

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**ENCAPSULAMIENTO POR ELECTROSPRAYING DE UN PROBIÓTICO  
UTILIZANDO CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE**

**POR**

**LBG. MIGUEL ARTURO ORTIZ GONZÁLEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**ENERO, 2018**

**ENCAPSULAMIENTO POR ELECTROSPRAYING DE  
UN PROBIÓTICO UTILIZANDO CONCENTRADO  
DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE**

**Comité de Tesis**

---

Dra. Katiushka Arévalo Niño (Presidente)

---

Dra. Susana De la Torre Zavala (Secretario)

---

Dr. Luis J. Galán Wong (Vocal)

---

Dra. María del Socorro Flores González (Vocal)

---

Dra. Lilia H. Morales Ramos (Vocal)

**ENCAPSULAMIENTO POR ELECTROSPRAYING DE  
UN PROBIÓTICO UTILIZANDO CONCENTRADO  
DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE**

**Dirección de tesis**

---

Dra. Katiushka Arévalo Niño (Director)

---

Dra. Adriana Marisol Rangel Rodríguez (Asesor externo)

## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. Katiushka Arévalo Niño por tenerme la confianza y darme la oportunidad de realizar este proyecto en su laboratorio, así como darme todo su apoyo en todo lo que necesité por estos dos años.*

*A la Dra. Marisol Rangel por todas las enseñanzas que me brindó para que el proyecto siguiera avanzando.*

*A la Dra. Susana De la Torre por brindarme su ayuda y consejos en momentos en que me encontraba en dificultades.*

*A todos mis amigos del laboratorio L1; Eugenia Ortiz, Mauro Rodríguez, Mayra Treviño, Julián Zaragoza, Héctor López, Omar Tovar, René Santana; gracias por haberme brindado sus enseñanzas, consejos e ideas, además de haber hecho más fácil todo este viaje gracias a su compañía.*

*Al Dr. Jorge Luis Hernández Piñero, así como al CIIDIT de la UANL por haberme apoyado con el equipo de Microscopía Electrónica de Barrido.*

*Al Dr. Argel Gastélum Arellánez por la asesoría que me brindó en los análisis estadísticos.*

*Al Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León por haberme apoyado con el equipo de microscopía de fluorescencia.*

*A CONACYT por la beca otorgada durante todo el tiempo de mis estudios de posgrado.*

## DEDICATORIA

*A mis padres, Lourdes Patricia González Rodríguez y Miguel Ortiz Cruz por guiarme durante toda mi vida por el camino del estudio y la superación, por todo el esfuerzo y sacrificios que han realizado para que pudiera llegar hasta este punto en mi vida, les agradezco por todos sus consejos, regaños y enseñanzas ya que me han ayudado a mantenerme motivado en los momentos más difíciles, se los agradezco infinitamente.*

*A mi hermano Pablo Ortiz, por haber sido mi mejor amigo durante toda la vida.*

*A mis amigos de siempre, José Edgar Garza, Ricardo Soto, Daniel Rosales, Isaac Villanueva, Melany Calderón, Melina Calderón, Ernesto Mendoza, Angelina Ortega y José Daniel Borrego, por acompañarme estos años, y haberme brindado alegría con su compañía.*

*A mi novia, Jessica Arrambide por darme todo tu apoyo durante estos dos años, haberme dado consejos y soportado durante los momentos de estrés y brindarme tranquilidad cuando la necesitaba. Tú me motivas para seguir adelante. Te amo.*

# ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	2
<b>1. Introducción</b>	3
<b>2. Antecedentes</b>	5
2.1 Historia de los probióticos	5
2.2 Características de los probióticos	5
2.2.1 Características de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	6
2.2.2 Parámetros de los microorganismos para uso como probiótico	7
2.2.3 Beneficios de los microorganismos probióticos	8
2.3 Encapsulación	8
2.3.1 Técnicas de encapsulación	9
2.3.2 Tecnología del electrospraying	10
2.4 Parámetros de la solución	11
2.4.1 Viscosidad	11
2.4.2 Concentración de la solución	11
2.4.3 Peso molecular	11
2.4.4 Tensión superficial	11
2.4.5 Conductividad de la solución	12
2.4.6 Tasa de alimentación	12
2.4.7 Distancia al colector	12
2.5 Matrices	14
2.5.1 Concentrado de proteína de suero de leche	15
2.6 Almacenamiento y viabilidad	15
<b>3. Justificación</b>	16
<b>4. Hipótesis</b>	17
<b>5. Objetivo general</b>	17

