi.org/10.22430/22565337.1962>
- Pandey, N., Malik, R. K., Kaushik, J. K., & Singroha, G. (2013). Gassericin A: a circular bacteriocin produced by lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(11), 1977–1987. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1368-3>
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., Angelis, M. de, Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turroni, F., Sinderen, D. van, Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 80(3), 837. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>
- Patil, S. B., & Sawant, K. K. (2009). Development, optimization and in vitro evaluation of alginate mucoadhesive microspheres of carvedilol for nasal delivery. *Journal of Microencapsulation*, 26(5), 432–443. <https://doi.org/10.1080/02652040802456726>
- Patra, Ch. N., Priya, R., Swain, S., Kumar Jena, G., Panigrahi, K. C., & Ghose, D. (2017). Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.02.001>
- Peng, G., Dou, G., Hu, Y., Sun, Y., & Chen, Z. (2020). Phase Change Material (PCM) Microcapsules for Thermal Energy Storage. *Advances in Polymer Technology*, 2020, e9490873. <https://doi.org/10.1155/2020/9490873>

- Peretz, S., Florea-Spiroiu, M., Anghel, D., Bala, D., Stoian, C., & Zgherea, G. (2014). *Preparation of Porous Calcium Alginate Beads and Their Use for Adsorption of O-Nitrophenol from Aqueous Solutions*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Preparation-of-Porous-Calcium-Alginate-Beads-and-of-Peretz-Florea-Spiroiu/6fe3a3294b234b014fe0f1acd5479f2708f88317>
- Perumal, D. (2001). Microencapsulation of ibuprofen and Eudragit® RS 100 by the emulsion solvent diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 218(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00686-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00686-4)
- Peyrot des Gachons, C., & Breslin, P. A. S. (2016). Salivary Amylase: Digestion and Metabolic Syndrome. *Current Diabetes Reports*, 16(10), 102.
<https://doi.org/10.1007/S11892-016-0794-7>
- Phukan, N., Brooks, A. E. S., & Simoes-Barbosa, A. (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>
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 10, S49–S66.
<https://doi.org/10.1093/ADVANCES/NMY063>
- Poimenidou, S. V., Skarveli, A., Saxami, G., Mitsou, E. K., Kotsou, M., & Kyriacou, A. (2023). Inhibition of *Listeria monocytogenes* Growth, Adherence and Invasion in Caco-2 Cells by Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Fecal Samples of Healthy Neonates. *Microorganisms*, 11(2).
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11020363>
- Pourjafar, H., Noori, N., Gandomi, H., Basti, A. A., & Ansari, F. (2020). Viability of microencapsulated and non-microencapsulated *Lactobacilli* in a commercial beverage. *Biotechnology Reports*, 25, e00432. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00432>
- Pylostomou, A., Demir, Ö., & Loca, D. (2023). Calcium phosphate bone cements as local drug delivery systems for bone cancer treatment. *Biomaterials Advances*, 148, 213367. <https://doi.org/10.1016/J.BIOADV.2023.213367>
- Rahmati, F. (2019). Impact of Microencapsulation on Two Probiotic Strains in Alginate Chitosan and Eudragit S100 Under Gastrointestinal and Normal Conditions. *The Open Biotechnology Journal*, 13(1). <https://doi.org/10.2174/1874070701913010059>
- Rahmati, F. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in Eudragit S100 and alginate chitosan under gastrointestinal and normal

- conditions. *Applied Nanoscience*, 10(2), 391–399. <https://doi.org/10.1007/s13204-019-01174-3>
- Ramdhan, T., Ching, S. H., Prakash, S., & Bhandari, B. (2019). Time dependent gelling properties of cuboid alginate gels made by external gelation method: Effects of alginate-CaCl₂ solution ratios and pH. *Food Hydrocolloids*, 90, 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.022>
- Rautava, S. (2020). Milk Microbiome and Neonatal Colonization: Overview. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 94, 65–74. <https://doi.org/10.1159/000505030>
- Rayment, P., Wright, P., Hoad, C., Ciampi, E., Haydock, D., Gowland, P., & Butler, M. F. (2009). Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, Part 1: In vitro characterisation. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 816–822. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.04.011>
- Reddy, S. G., & Pandit, A. S. (2013). Biodegradable sodium alginate and lignosulphonic acid blends: characterization and swelling studies. *Polímeros*, 23(1), 13–18. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282013005000006>
- Reitermayer, D., Kafka, T. A., Lenz, C. A., & Vogel, R. F. (2018). Interrelation between Tween and the membrane properties and high pressure tolerance of *Lactobacillus plantarum*. *BMC Microbiology*, 18(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1203-y>
- Ribeiro, M. C. E., Chaves, K. S., Gebara, C., Infante, F. N. S., Grosso, C. R. F., & Gigante, M. L. (2014). Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. *Food Research International*, 66, 424–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.019>
- Romano, A., Trip, H., Lonvaud-Funel, A., Lolkema, J. S., & Lucas, P. M. (2012). Evidence of Two Functionally Distinct Ornithine Decarboxylation Systems in Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1953. <https://doi.org/10.1128/AEM.07161-11>
- Romero-Chapol, O. O., Varela-Pérez, A., Castillo-Olmos, A. G., García, H. S., Singh, J., García-Ramírez, P. J., Viveros-Contreras, R., Figueroa-Hernández, C. Y., & Cano-Sarmiento, C. (2022). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG: Probiotic Survival, In Vitro Digestion and Viability in Apple Juice and Yogurt. *Applied Sciences*, 12(4), 2141. <https://doi.org/10.3390/app12042141>

