

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Microencapsulación de probióticos a base de alginato para mejorar su estabilidad en
bebidas vegetales: una revisión bibliográfica**

**Ana Belén Cevallos Ureña
Verónica Valentina Herdoíza Cedeño
María Carolina Yagual Herrera**

Ingeniería en Alimentos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniería en Alimentos

Quito, 11 de Diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Microencapsulación de probióticos a base de alginato para mejorar su estabilidad en
bebidas vegetales: una revisión bibliográfica**

**Ana Belén Cevallos Ureña
Verónica Valentina Herdoíza Cedeño
María Carolina Yagual Herrera**

Nombre del profesor, Título académico

Javier Garrido, Máster

Quito, 11 de Diciembre de 2020

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos:	Ana Belén Cevallos Ureña Verónica Valentina Herdoíza Cedeño María Carolina Yagual Herrera
Código:	00130728 00130195 00124923
Cédula de identidad:	1720509239 1725808776 1722695069
Lugar y fecha:	Quito, 11 de Diciembre de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La prevalencia de enfermedades relacionadas con problemas gastrointestinales ha generado la necesidad de consumir alimentos ricos en probióticos que sobrevivan al procesamiento y a las condiciones del tracto gastrointestinal, con la finalidad de que colonicen el intestino y aporten beneficios a la salud. Un vehículo prometedor para el transporte de estas sustancias son las bebidas vegetales. Sin embargo, la supervivencia de los probióticos libres en este medio es muy limitada; por lo que se requiere de métodos que potencien su viabilidad. La microencapsulación es una técnica que se emplea para proteger a los probióticos de ambientes hostiles, permitiendo su supervivencia. Existen diferentes materiales que pueden ser utilizados para realizar este procedimiento, siendo el alginato uno de los más empleados. No obstante, presenta ciertas limitaciones, por lo que se combina con otros compuestos para promover su acción. El objetivo de la presente revisión bibliográfica busca identificar el efecto de la combinación del alginato junto a otros componentes (mucílagos (linaza y quince), quitosano y prebióticos (inulina y almidón resistente)) para la microencapsulación de probióticos para evaluar su supervivencia/viabilidad en la matriz alimenticia durante el almacenamiento y a lo largo del tracto gastrointestinal (mediante un experimento *in vitro*).

Palabras clave: probióticos, microencapsulación, alginato, bebida vegetal, tracto gastrointestinal

ABSTRACT

The prevalence of diseases related to gastrointestinal problems has generated the need to consume foods rich in probiotics that survive the manufacturing process and once consumed, the conditions of the gastrointestinal tract, in order to colonize the intestine and provide health benefits. A promising vehicle for the transport of these substances are vegetable beverages. However, the survival of free probiotics in this medium is very limited; therefore, methods are required to enhance its viability. Microencapsulation is a technique used to protect probiotics from harsh environments, allowing their further survival. There are different materials that can be used to achieve this procedure, alginate being one of the most used. However, it has certain limitations, so it is usually combined with other compounds to promote its action. The objective of this bibliographic review seeks to identify the effect of the combination of alginate together with other components (mucilage (linseed and quince), chitosan and prebiotics (inulin and resistant starch)) for the microencapsulation of probiotics to evaluate their survival / viability in the food matrix during storage and throughout the gastrointestinal tract (by an *in vitro* experiment).

Keywords: probiotics, microencapsulation, alginate, vegetable beverage, gastrointestinal tract

TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción.....	9
Desarrollo del Tema.....	12
Metodología.....	13
Definición del problema.....	13
Búsqueda de Información.....	14
Organización de la Información.....	16
Análisis de la Información.....	17
Múcilagos	17
Quitosano.....	20
Prebioticos.....	24
Conclusión.....	29
Referencias bibliográficas.....	31
Anexo A: Tabla 5. Tamaño de partículas.....	34
Anexo B: Tabla 6. Resumen de viabilidad de células de 4 bacterias ácido-lácticas.....	34
Anexo C: Tabla 7. Condiciones del sistema digestivo.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Base de datos usadas para la gestión documental.....	12
Tabla 2. Número de artículos en cada base de datos.....	15
Tabla 3. Rangos de los conteos del análisis de tolerancia a condiciones ácidas.....	25
Tabla 4. Condiciones de almacenamiento de los tratamientos con alginato y Hi-Maize.....	28
Tabla 5. Tamaño de partículas.....	34
Tabla 6. Resumen de viabilidad de células de 4 bacterias ácido-lácticas.....	34
Tabla 7. Condiciones del sistema digestivo.....	35

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, las intoxicaciones alimentarias causadas por bacterias son las principales enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS), reportándose 15 438 casos a nivel nacional en el año 2018. Las mismas son causadas por el consumo de alimentos o agua contaminada con bacterias que producen trastornos gastrointestinales como dolor abdominal, diarreas, náuseas, vómito y fiebre (Ministerio de Salud, 2019). De igual manera, la gastritis causada por *Helicobacter pylori* afecta alrededor del 70% de la población del Ecuador. Los posteriores tratamientos a estas enfermedades buscan la recuperación y refuerzo de la flora intestinal por medio del uso de probióticos (IECED, 2019). Adicionalmente, la intolerancia a la lactosa y el excesivo contenido de colesterol en alimentos de origen animal, sumado a las tendencias veganas, genera la oportunidad de que la industria alimentaria pueda desarrollar variedad de bebidas vegetales funcionales con probióticos (Granato *et al.*, 2010).

Un alimento funcional se define como aquel que, consumido regularmente y acompañado de una dieta balanceada, puede ayudar a prevenir enfermedades y otorgar beneficios fisiológicos (Etchepare, 2015). Este tipo de alimento contiene sustancias activas que cumplen una función específica en el organismo, como es el caso de los probióticos (Coral *et al.*, 2012). Los probióticos son microorganismos vivos que al ser consumidos en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud gastrointestinal del hospedador (Etchepare, 2015), como alivio de síntomas relacionados con la intolerancia a la lactosa, prevención del cáncer, mejora de la digestión e incremento de la resistencia a las infecciones gastrointestinales (Rajam *et al.*, 2012). Las principales cepas de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) reconocidas que cumplen con las funciones mencionadas son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* spp., ya que las mismas han sido aisladas en todas las zonas del tracto intestinal del ser humano (Etchepare, 2015). Para que un alimento sea

considerado como fuente de probióticos, este debe presentar un conteo de 10^8 - 10^9 UFC/g previo a su ingesta, mientras que al llegar al colon las bacterias deben estar en una cantidad entre 10^6 a 10^7 UFC/g (Shori, 2017). Por otro lado, estos microorganismos no deben influir en las características sensoriales del producto (Djaenudin *et al.*, 2019). Asimismo, deben tener una alta capacidad de supervivencia al procesamiento de los alimentos (temperatura, exposición al oxígeno y luz, pH, interacción con otros microorganismos) (Etchepare, 2015), y a las condiciones durante el tránsito gastrointestinal (pH bajo) para que lleguen al sitio de acción y proporcionen beneficios en la salud (Gebara *et al.*, 2013). Sin embargo, varios estudios han demostrado que las células libres de estos microorganismos no resisten el grado de estrés a las que son comúnmente sometidas (Arslan & Erbas, 2017).