<b>SECCIÓN</b>	<b>PÁGINA</b>
5.1 Objetivos particulares	17
<b>6. Material y métodos</b>	18
6.1 Materiales	18
6.2 Cultivo de microorganismo probiótico	18
6.3 Elaboración de las soluciones	18
6.4 Parámetros para la elaboración de las microcápsulas por electro spraying	19
6.5 Análisis y evaluación de las microcápsulas	20
<b>7. Resultados y Discusión</b>	22
7.1 Cultivo del microorganismo probiótico	22
7.2 Elaboración de las soluciones poliméricas	23
7.3 Parámetros para la elaboración de las microcápsulas por electro spraying	24
7.4 Análisis y evaluación de las microcápsulas	26
<b>8. Conclusiones</b>	40
<b>9. Perspectivas</b>	41
<b>10. Bibliografía</b>	42
<b>11. Resumen biográfico</b>	49

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>PÁGINA</b>
Tabla 1. Microorganismos considerados como probióticos	6
Tabla 2. Características bioquímicas y fisiológicas de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	7
Tabla 3. Parámetros del electrospaying	13
Tabla 4. Matrices de biopolímeros para electrospaying	14
Tabla 5. Características de las soluciones procesadas por electrospaying	23
Tabla 6. Parámetros para la elaboración de las microcápsulas en los diferentes formulados	25



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Esquema básico de un equipo de electro spraying/electro spinning	11
Figura 2. Distintos tratamientos probados durante las pruebas de viabilidad	19
Figura 3. Distintas condiciones probadas durante el proceso de electro spraying	20
Figura 4. Cultivo de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (100x)	22
Figura 5. Cultivo de <i>L. acidophilus</i> (derecha) utilizado a una concentración de $2.1 \times 10^9$ células/mL, según la escala de McFarland	22
Figura 6. Liofilizados obtenidos de <i>L. acidophilus</i> en: a) LD/CPSL; b) PBS/CPSL; c) LD y d) PBS (no mostrados)	24
Figura 7. Halos generados en un colector de acero a partir de una solución de PBS/CPSL (izquierda) y PBS/CPSL (derecha), ambas adicionadas con el probiótico	25
Figura 8. Microcápsulas elaboradas a base de concentrado de proteína de suero de leche por electro spraying. Estructuras elaboradas a partir de PBS/CPSL y LD/CPSL (40x, la escala indica $0.25 \mu\text{m}$ entre cada línea).	27
Figura 9. Microscopía de fluorescencia de <i>L. acidophilus</i> en las microcápsulas elaboradas (distintos campos)	28
Figura 10. Imágenes por SEM de las microcápsulas obtenidas. a) LD/CPSL; b) LD/CPSL/ <i>L. acidophilus</i> ; c) PBS/CPSL; d) PBS/CPSL/ <i>L. acidophilus</i> . El diámetro promedio de las estructuras fluctuó entre $1.36$ a $3.08 \mu\text{m}$ .	29
Figura 11. Análisis de FT-IR obtenidos del formulado de LD/CPSL al 40% y los componentes individuales que lo conforman	30

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
Figura 12. <i>L. acidophilus</i> a partir de las microcápsulas generadas mediante la solución de LD/CPSL	31
Figura 13. Viabilidad en almacenamiento a 25 °C de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en los distintos tratamientos	32
Figura 14. Análisis de los tratamientos de forma individual a través del tiempo a 25°C	33
Figura 15. Viabilidad en almacenamiento a 4 °C de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en los distintos tratamientos	34
Figura 16. Análisis de los tratamientos de forma individual a través del tiempo a 4 °C	36
Figura 17. Comparación de la viabilidad del probiótico en las microcápsulas en dos distintas temperaturas	36
Figura 18. Comparación de la viabilidad del probiótico en el liofilizado de LD/LIOF en dos distintas temperaturas	37
Figura 19. Comparación de la viabilidad del probiótico en el liofilizado de LD/CPSL en dos distintas temperaturas	37
Figura 20. Comparación de la viabilidad del probiótico en el liofilizado de PBS/LIOF en dos distintas temperaturas	38
Figura 21. Comparación de la viabilidad del probiótico en el liofilizado de PBS/CPSL en dos distintas temperaturas	38