- Rothschild, J. T. (2020). *Biochemicals and Gram Positive Organism ID*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <https://www.cdc.gov/labtraining/training-courses/basic-microbiology/biochemicals-gram-positive-organism-id.html>
- Samat, N. A., Hanafi, S. N., & Shaharuddin, S. (2020). Influence of syringe and needle sizes on production time and size of microencapsulated bead of *Lactobacillus Plantarum*-sodium alginate-banana peel. *Materials Today: Proceedings*, 31, A114–A116. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.12.1084>
- Sassene, P. J., Fanø, M., Mu, H., Rades, T., Aquistapace, S., Schmitt, B., Cruz-Hernandez, C., Wooster, T. J., & Müllertz, A. (2016). Comparison of lipases for in vitro models of gastric digestion: lipolysis using two infant formulas as model substrates. *Food & Function*, 7(9), 3989–3998. <https://doi.org/10.1039/C6FO00158K>
- Sastre, J., Sabater, L., & Aparisi, L. (2005). *Fisiología de la secreción pancreática | Gastroenterología y Hepatología*. Gastroenterología y Hepatología. <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-fisiologia-secrecionpancreatica-13071380>
- Savardekar, R. Y., & Sherikar, A. S. (2020). Screening of Ketoprofen-Poloxamer and Ketoprofen-Eudragit solid dispersions for improved physicochemical characteristics and dissolution profile. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, e18641. <https://doi.org/10.1590/S2175-97902019000318641>
- Sciascia, Q., Daş, G., & Metges, C. C. (2016). REVIEW: The pig as a model for humans: Effects of nutritional factors on intestinal function and health. *Journal of Animal Science*, 94(suppl_3), 441–452. <https://doi.org/10.2527/JAS.2015-9788>
- Senn, V., Bassler, D., Choudhury, R., Scholkmann, F., Righini-Grunder, F., Vuille-dit-Bile, R. N., & Restin, T. (2020). Microbial Colonization From the Fetus to Early Childhood—A Comprehensive Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 573735. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.573735/BIBTEX>
- Shani-Levi, C., Alvito, P., Andrés, A., Assunção, R., Barberá, R., Blanquet-Diot, S., Bourlieu, C., Brodkorb, A., Cilla, A., Deglaire, A., Denis, S., Dupont, D., Heredia, A., Karakaya, S., Giosafatto, C. V. L., Mariniello, L., Martins, C., Ménard, O., El, S. N., ... Lesmes, U. (2017). Extending in vitro digestion models to specific human populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information. *Trends in Food Science & Technology*, 60, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.017>

- Silva, A. E., Barratt, G., Chéron, M., & Egito, E. S. T. (2013). Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B. *International Journal of Pharmaceutics*, 454(2), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.044>
- Silva, K. C. G., Cezarino, E. C., Michelon, M., & Sato, A. C. K. (2018). Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. *LWT*, 89, 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.026>
- Suárez-Martínez, C., Santaella-Pascual, M., Yagüe-Guirao, G., & Martínez-Graciá, C. (2023). Infant gut microbiota colonization: influence of prenatal and postnatal factors, focusing on diet. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1236254>
- Tanner, B. (2021). *Log and Percent Reductions in Microbiology and Antimicrobial Testing | Microchem Laboratory*. <https://microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing/>
- Teimouri, A., Barbaz Isfahani, R., Saber-Samandari, S., & Salehi, M. (2022). Experimental and numerical investigation on the effect of core-shell microcapsule sizes on mechanical properties of microcapsule-based polymers. <https://doi.org/10.1177/00219983221107831>, 56(18), 2879–2894.
- Toba, T., Yoshioka, E., & Itoh, T. (1991). Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin. *Letters in Applied Microbiology*, 12(6), 228–231. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00546.x>
- Toft, K., Grasdalen, H., & Smidsrød, O. (1986). Synergistic Gelation of Alginates and Pectins. In *Chemistry and Function of Pectins* (Vol. 310, Issue 0, pp. 117–132). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-1986-0310.ch010>
- Urbanska, A. M., Bhatena, J., & Prakash, S. (2007). Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yogurt for therapeutic oral delivery: preparation and in vitro analysis of alginate–chitosan microcapsules. This article is one of a selection of papers published in this special issue (part 1 of 2) on the Safety and Efficacy of Natural Health Products. <https://doi.org/10.1139/Y07-057>, 85(9), 884–893. <https://doi.org/10.1139/Y07-057>
- Valdovinos, M. A., Montijo, E., Abreu, A. T., Heller, S., González-Garay, A., Bacarreza, D., Bielsa-Fernández, M., Bojórquez-Ramos, M. C., Bosques-Padilla, F., Burguete-García, A. I., Carmona-Sánchez, R., Consuelo-Sánchez, A., Coss-Adame, E., Chávez-Barrera, J. A., de Ariño, M., Flores-Calderón, J., Gómez-Escudero, O.,