La microencapsulación es una tecnología a través de la cual se encapsula a una célula con una membrana formando cápsulas miniatura (de tamaño mayor a 100 μ m) (Andrade *et al.*, 2020). Esto se realiza con la finalidad de proteger a la célula, impidiendo su posterior degradación al interactuar con el alimento y permitiendo una liberación controlada. En los últimos años, esta metodología ha sido estudiada y aplicada para la protección de probióticos, con la finalidad de que puedan ser agregados a diversos alimentos y sobrevivan a todas las adversidades expuestas anteriormente (Pérez-Leonard *et al.*, 2013).

Los principales polímeros de grado alimentario empleados para la microencapsulación de probióticos son alginato, quitosano, pectina, agar, carboximetilcelulosa, goma xantana, entre otros (Shori, 2017). De ellos, el más utilizado es el alginato, el cual es un polisacárido natural, usado comúnmente como hidrocoloide para encapsular debido a su simplicidad de manejo, no toxicidad y bajo costo. Sin embargo, su eficacia no es completa, por lo cual, comúnmente se combina con otros compuestos (Zanjani *et al.*, 2014). El objetivo de la presente revisión bibliográfica fue

comparar el efecto de la combinación de diversos materiales (mucílagos (linaza y quince), quitosano) empleados para la microencapsulación a base de alginato que permiten incrementar la supervivencia/viabilidad de los probióticos en bebidas vegetales durante su almacenamiento y a lo largo del tracto gastrointestinal mediante una prueba *in vitro*.

DESARROLLO DEL TEMA

Tabla 1. Base de datos usadas para la gestión documental

Nombre	Características	Ventajas
Scopus	Base de datos de datos y referencias bibliográficas de revistas científicas.	Permite la búsqueda de artículos sobre ciencia y tecnología con acceso a referencias bibliográficas de 14000 publicaciones científicas de 4000 editoriales.
NCBI	Base de datos de datos y referencias bibliográficas de medicina y biotecnología.	Acceso a la búsqueda de información sobre biomedicina y genética. Permite el desarrollo, intercambio, descarga y análisis de información sobre el genoma de más de 30.000 organismos.
IOP Science	Base de datos y referencias bibliográficas de contenido científico, técnico y médico.	Tiene la política de acceso libre, por lo que se puede acceder de manera gratuita a los artículos científicos.
Springer Link	Base de datos y referencias bibliográficas de contenido de revistas científicas, obras, protocolos acerca de ciencia, tecnología y medicina.	Posee más de 5 millones de documentos divididos en >50 000 libros electrónicos, >1 500 revistas desde 1997, >27 000 protocolos, >200 obras de referencia, >200 colecciones de libros electrónicos. Además, presenta herramientas de búsqueda y filtrado sofisticadas para fácilmente obtener resultados rápidos y precisos.
SciELO	Base de datos y referencias bibliográficas de contenido de revistas científicas (origen y evolución).	Incluye a 13 países que están compuestos de 8 portales certificados y 5 en desarrollo, junto a 2 portales temáticos. Recoge alrededor de 611 revistas y 195 789 artículos.
Taylor & Francis	Base de datos y referencias bibliográficas de contenido de revistas científicas internacionales, tecnología, humanidades y ciencias sociales.	La plataforma es multidisciplinaria y guarda alrededor de 1 300 revistas científicas de diversas áreas del conocimiento. Incluye más de 3,7 millones de artículos.

Fuente: elaboración propia

Metodología.

Definición del problema.

En la actualidad existen diferentes materiales que se emplean para realizar la microencapsulación de probióticos. Sin embargo, no todos se comportan de la misma manera frente a las condiciones de estrés a las cuales son sometidos estos microorganismos durante el procesamiento del alimento y su paso por el tracto gastrointestinal mediante una digestión *in vitro*. Uno de los materiales más utilizados para el proceso de microencapsulación de las BAL es el alginato debido a su capacidad para absorber agua, ser de fácil manipulación, inocuidad y poseer características gelificantes, estabilizantes y espesantes (Etchepare, 2015). Está compuesto de residuos de ácido D-manurónico y L-gulurónico, los cuales se unen entre sí por enlaces (1-4) glucósidos (Zanjani *et al.*, 2014). No obstante, el alginato por sí solo no protege a los probióticos cuando estos son sometidos a pH bajos (1,2-3) debido a la baja densidad del gel formado. Además, las microesferas formadas poseen una estructura porosa que permite la difusión del ácido dentro y fuera de la esfera. Adicionalmente, el tamaño de las esferas formadas entre 1 a 3 mm reducen la calidad sensorial del producto final (Djaenudin *et al.*, 2019). Frente a este problema diferentes autores han propuesto la combinación del alginato con mucílagos (linaza y quince), quitosano, prebióticos (inulina y almidón resistente) para aumentar su efectividad.

Búsqueda de información.

La presente revisión bibliográfica usa las bases de datos detalladas en la Tabla 1. El propósito de la búsqueda en cada una de ellas es encontrar información escrita en los últimos 10 años referente a la microencapsulación de probióticos utilizando alginato. Las palabras claves que se utilizaron durante la investigación de documentos en inglés fueron: food, vegetable beverage, chitosan, mucilage, prebiotic, probiotic, alginate, microencapsulation.

Los artículos seleccionados permiten cumplir con el objetivo planteado en un inicio; es decir, contienen información sobre la técnica de la microencapsulación, la importancia de los probióticos como ingredientes funcionales en alimentos y los diversos compuestos que pueden ser utilizados para crear las cápsulas de protección de estos. En primer lugar, para conocer la situación actual del país con relación a la necesidad de alimentos ricos en probióticos se investigó datos obtenidos del Ministerio de Salud del Ecuador y de la IECED sobre este aspecto.

Seguido, la búsqueda se enfocó en encontrar artículos científicos escritos a partir del año 2010 que describan el efecto que posee la combinación del alginato con diversos agentes microencapsulantes (mucílagos, prebióticos y quitosano) sobre la supervivencia y viabilidad de los probióticos cuando son incorporados en diversas bebidas vegetales y durante su paso a través del tracto gastrointestinal por medio de un examen *in vitro*. La Tabla 2, muestra la cantidad de artículos científicos que se encuentran en cada base de datos al ingresar las diversas ecuaciones de búsqueda.