## RESUMEN

Según la Organización Mundial de la Salud, las bacterias probióticas son microorganismos vivos que confieren beneficios a la salud cuando son administrados en cantidades adecuadas. Debido a que la incorporación directa de estos probióticos a los alimentos reduce su viabilidad, la tecnología de encapsulación de microorganismos probióticos es de gran interés ya que provee protección, mejora la estabilidad y entrega las células blancas en el tracto gastrointestinal. En este trabajo se llevó a cabo un estudio de viabilidad en almacenamiento de un probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) microencapsulado mediante la técnica de electrospraying, utilizando leche descremada (LD) y un concentrado de proteína de suero de leche (CPSL) como matriz protectora que mejora la viabilidad del microorganismo. Primeramente, se llevó a cabo la estandarización de los parámetros físicos del equipo de electrospraying con el fin de lograr las condiciones necesarias para la obtención de microcápsulas conteniendo el probiótico. Después, se evaluó la viabilidad de los microorganismos al almacenamiento tanto a 25 °C como a 4 °C en dos sistemas: a) el microorganismo microencapsulado por electrospraying en PBS o LD con CPSL y b) el microorganismo liofilizado en PBS y LD con y sin CPSL como controles. Se siguió la viabilidad del microorganismo para ambos sistemas (microencapsulado y liofilizado) por método de cuenta en placa cada 15 días durante 45 días. Los resultados revelaron que los microencapsulados de LD y CPSL mostraron estabilidad a través del tiempo tanto a 25 °C como a 4 °C con respecto a los liofilizados de LD, tanto en la primera como en la última medición sin diferencias significativas ( $P > 0.05$ ), mostrando además una mejora sustancial con respecto a los liofilizados a base de PBS ( $P < 0.05$ ). Los resultados en los liofilizados mostraron que el CPSL no proporcionó una mejora sustancial en cuanto a la viabilidad, sin embargo sí se pudo apreciar su uso como matriz necesaria en la formación de las microcápsulas por electrospraying. En conclusión, se comprobó que es posible mantener la viabilidad en almacenamiento de *Lactobacillus acidophilus* mediante la microencapsulación por electrospraying, tanto a 25° como a 4°C durante un período de 45 días como una alternativa a otro proceso de conservación como la liofilización.

## ABSTRACT

The World Health Organization defines probiotic bacteria as live microorganisms that confer health benefits when they are administered in adequate amounts. Because the direct incorporation of these probiotics into food reduces their viability, the encapsulation technology of probiotic microorganisms is of great interest since it provides protection, improves stability and delivers target cells in the gastrointestinal tract. In this work, a storage feasibility study of a microencapsulated probiotic (*Lactobacillus acidophilus*) was carried out using the electrospraying technique, using skimmed milk (LD) and a whey protein concentrate (CPSL) as a protective matrix that improves the viability of the microorganism. Firstly, the standardization of the physical parameters of the electrospraying equipment was carried out in order to achieve the necessary conditions for obtaining microcapsules containing the probiotic. Afterwards, the viability of the microorganisms to storage at both 25 ° C and 4 ° C was evaluated in two systems: a) the microorganism microencapsulated by electrospraying in PBS or LD with CPSL and b) the microorganism lyophilized in PBS and LD with and without CPSL as controls. The viability of the microorganism was followed for both systems (microencapsulated and lyophilized) by the plate count method every 15 days for 45 days. The results revealed that the microencapsulated LD and CPSL showed stability over time at both 25 ° C and 4 ° C with respect to lyophilized LD, both in the first and in the last measurement without significant differences ( $P > 0.05$ ), also showing a substantial improvement with respect to lyophilizates based on PBS ( $P < 0.05$ ). The results in the lyophilizates showed that the CPSL did not provide a substantial improvement in terms of viability, however it could be seen its use as a necessary matrix in the formation of the microcapsules by electrospraying. In conclusion, it was found that it is possible to maintain the viability in storage of *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation by electrospraying, both at 25 ° C and at 4 ° C for a period of 45 days as an alternative to another preservation process such as lyophilization.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios de salud al huésped (Hill *et al.* 2014). Aunque los probióticos son normalmente considerados como productos farmacéuticos, la tendencia actual los está desplazando hacia el sector de alimentos para la salud (Martín *et al.* 2014).

Cuando los probióticos son añadidos a productos alimenticios se ha visto que estos pierden su viabilidad (Amine *et al.* 2014). La mayoría de los alimentos que contienen probióticos son productos lácteos refrigerados, sin embargo el análisis de estos productos en diferentes países ha confirmado que las cepas probióticas exhiben una baja supervivencia en alimentos como productos lácteos y fermentados (Shah 2000). Por tanto, el proveer a células vivientes probióticas con una barrera física que le permita resistir ambientes adversos es un proceso que actualmente ha estado recibiendo gran interés (Chávarri *et al.* 2012).