- González-Huezo, M. S., Icaza-Chávez, M. E., ... Guarner, F. (2017). Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología. *Revista de Gastroenterología de México*, 82(2), 156–178. <https://doi.org/10.1016/J.RGMX.2016.08.004>
- 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*, 11(5), 740. <https://doi.org/10.3390/foods11050740>
- Vega-Carranza, A. S., Cervantes-Chávez, J. A., Luna-Bárceñas, G., Luna-González, A., Diarte-Plata, G., Nava-Mendoza, R., Rodríguez-Morales, J. A., Escamilla-Montes, R., & Pool, H. (2021). Alginate microcapsules as delivery and protective systems of *Bacillus licheniformis* in a simulated shrimp's digestive tract. *Aquaculture*, 540, 736675. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736675>
- 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, L.-Y., Ma, G. H., & Su, Z. G. (2005). Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug. *Journal of Controlled Release*, 106(1–2), 62–75. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2005.04.005>
- Wang, M., Xu, S., Cheong, L.-Z., Xu, X., Bi, Y., & Zhang, H. (2022). Development of a reliable pH-STAT in-vitro model for gastrointestinal digestion of lipids and application for infant formula. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.115221>
- Wang, X., Gao, S., Yun, S., Zhang, M., Peng, L., Li, Y., & Zhou, Y. (2022). Microencapsulating Alginate-Based Polymers for Probiotics Delivery Systems and Their Application. *Pharmaceuticals*, 15(5), 644. <https://doi.org/10.3390/ph15050644>
- Wrigley, C., Corke, H., Seetharaman, K., & Faubion, J. (2016). *Encyclopedia of FOOD GRAINS* (2nd ed., Vol. 1). Elsevier Academic Press.
- Wu, J. J., Zhou, Q. Y., Liu, D. M., Xiong, J., Liang, M. H., Tang, J., & Xu, Y. Q. (2023). Evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* LGZ1029 based on whole genome analysis. *LWT*, 184, 114759. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114759>

- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>
- Yao, M., Xie, J., Du, H., McClements, D. J., Xiao, H., & Li, L. (2020). Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 857–874. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12532>
- Yasmin, F., Chen, X., & Eames, B. F. (2019). Effect of Process Parameters on the Initial Burst Release of Protein-Loaded Alginate Nanospheres. *Journal of Functional Biomaterials*, 10(3), 42. <https://doi.org/10.3390/jfb10030042>
- Yeung, T. W., Üçok, E. F., Tiani, K. A., McClements, D. J., & Sela, D. A. (2016). Microencapsulation in Alginate and Chitosan Microgels to Enhance Viability of *Bifidobacterium longum* for Oral Delivery. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00494>
- Yoha, K. S., Nida, S., Dutta, S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2021). Targeted Delivery of Probiotics: Perspectives on Research and Commercialization. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2021 14:1, 14(1), 15–48. <https://doi.org/10.1007/S12602-021-09791-7>
- Yoha, K. S., Nida, S., Dutta, S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2022). Targeted Delivery of Probiotics: Perspectives on Research and Commercialization. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(1), 15–48. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09791-7>
- Yu, G., Zheng, Q.-S., & Li, G.-F. (2014). Similarities and differences in gastrointestinal physiology between neonates and adults: a physiologically based pharmacokinetic modeling perspective. *The AAPS Journal*, 16(6), 1162–1166. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9652-1>
- Zhai, P., Chen, X. B., & Schreyer, D. J. (2013). Preparation and characterization of alginate microspheres for sustained protein delivery within tissue scaffolds. *Biofabrication*, 5(1), 015009. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/1/015009>
- Zhang, X., Mushajiang, S., Luo, B., Tian, F., Ni, Y., & Yan, W. (2020). The Composition and Concordance of *Lactobacillus* Populations of Infant Gut and the Corresponding Breast-Milk and Maternal Gut. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.597911>