Tabla 2. Número de artículos en cada base de datos

Base de datos	Ecuación de búsqueda	Resultados
Scopus	Alginate microencapsulation probiotics	300
	Alginate and chitosan microencapsulation	392
	Alginate and prebiotic microencapsulation	305
	Alginate and mucilage microencapsulation	6
NCBI	Alginate microencapsulation probiotics	280
	Alginate and chitosan microencapsulation	1141
	Alginate and prebiotic microencapsulation	187
	Alginate and mucilage microencapsulation	33
IOP Science	Alginate microencapsulation probiotics	6
	Alginate and chitosan microencapsulation	11
Springer Link	Alginate microencapsulation probiotics	255
	Alginate and chitosan microencapsulation	571
	Alginate and prebiotic microencapsulation	73
	Alginate and mucilage microencapsulation	28
SciELO	Alginate microencapsulation probiotics	5
	Alginate and chitosan microencapsulation	3
	Alginate and prebiotic microencapsulation	1
Taylor & Francis	Alginate microencapsulation probiotics	120

	Alginate and chitosan microencapsulation	236
	Alginate and prebiotic microencapsulation	55
	Alginate and mucilage microencapsulation	10
	Total	4008

Fuente: elaboración propia

Organización de la información.

Del total de artículos (4 008), 20 fueron seleccionados para su análisis según el objetivo planteado para la investigación. Se buscó la información basada en las diversas combinaciones de compuestos aptos para la microencapsulación de probióticos que se deseaban evaluar. De cada combinación se obtuvieron mínimo 4 documentos donde se detalla el uso de los agentes microencapsulantes, la supervivencia y la viabilidad de los probióticos durante la digestión *in vitro*. Además, para cada mezcla se escogió un artículo que describa el uso de la microencapsulación para la protección (supervivencia y viabilidad) de los probióticos durante la manufactura de bebidas vegetales. A continuación, se presenta la clasificación de manera específica: 4 artículos detallan el tema relacionado a la microencapsulación de probióticos; 3 describen el uso de alginato combinado con mucílagos como agentes microencapsulantes; 6 resumen la aplicación de probióticos con alginato; y 5 precisan la mezcla de quitosano con alginato para la microencapsulación.

Análisis de la información.

Mucílagos.

Los polisacáridos naturales solubles en agua extraídos de plantas y semillas han tomado gran importancia dentro de la industria alimentaria y farmacéutica. Son utilizados ampliamente como aditivos, agentes gelificantes, espesantes, estabilizantes, etc. Su utilización como material encapsulante como complemento al alginato (AL) resulta ideal, ya que mejoran la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento, así como a través del tracto gastrointestinal (Rodríguez *et al.*, 2020). La linaza (*L. isutatisimum*) es considerada como un alimento funcional por sus beneficios a la salud como la reducción de inflamación intestinal, reducción de glucosa y colesterol. Presenta un contenido de fibra soluble entre el 7 a 10% que es conocida como el mucílago de linaza (ML). El mucílago de linaza es una mezcla del ácido ramnogalacturonano I y arabinoxilano, un polisacárido neutro. ML es utilizado dentro de la industria como agente espesante. Se ha observado que su combinación con otros hidrocoloides ayuda a la reducción de la sinéresis en geles (Bustamente *et al.*, 2020). El Quince (*Cydonia oblonga*) es una fruta de color amarillo reconocida por su valor nutricional. Sus semillas son utilizadas para la formación de mucílagos por su capacidad de absorber agua. El mucílago de quince (MQ) es caracterizado por su contenido de polisacáridos solubles en agua (Allafchian *et al.*, 2019).

El tamaño de la partícula es una de las características que afecta a la calidad sensorial. Cada combinación genera un tamaño diferente debido a la capacidad de hidratación por los diferentes grupos químicos presentes en los polisacáridos que interactúan con el agua. Asimismo, la forma también resulta importante, ya que la esfericidad obtenida evitará la sobrepoblación de microorganismos (Gandomi *et al.*, 2016). Dokoohaki *et al.* (2019) identificó que a medida que

aumentaba la concentración de MQ, el promedio de tamaño de la esfera aumentaba siendo que el tamaño más grande fue obtenido al usar 1% MQ + AL con un valor máximo de $41,45 \pm 1,51 \mu\text{m}$ en comparación con $28,30 \pm 0,93 \mu\text{m}$ con 0,2% de MQ. Esta información fue corroborada por Shafizadeh et al. (2020); los autores observaron que la media del diámetro de las microesferas era significativamente diferente ($P < 0,05$) a medida que la concentración de AL y la incorporación de ML aumentaba. El valor de la media del diámetro varió entre $56 \mu\text{m}$ y $104 \mu\text{m}$. Las microesferas observadas fueron uniformes, esféricas y de morfología regular. Sin embargo, presentaron poros donde se observaban las agrupaciones de *L. casei*. Estos poros son el resultado de la presencia del microorganismo que interrumpe la gelatinización del alginato.

Rodrigues et al. (2017) reportó que la encapsulación de *L. casei* con 3% ML + 2% AL + 1,5% de preparación comercial de fructooligosacáridos (FOS) permitió la supervivencia final de $6,11 \pm 0,16 \log \text{UFC g/L}$ después de 6 horas. Durante la fase gástrica, la combinación de este mucílago fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en comparación con las demás muestras analizadas. A un pH de 2,3 a 2,6, similar al pH del jugo gástrico, se observaron únicamente pérdidas de $2,69 \pm 0,23 \log \text{UFC g/L}$, mientras que durante la fase entérica (pH 6,8 - 7,2) se obtuvo una reducción de 1 log UFC g/L. Resultados similares fueron encontrados por Shafizadeh et al. (2020). Los autores demostraron que la mezcla de mucílago de linaza con alginato mejora la supervivencia de *Lactobacillus casei* en condiciones gastrointestinales. Los probióticos libres presentaron una reducción de 5,8 ciclos logarítmicos ($6,42 \pm 0,8 \log \text{UFC g/mL}$) que resultó ser significativa ($P < 0,05$) en comparación con las células encapsuladas. La incorporación de 1% AL permitió lograr una reducción de 4,95 ciclos logarítmicos. Sin embargo, la incorporación del mucílago les permitió obtener una menor reducción. Determinaron que la combinación 3% ML + 0,9% AL proporciona mayor estabilidad a los probióticos. Con un conteo inicial de $11,94 \pm 0,04$

log UFC g/mL se reportó una reducción logarítmica de 4,19 equivalente a $7,75 \pm 0,04$ log UFC g/mL en el conteo final. Dokoohaki et al. (2019) mejoró la supervivencia de *L. rhamnosus* en condiciones gastrointestinales al combinar alginato con mucílago de quince (MQ). Con un conteo inicial de 7,70 log UFC g/mL, las células sin encapsular fueron sometidas a condiciones gastrointestinales durante 6 horas donde su cantidad se redujo a 4,8 log UFC g/mL. La evaluación de *L. rhamnosus* encapsulado con MQ y AL permitió mantener el 67,85% de la población inicial. Este incremento en el porcentaje se debió a la complejidad de la estructura de este mucílago que no permite su fácil degradación en condiciones ácidas o alcalinas.