La encapsulación es un proceso que tiene como meta crear un micro-ambiente en el cual la bacteria sobreviva durante el procesado y el almacenamiento y que además pueda ser liberada en sitios apropiados como el tracto digestivo (Chávarri *et al.* 2012). Dentro de las técnicas más comunes para este objetivo tenemos técnicas como el secado en *spray*, el cruzamiento emulsificante o la coacervación (López-Rubio *et al.* 2012). Sin embargo, estas técnicas involucran el uso de altas temperaturas o agentes orgánicos en por lo menos uno de los pasos de producción, llevando a alguna destrucción de los nutrientes encapsulados, así como problemas de toxicidad asociados con agentes orgánicos residuales (Birnbaum *et al.* 2000). Es por eso que se han buscado alternativas que no involucren condiciones adversas como solventes o temperatura.

El electrospraying/electrospinning son técnicas simples y versátiles a través de las cuales se producen fibras (electrospinning) o cápsulas (electrospraying) generalmente en rangos menores a una micra, presentando una alta relación superficie/volumen y en las cuales dependiendo del material, no se requieren solventes orgánicos para su disolución y

posterior procesamiento ya que se pueden realizar a partir de soluciones acuosas utilizando diferentes matrices como proteínas, biopolímeros o hidrocoloides y ajustando los parámetros del proceso a través de la adición de aditivos en el caso necesario (López-Rubio *et al.* 2012).

La proteína de suero de leche es una matriz con propiedades interesantes para el encapsulamiento como son una buena solubilidad, emulsificación, y viscosidad, además de poder ser transformada a un estado seco usando una variedad de técnicas, lo que brinda una gran ventaja sobre otras matrices.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Historia de los probióticos

El primer antecedente que se tiene en la literatura de organismos probióticos surge a principios del siglo XX cuando Ellie Metchnikoff, realizó el primer estudio sobre la relación entre la flora intestinal y la salud humana, proponiendo en su “Teoría de la longevidad sin envejecimiento”, la hipótesis de que la longevidad de ciertas poblaciones de Europa del Este, era la consecuencia del consumo regular de yogurt, que suprimía la actividad putrefactiva de las bacterias residentes en el intestino, como consecuencia de la actividad benéfica de las bacterias del yogurt (Lozada 2001). En 1906, Henry Tisser observó que niños con diarrea tenían un número reducido de bacterias con una forma característica de Y. Él observó que estas bacterias “bífidas” se encontraban abundantemente en niños sanos, por lo que propuso que fueran administradas a pacientes con diarrea para ayudar a restablecer una flora intestinal saludable (FAO 2006). El término probiótico como tal fue primeramente reportado como el efecto opuesto al de un antibiótico, una estimulación de crecimiento (Lilly y Stilwell 1965). No fue sino hasta 1989 por Fuller que la palabra fue redefinida como “Un suplemento alimenticio de microbios vivos que afecta benéficamente al huésped animal mediante la mejora de su balance intestinal” (FAO 2006). En 1998 finalmente se llegó a la definición actual que dice que “los probióticos son microorganismos vivos, que cuando son consumidos en cantidades adecuadas, confieren un efecto en la salud del huésped” (Guarner y Schaafsma 1998). Actualmente, el mercado global de los probióticos se considera aún incipiente a pesar de que se espera que para 2019 llegue a generar ganancias de aproximadamente 44 mil millones de dólares (Technavio 2016)

### 2.2 Características de los probióticos

Estos microorganismos se componen principalmente de bacterias ácido lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los *Lactobacillus* son bacilos gram positivos, no esporulados, aerotolerantes, acidotolerantes, catalasa negativa, carentes de citocromo, estrictamente fermentadores y productores principalmente de ácido láctico. Las *Bifidobacterium* son cocobacilos gram positivos, no esporulados,

generalmente anaerobios estrictos (Salazar y Montoya 2003a). Una lista de los microorganismos considerados probióticos se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1. Microorganismos considerados como probióticos**

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Otras bacterias ácido lácticas	No ácido lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>B. cereus</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. coli nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. termophilus</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>		
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus GG</i>			

(Williams, 2010; Holzapfel, 2001).

### 2.2.1 Características de *Lactobacillus acidophilus*

Este microorganismo es un bastón gram positivo de extremos redondeados que aparecen como células únicas, así como en pares o en cadenas cortas. Su tamaño típico es de 0.6 a 0.9  $\mu\text{m}$  de longitud. No son flagelados, son no móviles, además de no ser formadores de esporas, y ser intolerantes a la sal. Este microorganismo no posee citocromos, y por lo tanto es bencidina negativo. Además, es microaerófilo y por lo tanto su crecimiento en superficie es potenciado en medio sólido mediante un proceso de anaerobiosis o una presión de oxígeno reducida, además de una concentración de 5 a 10% de  $\text{CO}_2$ . Su crecimiento ocurre a temperaturas de hasta 45  $^{\circ}\text{C}$ , pero su rango óptimo es entre 35 y 40 $^{\circ}\text{C}$ . Es ácido tolerante, pero encuentra sus condiciones de pH óptimo entre 5.5 a 6.0 (Gomes y Malcata 1999). Otras de sus características se presentan en la tabla 2.



**Tabla 2. Características bioquímicas y fisiológicas de *Lactobacillus acidophilus***

<b>Característica</b>	<b><i>L. acidophilus</i></b>
<i>Fisiología</i>	Microaerófila
<i>Composición de la pared celular</i>	Lys-D Asp
<i>Composición de fosfolípidos/ácidos teicoicos</i>	Glicerol
<i>Composición de DNA-base Mol% G+C (guanina+citosina)</i>	34-37
<i>Configuración ácido-láctica</i>	DL
<i>Metabolismo de azúcares</i>	Homofermentativo

(Modificado de Gomes y Malcata 1999)

### **2.2.2 Parámetros de los microorganismos para uso como probiótico**

Estos microorganismos deben cumplir ciertos parámetros que aseguren su crecimiento y supervivencia para que resulten efectivos en los alimentos a los que se adicionan. El primer parámetro es tener una buena viabilidad, es decir es la capacidad de estos probióticos de permanecer vivos, tanto en el alimento como en el intestino del consumidor durante un tiempo determinado (Heller 2001), presentar una concentración de células viables de más de  $10^6$  UFC/g (Favaro-Trindade *et al.* 2011), poder resistir las concentraciones de ácido y sales biliares del tracto digestivo de los seres humanos o animales, tener la capacidad de sintetizar un biosurfactante de composición glicoproteica el cual facilite su adhesión a las células de los intestinos y puedan competir con organismos enteropatógenos en la colonización (Conway *et al.* 1987), así como producir sustancias antimicrobianas diversas como ácido láctico, fórmico, acético, peróxido de hidrógeno, además de sustancias conocidas como bacteriocinas (Salazar y Montoya 2003b).

### **2.2.3 Beneficios de los microorganismos probióticos**

El incremento en la popularidad de los alimentos que no solo nutran sino que también tengan beneficios a la salud ha ayudado al auge de los alimentos enriquecidos con probióticos. Algunos de los beneficios de estos microorganismos se han investigado en los trabajos que se muestran a continuación.

*Facilitadores de la digestibilidad de la lactosa.* Al liberar la enzima  $\beta$ -galactosidasa estos microorganismos hidrolizan lactosa lo que evita que personas intolerantes a este carbohidrato, presenten síntomas variados como dolor abdominal, flatulencias y diarrea, al consumir productos lácteos (Goldin y Gorbach 1984; De Vrese *et al.* 2001).

*Protección contra enfermedades gastrointestinales.* Mediante la recuperación del balance de la flora intestinal que evita la adhesión de patógenos que pueden ser agentes causantes de afecciones diversas como gastroenteritis, diarrea del viajero, inflamaciones intestinales, así como el síndrome del colon irritable (Marteau *et al.* 2001).

*Proteger contra infecciones del tracto urogenital.* Mediante el consumo de probióticos se han obtenido resultados favorables en la restauración de la microbiota natural urogenital benéfica, mediante el desplazamiento de los causantes de la inflamación (Reid 2001).

*Protección contra infecciones respiratorias.* Los microorganismos probióticos aumentan la actividad fagocítica de macrófagos alveolares que actúan sobre microorganismos patógenos presentes en las vías respiratorias. En un estudio se encontró una reducción de 19% en los casos de enfermedades como otitis media, sinusitis, bronquitis y neumonías en un grupo de 571 niños que fueron alimentados con leche adicionada con *Lactobacillus GG* (Hatakka *et al.* 2001).