La combinación de mucílagos con el alginato también ha probado mejorar la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento. El estudio realizado por Rodrigues et al. (2017) demostró que la incorporación de 0,3% de mucílago de linaza permite una menor reducción de la población de microorganismos viables ($P < 0,05$) en comparación con los mucílagos de oca estudiados por los autores. Además, resaltan la importancia de la incorporación de los FOS para evitar la reducción del número de células viables. Observaron que, en un periodo de almacenamiento a 4 °C por 15 días, la presencia de los FOS estimula el crecimiento de los microorganismos presentes. La supervivencia de *L. rhamnosus* encapsulado con MQ y AL a temperaturas de refrigeración (4 °C) también fue estudiado por Dokoohaki et al. (2019). La combinación estudiada alcanzó una población estadísticamente significativa ($P < 0,05$) con una reducción de 3,8 log UFC/g a los 21 días en comparación con los microorganismos no encapsulados. Los autores adicionalmente evaluaron el efecto de tratamientos térmicos a las células encapsuladas. Se sometieron a una temperatura de 72 °C por 20 minutos y observaron una reducción de 5 log UFC/mL en comparación con 7,5 log UFC/mL que obtuvieron para *L. rhamnosus* no encapsulado. Estos resultados indican la posibilidad de someter a tratamientos

térmicos a las bebidas vegetales. Por el contrario, Shafizadeh et al. (2020), concluyeron que la combinación 3% ML + 0,9% AL presenta un ligero aumento en la viabilidad del microorganismo encapsulado ($11,95 \pm 0,5$ log UFC/g), en comparación con los no encapsulados ($12,2 \pm 0,3$ log UFC/g) y los encapsulados con 1% AL ($11,60 \pm 0,5$ log UFC/g). Sin embargo, dichos datos no fueron estadísticamente significativos ($P > 0,05$). Se debe tomar en cuenta que el estudio no realizó una viabilidad durante el almacenamiento y se recomienda realizar una investigación de estabilidad a futuro.

Quitosano.

El quitosano es un polisacárido poli-catiónico que proviene principalmente del esqueleto de los artrópodos y crustáceos. Su composición física, química y biológica permite que pueda ser usado para formar micropartículas que contienen ingredientes activos. De igual manera, este compuesto es sensible al pH; es decir, en medio básico-neutro libera grupos de amina, mientras que en un pH ácido se forman aminas protonadas, característica que facilita su uso en tecnologías de liberación controlada (Raza *et al.*, 2020).

Generalmente, el quitosano (QI) se combina con AL para formar microcápsulas con menor porosidad y por ende, con mayor estabilidad. Sin embargo, el tamaño de la partícula incrementa. Esto se corrobora con el estudio realizado por Zanjani et al. (2014), en donde se obtuvo que el tamaño para una partícula hecha a base de alginato y almidón gelatinizado para encapsular *Lactobacillus casei* tuvo un diámetro de $92 \pm 1,709 \mu m$, valor que fue significativamente diferente ($p < 0,05$) del tamaño que se obtuvo al agregar QI a la microcápsula ($124 \pm 1,96 \mu m$). Los autores además encapsularon al probiótico *Bifidobacterium bifidum*, para el cual obtuvieron un tamaño de $94 \pm 1,72 \mu m$ para la cápsula con AL y almidón, mientras que para el recubrimiento al que se le

agregó QI resultó en $125 \pm 1,81 \mu m$. Lopes et al. (2020) obtuvo resultados similares con tamaños de $793,3 \pm 10,81 \mu m$ y $891,43 \pm 50,92 \mu m$ para cápsulas de AL y AL+QI, respectivamente. Asimismo, el estudio presentó que el QI cambió la forma y morfología de las microcápsulas, obteniendo una superficie más lisa y uniforme. Según Gandomi et al. (2016), las microcápsulas de AL+QI presentaron una forma esférica, factor que es de suma importancia para prevenir el sobrecrecimiento de las células durante la encapsulación. Esto se puede deber a que el quitosano actúa como un relleno, reduciendo los poros y, por ende, disminuye la permeabilidad del alginato e incrementa el grosor y densidad de la micropartícula, aumentando la protección y estabilidad de los probióticos, limitando su liberación temprana (Lopes *et al.*, 2020).

Con respecto a la viabilidad, diferentes estudios han demostrado que la incorporación de quitosano a las matrices hechas a base de alginato incrementa la viabilidad de los probióticos tanto durante el almacenamiento de estos en alimentos como durante su paso por el tracto gastrointestinal. El estudio realizado por Lopes et al. (2020), indica que la microencapsulación con alginato y quitosano mejoró la supervivencia durante el almacenamiento ($p < 0,05$) por 120 días a $7 \text{ }^\circ\text{C}$ de *Lactobacillus acidophilus* La-05 ($6,27 \pm 0,09 \text{ log UFC/mL}$) comparado con la supervivencia de las células libres ($3,87 \pm 0,05 \text{ log UFC/m}$). No obstante, no hubo diferencia significativa con la supervivencia otorgada solamente por la microencapsulación con alginato ($6,59 \pm 0,11 \text{ log UFC/mL}$). De igual manera, al momento de someter a las microcápsulas a un tratamiento térmico ($72 \text{ }^\circ\text{C}$), los autores evidenciaron que las partículas con encapsulación de AL y AL+QI presentaron un recuento de $7,62 \pm 0,01 \text{ log UFC/mL}$ cada uno, cantidad que es significativamente superior a lo encontrado para las células libres ($5,50 \pm 0,08 \text{ log UFC/mL}$). Esto demuestra que se puede utilizar este recubrimiento para probióticos que van a ser introducidos en una bebida que va a requerir de un proceso de pasteurización para asegurar su inocuidad, como es

el caso de los jugos vegetales. Por otro lado, en el estudio realizado por Gandomi et al. (2016), se encapsuló *Lactobacillus rhamnosus GG* con alginato, quitosano e inulina. El mismo, fue introducido en jugo de manzana y se evaluó su viabilidad a 4 y 25 °C después de 90 días de almacenamiento. Los resultados mostraron que la cantidad de células probióticas para ambas condiciones fue superior a 10^6 UFC/mL (cantidad que se encuentra sobre el límite deseado de viabilidad). Los resultados obtenidos muestran que se puede utilizar quitosano como complemento para la microencapsulación con alginato para incrementar la viabilidad de probióticos durante su almacenamiento a temperatura ambiente y de refrigeración, condiciones a las que comúnmente son sometidas las bebidas vegetales.

De igual manera, el estudio realizado por Lopes et al. (2020), investigó sobre la viabilidad de los probióticos encapsulados durante su paso por el tracto gastrointestinal. Es así que a pH 2 (similar al que se tiene en el estómago) por 20 minutos, la supervivencia de las células libres de *Lactobacillus acidophilus* La-05 en leche de soya fue de $5,03 \pm 0,02$ log UFC/mL. La encapsulación con alginato logró que sobrevivan $6,81 \pm 0,08$ log UFC/mL, mientras que con la microencapsulación de AL+QI se obtuvo una cantidad de $6,52 \pm 0,02$ log UFC/mL, valores que no difieren significativamente entre sí. Según Gandomi et al. (2016), existió una reducción de células probióticas libres de 2,7% durante la simulación con jugos gástricos a un pH 2 después de 60 minutos a 37 °C. No obstante, con la microencapsulación con AL+QI, se logró incrementar la viabilidad hasta un 27,7%. En el estudio realizado por Zanjani et al. (2013), se determinó que con la encapsulación con AL+QI+almidón de *Lactobacillus casei*, la cual fue sometida a un pH 1,5 por 120 minutos, se obtuvo una supervivencia de $6,3 \times 10^7$ UFC/mL, valor estadísticamente diferente ($p < 0,05$) de lo que se obtuvo con las células libres ($1,1 \times 10^3$ UFC/mL).

Con esto, se puede determinar que la microencapsulación con alginato incrementa la viabilidad y supervivencia de las células probióticas en comparación con las células libres durante su paso por el esófago-estómago. Esta viabilidad a través del estómago se puede deber a la protección que otorga el quitosano. Al momento de mezclarse el QI con el AL, se forma un complejo que alcanza su máxima estabilidad en pH 2 y actúa como un amortiguador, impidiendo que el ácido entre en las células e incrementa el pH dentro de la matriz para proteger a las bacterias (Lopes, 2020).

La viabilidad durante la simulación en líquido intestinal en el estudio realizado por Lopes et al. (2020), indicó que la supervivencia de células encapsuladas (AL+QI) que fueron insertadas en leche de soya y posteriormente sometidas a un pH de 6,5 (similar al que se tiene en el íleon) durante 60 minutos a 37°C fue significativamente mayor ($6,32 \pm 0,08$ log UFC/mL) a aquellas que no poseían el recubrimiento ($4,38 \pm 0,15$ log UFC/mL). Sin embargo, no hubo diferencia significativa con la cantidad de células viables que se obtuvieron con el recubrimiento de solo alginato. Gandomi et al. (2016), mostró que a 37 °C durante la simulación del jugo gástrico con pancreatina durante 60 minutos la cantidad de células libres se redujo a 0,2%, mientras que aquellas que estaban contenidas en AL+QI+Inulina sobrevivieron en un 27,7%. En este estudio, se reveló que la disminución de células era superior durante la simulación en el intestino que en el estómago. La viabilidad de las células disminuye en condiciones básicas debido a que el alginato no es estable en ambientes alcalinos. Igualmente, el quitosano forma una membrana semipermeable, permitiendo que las soluciones básicas penetren en la matriz. Zanjani et al. (2013), demostraron que después de 120 min de exposición a un pH de 8 la cantidad de células de *Lactobacillus casei* fue de 0. Sin embargo, las células microencapsuladas con AL+QI+almidón tuvieron una supervivencia de $7,1 \times 10^3$ UFC/mL, valor que fue superior al obtenido con la

encapsulación de solamente AL+QI, con lo que los autores concluyen que la microencapsulación con quitosano fue la más efectiva para la protección de bacterias durante su paso por el intestino.

Prebióticos.

Otro de los compuestos utilizados para fortalecer las microcápsulas con alginato y evitar la reducción logarítmica de los microorganismos son los prebióticos. Los mismos se conocen como compuestos que son degradados por la microbiota intestinal generando cambios en la composición y la actividad de la misma (Nami *et al.*, 2020). Esta acción confiere beneficios sobre el bienestar y la salud del huésped como: optimizar la función y el metabolismo del colon, aumento de peso fecal, reducción del pH luminal del colon, disminución de productos nitrogenados finales y la modulación del sistema inmunológico (Serrano *et al.*, 2017). Con estos conocimientos se asevera que una co-encapsulación de probióticos con uno o más prebióticos es importante debido a que se forma un simbiótico, protegiendo de manera más eficiente a la bacteria durante el procesamiento de un alimento y por su paso a través del tracto gastrointestinal (Serrano *et al.*, 2017). Varios estudios resumen el uso de prebióticos en la microencapsulación de probióticos junto al alginato. Los más utilizados son: inulina, la cual es un polisacárido que forma parte de la familia de los fructanos, que consta de 2 a 60 unidades de fructosa terminadas por una molécula de glucosa (Zaeim *et al.*, 2020) y es extraída de la raíz de achicoria (Abed *et al.*, 2016); y el almidón resistente, que es un tipo especial de almidón que no puede ser digerido por el cuerpo humano y llega a ser fermentado por la microflora del intestino grueso (De Araújo Etchepare *et al.*, 2016)

La mezcla de inulina con alginato en la co-encapsulación de bacterias probióticas genera resultados positivos al momento de evaluar el tamaño de las cápsulas y su viabilidad en diferentes condiciones de estrés (Jantarathin *et al.*, 2017). Serrano *et al.* (2017) realizaron un experimento donde se utilizó inulina, orujo de manzana y harina de cáscara de cactus para la co-encapsulación

de 4 diferentes BAL (*L. plantarum* UAM17, *E. faecium* UAM18, *A. viridans* UAM21b, *P. pentosaceus* UAM22a). Los resultados mostraron que las microcápsulas con inulina presentaron un mayor tamaño (Anexo A). Asimismo, en los tratamientos con esta fibra se observó que existían conteos mayores de las BAL después de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente, demostrando que había mayor viabilidad de estas bacterias (Anexo B). En relación a la tolerancia a condiciones ácidas (Anexo C), la co-encapsulación con inulina aumentó la tasa de supervivencia y viabilidad de las bacterias en comparación con las células libres (Tabla 3) (Serrano *et al.*, 2017).