### **2.3 Encapsulación**

La encapsulación es un proceso mecánico o fisicoquímico para atrapar una sustancia o ingrediente activo (núcleo) en otro material (matriz), proveyendo protección y una liberación controlada, para así producir partículas con diámetros que van desde unos pocos nanómetros a unos cuantos milímetros (Chen y Chen 2007). Según Champagne y Kalisapathy (2008), la encapsulación de probióticos es usada para proveer de una barrera

de defensa contra un ambiente hostil, más que una liberación controlada (Burgain *et al.* 2011). Las sustancias encapsuladas llamadas el material central, son dispersadas en una matriz que debe ser de grado alimenticio para el caso de probióticos (Zuidam y Shimoni 2010).

Las técnicas de encapsulación buscan potenciar la estabilidad contra la degradación así como, mejorar la biodisponibilidad. Actualmente existen diversas tecnologías de encapsulamiento para diferentes activos sin embargo en el caso de la encapsulación de microorganismos, hay que considerar que estos son sensibles al contenido de humedad, las altas temperaturas, la agitación, así como el oxígeno y el pH, por lo que es importante que las matrices alimenticias utilizadas sean producidas a condiciones suaves como bajas temperaturas, agitaciones controladas, pH moderado y pequeña presencia de oxígeno (Martín *et al* 2014). Otro factor a considerar para el proceso de encapsulación es el tamaño de partícula que debe ser suficientemente grande para encerrar al probiótico, pero lo suficientemente pequeño para no causar cambios en las características de textura del producto. Ha sido reportado que este umbral se encuentra en su punto superior alrededor de los 80  $\mu\text{m}$  (Lawless y Heymann 2010). Finalmente el mecanismo de liberación del microorganismo dependerá en la tecnología utilizada y el material para el recubrimiento, aunque en la mayoría de los casos esto sucede debido a cambios en el pH, agentes quelantes o acción enzimática (Martín *et al* 2014).

### **2.3.1 Técnicas de encapsulación**

Una variedad de técnicas han sido utilizadas para encapsular componentes funcionales, como la coacervación (Mauguet *et al.* 2002), y el secado por atomización (Bruschi *et al.* 2003). Entre estos métodos, el secado por atomización es actualmente el método más común en la industria alimentaria para producir aditivos para las aplicaciones alimenticias.

En el secado por atomización el material activo a ser encapsulado a través de la técnica es dispersado en una solución de polímero acarreadora la cual es atomizada en pequeñas gotas. El solvente utilizado se evapora utilizando un gas caliente y el resultado son cápsulas sólidas recolectadas como un polvo seco (Gharsalloui *et al.* 2007; Gibbs *et al.* 1999). Cabe señalar que esta tecnología puede usar soluciones acuosas y no solamente

solventes orgánicos, que en el caso de la encapsulación de organismos probióticos para su uso en alimentos puede ocasionar problemas de toxicidad. Sin embargo, la tecnología necesita altas temperaturas para eliminar el agua de la solución polimérica, por lo que este punto podría afectar la estabilidad del ingrediente activo (Pérez-Masiá *et al.* 2015).

### **2.3.2 Tecnología del electrospraying**

Aparte de la tecnología antes expuesta, el electrospraying también conocido como atomización electrohidrodinámica (EHDA), ha surgido como una tecnología alternativa barata que puede ser utilizada para la encapsulación. Aparte de ser una técnica simple, posee algunas ventajas como no necesitar de ciertas temperaturas o solventes orgánicos, por lo que se puede considerar un método ideal para proteger los ingredientes sensibles encapsulados.

Esta técnica involucra la aplicación de altos voltajes a un líquido que fluye a través de un capilar conectado a un electrodo. Las cargas eléctricas compiten con la tensión superficial del líquido para deformar su superficie a una forma cónica, llamada el “Cono de Taylor”. Llegando a un valor crítico, las fuerzas electrostáticas superan la de la tensión superficial, causando el rompimiento de la superficie del líquido en la punta del capilar, ocasionando pequeñas gotas de tamaños micro a nanométricos. Las gotas cargadas viajan hacia un colector conectado a tierra, mientras que la solución acuosa o solvente se evapora y las partículas solidificadas son recolectadas (Brandenberger *et al.* 1999; Hartman *et al.* 2000). Cabe señalar que al cambiar los valores al momento de realizar el electrospraying, o por las características intrínsecas del biopolímero usado, en lugar de generar cápsulas se pueden generar fibras ultra delgadas, a este proceso se le conoce como el electrospinning. En la figura 1 se muestra un esquema básico de un equipo de electrospraying/electrospinning.

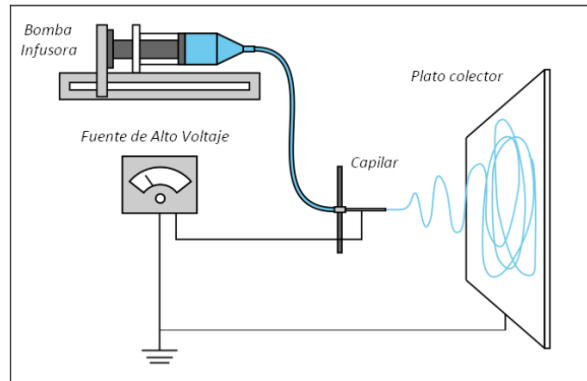


Figura 1. Esquema básico de un equipo de electrospaying/electrospinning. (Sánchez *et al.* 2013)

## 2.4 Parámetros de la solución

### 2.4.1 Viscosidad

Es uno de los parámetros más significativos influenciando la formación de cápsulas o fibras. En soluciones más viscosas, la formación de microcápsulas y perlas en las fibras es menos probable, y si se forman el diámetro de estas se hace más grande mientras la viscosidad se incrementa (Haghi y Akbari 2007).

### 2.4.2 Concentración de la solución

Para la formación de fibras se necesita una mínima concentración, cuando esta última se incrementa la formación de cápsulas también (Haghi y Akbari 2007).

### 2.4.3 Peso molecular

Se ha observado que las soluciones con bajos pesos moleculares tienden a formar cápsulas en lugar de fibras y de forma inversa, soluciones con altos pesos moleculares dan lugar a fibras con diámetros superiores al promedio (Haghi y Akbari 2007).

### 2.4.4 Tensión superficial

Al reducir este parámetro se ha encontrado la obtención de fibras sin perlas, además que parece estar más en función del solvente utilizado. Generalmente, la tensión superficial determina el rango superior e inferior de la ventana para electrospaying/electrospinning si todas las otras variables se mantienen constantes (Haghi y Akbari 2007).

#### **2.4.5 Conductividad de la solución**

Hay una evidente caída en el diámetro de las fibras formadas cuando se incrementa la conductividad, sin embargo en el caso de las cápsulas estas incrementan su formación al decaer la conductividad (Haghi y Akbari 2007).

#### **2.4.6 Tasa de alimentación**

Las estructuras morfológicas pueden presentar variaciones al cambiar la velocidad del flujo de la solución. Cuando este parámetro llega a un valor crítico, se presenta la formación de un cono inestable y a la formación de cápsulas en lugar de fibras o perlas sobre estas (Haghi y Akbari 2007).

#### **2.4.7 Distancia al colector**

Este punto ha sido tomado en cuenta como otro parámetro que influye en la formación de estructuras por medio de esta técnica, ya que se ha visto que al incrementarse la distancia entre el capilar y el colector se le da tiempo suficiente a la solución para formar fibras, mientras que si se tiene una distancia muy corta o muy larga lo que se llega a formar son cápsulas (Pham *et al.* 2006)

Como se puede apreciar existen muchos parámetros que pueden influir en la producción de las microcápsulas por esta técnica. Además de los anteriores presentados, existen otros como son la temperatura, humedad, velocidad del aire así mismo, propiedades de la solución como la elasticidad del biopolímero. Otros parámetros que están relacionados son las condiciones en que está montado el equipo de electrospraying, como son la distancia entre la punta del capilar y el receptor, el potencial eléctrico y la forma del colector, entre otras (Wendorff *et al.* 2012). En la tabla 3 se presentan condensados los parámetros que influyen en la formación de las microcápsulas o fibras.

**Tabla 3. Parámetros del electrospaying**

Parámetro		Característica que aporta
<b>Concentración de la solución del polímero</b>	↑	Dificulta el paso de la solución a través del capilar
	↓	Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al plato colector
<b>Tensión superficial</b>	↑	Aparición de cápsulas
	↓	Obtención de fibras lisas
<b>Conductividad de la solución</b>	↑	Mayor transporte de cargas, mayor estiramiento de la solución, fibras más delgadas
	↓	Menor transporte de cargas, menor estiramiento de la solución, fibras más gruesas
<b>Voltaje</b>	↑↑	Fibras gruesas, distorsión del jet, aparición de cápsulas
	↓	Poco impulso para llegada de la solución al plato colector
<b>Flujo de salida</b>	↑	Fibras más gruesas, cápsulas de mayores tamaños
	↓	Mayor tiempo para evaporación del solvente, fibras sin defectos
<b>Distancia aguja-colector</b>	↑	Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución, obtención de fibras delgadas.
	↑↑	Aparición de cápsulas al trabajar con muy altas o muy bajas distancias
	↓↓	
	↓	Poco tiempo para la evaporación del solvente por tanto, las fibras llegan húmedas al plato colector
<b>Humedad relativa</b>	↑	Aparición de poros en nanofibras