Tabla 3. Rangos de los conteos del análisis de tolerancia a condiciones ácidas

	Rango inicial (log UFC/ml)	Rango final (log UFC/ml)
Inulina	91,29 - 95,80	77,54 - 81,69
Células Libres	59,34 - 62,59	25,36 - 27,57

Fuente: (Serrano *et al.*, 2017).

De igual manera, al momento en que la inulina fue utilizada para la microencapsulación de *Lactococcus lactis* ABRIINW-N19 para ser incorporado en jugo de naranja, se visualizó que el tamaño de las microcápsulas que poseían inulina en su formulación presentaron significativamente mayor diámetro que aquellas sin inulina (Anexo A). Por otro lado, bajo condiciones del sistema digestivo (Anexo C), se encontró una tasa de supervivencia del 85% y un incremento de viabilidad del 52% para la muestra con 2% de inulina. Se observó que la reducción logarítmica fue únicamente de 1,46 log en los recuentos de UFC de las células para este tratamiento, en comparación a aquellos tratamientos con bajo porcentaje de fibra que presentaron reducciones de alrededor de 2,18 a 5,89 log. Dentro de las condiciones de almacenamiento del jugo (6 semanas a

la temperatura del frigorífico (4 °C), la viabilidad celular para *L. lactis* ABRIINW-N19 no microencapsulada disminuyó de 9,84 a 2,98 log UFC/g. Al contrario, una supervivencia considerable en el tiempo de almacenamiento y un buen crecimiento fue reconocida con la formulación que presentaba 2% de inulina (9,73 a 11,5 log UFC/g) la cual indicó una capacidad de protección significativa ($p \leq 0,05$) en comparación a las otras concentraciones (Nami *et al.*, 2020).

Igualmente, Zaeim *et al.* (2020) demostró que durante el almacenamiento a 4 °C y -18 °C por 90 días las células de *Lb. plantarum* PTCC 1896 no presentaron reducciones logarítmicas cuando estaban en microcápsulas que contienen 50 mg/g de inulina, a comparación de los tratamientos control donde se observó una reducción de 1 unidad logarítmica a las mismas condiciones. Estos resultados confirman la influencia positiva de las microcápsulas que contienen inulina sobre el mantenimiento de la viabilidad de *Lb. plantarum* PTCC 1896. Sin embargo, cuando la temperatura de almacenamiento cambió a 25 °C, se observó que en 90 días hubo una reducción logarítmica de 2 log en las muestras con inulina y de 4,5 log en los tratamientos de control (Zaeim *et al.*, 2020). Esto se debe a la actividad metabólica de las células a esta temperatura y a la producción de ácidos orgánicos en las microcápsulas (Holkem *et al.*, 2017).

Los resultados positivos de la microencapsulación con inulina están relacionados con la composición de los componentes que forman la matriz de la microcápsula, sobre todo el tipo de fibra. Los materiales como la inulina que poseen mayor cantidad de fibra insoluble resultan en partículas más grandes debido al efecto sinérgico y competitivo sobre la gelificación de la microcápsula, observándose que afectan positivamente en las interacciones durante la co-encapsulación en la matriz con alginato, resultando en un tamaño de cápsula más grande (Serrano *et al.*, 2017).

Además, este fructano compensa las desventajas estructurales de las cápsulas hechas a base solo de alginato, debido a que por su composición afecta la matriz del gel de AL, formando una membrana más densa debido a su estructura fuerte. Como consecuencia, se genera mayor viabilidad puesto a que el efecto estructural de la co-encapsulación genera una microcápsula que protege de mejor manera a la bacteria antes, durante y después de su microencapsulación (Nami *et al.*, 2020). Asimismo, debido al contenido de carbohidratos insolubles de la inulina, la viabilidad de bacterias en las condiciones gastrointestinales es mayor, puesto a que se ha creado un mejor soporte estructural que permite mayor resistencia de las bacterias en condiciones ácidas (Serrano *et al.*, 2017).

El uso de almidón resistente en la microencapsulación de probióticos ha resuelto algunos problemas tecnológicos referentes a la microencapsulación como la liberación controlada de moléculas bioactivas, la estabilidad térmica y el aumento de la vida útil de las bacterias probióticas (De Araújo Etchepare *et al.*, 2016). En un estudio realizado por De Araújo Etchepare *et al.* (2016) se aplicó almidón resistente (Hi-maize) al 1% para la microencapsulación de *Lactobacillus acidophilus* en cápsulas de alginato. La adición del almidón (prebiótico) significativamente afectó al tamaño de la partícula (Anexo A).

En relación a la viabilidad y supervivencia de las células bajo condiciones del tracto gastrointestinal (Anexo C), se obtuvo una diferencia significativa entre la reducción logarítmica de las microcápsulas solo con alginato (3,676 log UFC/g) y aquellas con Hi-maize (3,01 log UFC/g). Esto demuestra que la adición de prebióticos aumentó la resistencia de las bacterias al pH bajo y las sales biliares en el sistema digestivo simulado, lo que resultó en un mayor número de células viables en las micropartículas que contienen almidón resistente (De Araújo Etchepare *et al.*, 2016).

Con respecto a las condiciones de almacenamiento, la Tabla 4 muestra el resumen de las tres temperaturas a las que fueron sometidas las microcápsulas. Se asevera que en todas las condiciones hubo una diferencia significativa en la reducción logarítmica de las células viables. Sin embargo, a 25 °C sigue estando dentro de los requisitos básicos para conferir beneficios para la salud, mientras que a 7 °C y -18 °C su viabilidad se pierde después de este periodo de tiempo (De Araújo Etchepare *et al.*, 2016). Las condiciones de congelamiento pudieron afectar este drástico decrecimiento de las células bajo dicha condición (-18 °C), ya que se forman cristales de hielo que provocan un daño estructural a la membrana, provocando rupturas y cambiando el estado fisiológico de las células (Conrad *et al.*, 2000).

Tabla 4. Condiciones de almacenamiento de los tratamientos con alginato y Hi maize

Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Conteo inicial Hi-maize (log UFC/g)	Conteo inicial solo alginato (log UFC/g)	Conteo final Hi-maize (log UFC/g)	Conteo final solo alginato (UFC/g)
25	135	9,88 ± 0,03	9,78 ± 0,05	7,03 ± 0,25	6,53 ± 0,12
7	135	9,88 ± 0,03	9,78 ± 0,05	5,88 ± 0,05	5,15 ± 0,11
-18	135	9,88 ± 0,03	9,78 ± 0,05	5,81 ± 0,04	5,35 ± 0,07

Fuente: (De Araújo Etchepare *et al.*, 2016)

Por su parte, en un estudio donde fue utilizado almidón resistente en la co-encapsulación de *Lactobacillus plantarum* se observó que después de 3 meses de almacenamiento se redujo de $9,18 \pm 0,30$ a $8,21 \pm 0,36$ log UFC/g, correspondiente a casi 0,8-1 log de pérdida de ciclo, pero sin diferencia significativa con respecto a las cápsulas control. Sin embargo, cuando las microcápsulas, igualmente preparadas con almidón resistente, fueron sometidas a un sistema alimentario real, se observó un comportamiento significativo favorable en la protección de los

probióticos. El número de células viables en las muestras después de 90 días de almacenamiento se redujo de $8,37 \pm 0,09$ a $7,82 \pm 0,39$ log UFC/g, igual a 0,5 ciclos logarítmicos. Sin embargo, el número de células viables en la muestra control se redujo a $6,75 \pm 0,31$ log UFC/g, correspondiente a 1,6 ciclos logarítmicos.

Con los resultados analizados, se puede afirmar que la incorporación de prebióticos como material de recubrimiento junto al alginato protege de manera efectiva a los probióticos dentro de matrices alimentarias (Serrano *et al.*, 2017). Esto se da como consecuencia a la habilidad nutricional de los prebióticos, que crean un microambiente rico en compuestos fermentables disponibles alrededor de las células probióticas vivas y mejoran su viabilidad en condiciones desfavorables, así como su competitividad con la microbiota intestinal al acelerar su crecimiento y proliferación. Todos estos hallazgos sugieren que las microcápsulas con inulina o almidón resistente podrían usarse como ingredientes para la formulación de alimentos funcionales (Zaeim *et al.*, 2020).

Conclusión.

En conclusión, se determinó que, en comparación con los tratamientos de células libres, las combinaciones de alginato con mucílagos (linaza y quince), quitosano y prebióticos (inulina y almidón resistente) incrementan el tamaño del diámetro de la partícula y son efectivas para la microencapsulación de probióticos, debido a que otorgan un incremento en la protección, aumentando su supervivencia/viabilidad en la matriz alimenticia durante el almacenamiento y a lo largo del tracto gastrointestinal.

La incorporación de mucílagos ha demostrado mejorar la supervivencia de los probióticos en el almacenamiento y a través de su paso por el tracto gastrointestinal. Esta mejora se debe a la

complejidad de la estructura de los mucílagos que dificulta su degradación. Se obtuvo microesferas uniformes y de morfología regular. Sin embargo, se observó que la presencia del microorganismo interrumpe en la gelatinización del alginato. La inclusión adicional de FOS ayuda a estimular el crecimiento de los microorganismos presentes. Los resultados obtenidos por los autores también demostraron la posibilidad de someter a tratamientos térmicos las bebidas vegetales junto con las microesferas con mucílagos.

Con respecto a la mezcla de alginato con quitosano, existen controversias sobre el efecto que genera. Esto se debe a que uno de los autores revisados muestra que no hay diferencia significativa en la supervivencia de las bacterias que poseen ambos materiales microencapsulantes de aquellas que solo están recubiertas con alginato. Mientras que el resto de los estudios obtuvieron que la incorporación de quitosano incrementa significativamente la supervivencia y viabilidad de los probióticos. A pesar de esta discrepancia, se concluye que el quitosano sí otorga una mayor protección ya que actúa como agente de relleno que estabiliza la película de alginato, forma un complejo amortiguador y es resistente a altas temperaturas, por lo que se recomienda su uso para microorganismos que van a ser incorporados en bebidas vegetales que requieren de un tratamiento de pasteurización.

Por último, la revisión realizada confirma que la co-encapsulación de probióticos con prebióticos y alginato protege de manera efectiva a las células dentro de matrices alimentarias. Esto es debido a que tanto la inulina como el almidón resistente son compuestos fermentables utilizados por las BAL mejorando su viabilidad en condiciones desfavorables. Según los estudios revisados, se concluye que la inulina tiene un mayor potencial de protección, debido a su composición química y a la matriz que genera junto al alginato.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abed, S. M., Ali, A. H., Noman, A., Niazi, S., Ammar, A. F., & Bakry, A. M. (2016). Inulin as prebiotics and its applications in food industry and human health; a review. *Int J Agric Innov Res*, 5(1), 88-97. Recuperado el 31 de octubre del 2020 de https://www.researchgate.net/publication/318900116_Inulin_as_Prebiotics_and_its_Applications_in_Food_Industry_and_Human_Health_A_Review
- Allafchian, A., Jalali, S.A.H., Mousavi, S.E., Hosseini, S. (2019). Preparation of cell culture scaffolds using polycaprolactone/quince seed mucilage, *International Journal of Biological Macromolecules*, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.096>
- Andrade, A., Carvalho, R. D. S. F., Magalhães, N. S. S., Madruga, M. S., Athayde, A. J. A. A., Portela, I. A., ... & Stamford, T. C. M. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 109295.
- Arslan-Tontul, S., & Erbas, M. (2017). Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *Lwt-food science and technology*, 81, 160-169.
- Bustamante, M., Laurie-Martínez, L., Vergara, D., Campos-Vega, R., Rubilar, M., Shene, C. (2020). Effect of Three Polysaccharides (Inulin, and Mucilage from Chia and Flax Seeds) on the Survival of Probiotic Bacteria Encapsulated by Spray Drying. *Applied Sciences*, 10, 2-17.
- Conrad, P. B., Miller, D. P., Cielenski, P. R., & de Pablo, J. J. (2000). Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, 41(1), 17-24. Recuperado el 31 de octubre del 2020 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224000922600>
- Coral, C. B. S., Carmen, G. C., Ángel, R. B. M., & Consuelo, L. N. (2012). *Nutrición, salud y alimentos funcionales*. Editorial UNED.
- De Araújo Etchepare, M., Raddatz, G. C., Cichoski, A. J., Flores, É. M. M., Barin, J. S., Zepka, L. Q., ... & de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *Journal of Functional Foods*, 21, 321-329.
- Djaenudin, E., Budianto, E., Saepudin, E., & Nasir, M. (2019). The encapsulation of *Lactobacillus casei* probiotic bacteria based on sodium alginate and chitosan. *The 4th International Symposium on Green Technology for Value Chains 2019*, 1-8.

- Dokoohaki, Z., Sekhavatizadeh, S., Hosseinzadeh, S. (2019). Dairy dessert containing microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) with quince seed mucilage as a coating material. *LWT Food Science and Technology*, 115, 1-8.
- Etchepare, M. D. A., Barin, J. S., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Wagner, R., Fries, L. L. M., & Menezes, C. R. D. (2015). Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. *Ciência Rural*, 45(7), 1319-1326.
- Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 365-371.
- Gebara, C., Chaves, K. S., Ribeiro, M. C. E., Souza, F. N., Grosso, C. R., & Gigante, M. L. (2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food research international*, 51(2), 872-878.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. (2010). Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(3), 292-302.
- Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Barin, J. S., Flores, É. M. M., Muller, E. I., Codevilla, C. F., ... & de Menezes, C. R. (2017). Production of microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 216-221. Recuperado el 31 de octubre del 2020 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816304169>
- Instituto Ecuatoriano de Enfermedades Digestivas (IECED). (2019). *LA GASTRITIS, UN MAL PREVENIBLE*. Recuperado el 25 de septiembre del 2020 de <https://www.ieced.com.ec/la-gastritis-un-mal-prevenible/>
- Jantarathin, S., Borompichaichartkul, C., & Sanguandeeikul, R. (2017). Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Materials Today: Proceedings*, 4(5), 6166-6172.
- Lopes, L. A. A., Carvalho, R. D. S. F., Magalhães, N. S. S., Madruga, M. S., Athayde, A. J. A. A., Portela, I. A., & Stamford, T. C. M. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 109295.
- Ministerio de Salud Pública (2019). *Enfermedades transmitidas por agua y alimentos*. Recuperado el 25 de septiembre del 2020 de https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2018/11/gaceta_ETAS_SE_23.pdf
- Nami, Y., Lornezhad, G., Kiani, A., Abdullah, N., & Haghshenas, B. (2020). Alginate-Persian Gum-Prebiotics microencapsulation impacts on the survival rate of *Lactococcus lactis* ABRIINW-N19 in orange juice. *LWT*, 124, 109190.

- Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M. A., Tortoló-Cabañas, K., & Gastón-Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47(1), 14-25.
- Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S., & Anandharamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein–alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 891-898.
- Raza, Z. A., Khalil, S., Ayub, A., & Banat, I. M. (2020). Recent developments in chitosan encapsulation of various active ingredients for multifunctional applications. *Carbohydrate Research*, 108004.
- Rodrigues, F.J., Cedran, M.F., Bicas, J.L., Sato, H.H., (2020). Encapsulated probiotic cells:relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – a narrative review, *Food Research International*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>
- Serrano-Casas, V., Pérez-Chabela, M. L., Cortés-Barberena, E., & Totosaus, A. (2017). Improvement of lactic acid bacteria viability in acid conditions employing agroindustrial co-products as prebiotic on alginate ionotropic gel matrix co-encapsulation. *Journal of Functional Foods*, 38, 293-297.
- Shafizadeh, A., Golestan, L., Ahmadi, M., Darjani, P., Ghorbani-HasanSarael, A. (2020). Encapsulation of *Lactobacillus casei* in alginate microcapsules:improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions using flaxseed mucilage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-8.
- Shori, A. B. (2017). Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. *HAYATI journal of biosciences*, 24(1), 1-5.
- Zaeim, D., Sarabi-Jamab, M., Ghorani, B., Kadkhodae, R., Liu, W., & Tromp, R. H. (2020). Microencapsulation of probiotics in multi-polysaccharide microcapsules by electrohydrodynamic atomization and incorporation into ice-cream formulation. *Food Structure*, 25, 100147.
- Zanjani, M. A. K., Tarzi, B. G., Sharifan, A., & Mohammadi, N. (2014). Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 13(3), 843.

ANEXOS

ANEXO A: TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS

Tabla 5. Compilación del tamaño de las partículas utilizando prebióticos.

Autor	Prebiótico	Tamaño con prebiótico μm	Tamaño sin prebiótico μm
Serrano <i>et al.</i> , 2017	Inulina	89,01 \pm 8 - 92,31 \pm 4	69,23 \pm 8 - 85,71 \pm 9
Nami <i>et al.</i> , 2020	Inulina	53–56	34–37
De Araújo Etchepare <i>et al.</i> , 2016	Hi-maize	55,56	55,13

**ANEXO B: RESUMEN DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE 4 BACTERIAS
ÁCIDO-LÁCTICAS**

Tabla 6. Resumen de viabilidad de las células de 4 bacterias ácido-lácticas

Cell viability determined by flow cytometry of co-encapsulated lactic acid bacteria.

Bacteria strain	Probiotic source	Storage time (days)		
		1	15	30
<i>L. plantarum</i> UAM17	Inulin	90.53 a, c, B	96.52 a, c, A	97.38 a, c, A
	Cactus Pear	85.95 a, e, B	87.13 a, e, A	89.30 a, e, A
	Apple Marc	82.32 a, d, B	89.34 a, d, A	90.46 a, d, A
<i>E. faecium</i> UAM18	Inulin	83.84 b, c, B	97.91 b, c, A	92.49 b, c, A
	Cactus Pear	79.64 b, e, B	85.60 b, e, A	88.14 b, e, A
	Apple Marc	82.48 b, d, B	89.66 b, d, A	89.99 b, d, A
<i>A. viridans</i> UAM21b	Inulin	77.71 b, c, B	95.39 b, c, A	96.26 b, c, A
	Cactus Pear	81.03 b, e, B	88.39 b, e, A	87.16 b, e, A
	Apple Marc	86.37 b, d, B	91.89 b, d, A	89.57 b, d, A
<i>P. pentosaceus</i> UAM22a	Inulin	90.32 a, c, B	96.52 a, c, A	97.38 a, c, A
	Cactus Pear	82.95a, e, B	88.13 a, e, A	89.30 a, e, A
	Apple Marc	87.53 a, d, B	88.34 a, d, A	90.46 a, d, A

a, b Means with the same letter are not significantly ($p > 0.05$) different for bacteria strain.c, d, e Means with the same letter are not significantly ($p > 0.05$) different for probiotic source.A, B, C, D Means with the same letter are not significantly ($p > 0.05$) different for time to exposure.Fuente: (Serrano *et al.*, 2017).

ANEXO C: CONDICIONES DE SISTEMA DIGESTIVO

Tabla 7. Condiciones de sistema digestivo para los tratamientos con prebióticos.

Autor	Condición	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)
Serrano <i>et al.</i> , 2017	Caldo MRS, HCl 5,0 M; pH = 2,0	2	37
Nami <i>et al.</i> , 2020	0,32% pepsina en 0,20 mol L ⁻¹ HCl; pH 2,0	2	37
De Araújo Etchepare <i>et al.</i> , 2016	Primera: 1M HCl+3 g L ⁻¹ pepsina + 0,9 mg L ⁻¹ lipasa; pH 1,8	2	37
	Segunda: 1 g L ⁻¹ bilis + d 0,1 g L ⁻¹ pancreatina; pH 5, pH 7,5	2	
	Tercera: 1 g L ⁻¹ bilis + d 0,1 g L ⁻¹ pancreatina; pH 7,5	2	