Sánchez *et al.* 2013

## 2.5 Matrices

Los biopolímeros, como los polisacáridos, proteínas y lípidos, son interesantes para la encapsulación en el área de alimentos porque ofrecen protección por medios naturales, son biológicamente reproducibles, biodegradables, biocompatibles, y comestibles (Pérez-Masiá *et al.* 2014).

Estas matrices son muy convenientes en aplicaciones alimenticias ya que así se evitan problemas de toxicidad al no tener que usar solventes orgánicos. Sin embargo, el electrospraying de matrices hidrocoloides ha probado tener dificultades debido a la naturaleza polielectrolítica de estas. Además, la alta tensión superficial del agua, así como la ionización de moléculas de esta a altos voltajes en un ambiente con aire que provoca un efecto corona, complica el proceso. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que es posible obtener cápsulas a partir de hidrocoloides ajustando las propiedades de las soluciones acuosas, principalmente la tensión superficial y la viscosidad mediante la adición de surfactantes y gomas como aditivos (Pérez-Masiá *et al.* 2014). En la Tabla 4 se muestran algunos ejemplos de diferentes matrices y algunas de sus características en el electrospraying.

**Tabla 4. Matrices de biopolímeros para electrospraying.**

<b>Matriz</b>	<b>Morfología</b>	<b>Tamaño promedio de cápsula (en micras)</b>
<b>PVOH (Mw~100,000)</b>	Cápsulas y fibras	0.7±0.2
<b>PEO (Mw~200,000)</b>	Cápsulas y fibras	0.5±0.1
<b>Dextrano (Mw~70,000)</b>	Cápsulas	0.9±0.5
<b>Pululano (Mw~100,000)</b>	Cápsulas y fibras	1.0±0.7
<b>WPC (Mw~20,000–70,000)</b>	Múltiples partículas y cápsulas	1.0±0.6

PVOH: Polivinil alcohol; PEO: Óxido de polietileno; WPC: Proteína concentrada de suero de leche. (Modificado de Pérez-Masiá *et al.* 2014).



### **2.5.1 Concentrado de Proteína de suero de leche**

Es una matriz compuesta de diferentes fracciones proteínicas,  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, inmunoglobulinas y suero de albúmina principalmente, son proteínas globulares que pueden permanecer en solución en un amplio rango de pH. Estas proteínas tienen una buena habilidad de encapsulación debido a su eficiente emulsificación, solubilidad, viscosidad, propiedades de formación de geles y películas, así como de eficientemente atrapar compuestos volátiles y no volátiles en su matriz. Estas características son atribuidas a la habilidad de unión de su contenido de carbohidratos y lípidos. Además, la desnaturalización de la proteína de suero de leche libera grupos disulfuro lo que facilita la formación de redes estables tridimensionales para atrapar compuestos efectivamente. Esta desnaturalización también contribuye a sus características emulsificantes y por tanto su capacidad de encapsulamiento (Anandharamakrishnan 2015).

### **2.6 Almacenamiento y viabilidad**

Trabajos previos han demostrado que la encapsulación basada en estructuras hidrocoloides y proteínas tiene la habilidad de prolongar la supervivencia de organismos probióticos durante periodos prolongados en comparación de microorganismos no encapsulados y sometidos a condiciones variadas que van desde los 4 °C a temperatura ambiente y entre 0 a 75 % de condiciones de humedad (López-Rubio *et al.* 2012).

Además de las matrices, se ha demostrado que el uso de medios líquidos, específicamente leche descremada, puede ser un factor importante y actuar como protector de los microorganismos en condiciones extremas de almacenamiento (Cody *et al.* 2008).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso de microorganismos probióticos se ha visto en auge en los últimos años debido al incremento en la búsqueda de productos que confieran beneficios a la salud, y que además tengan un origen natural, características que presentan estos microorganismos debido a que normalmente se pueden encontrar en productos lácticos y fermentados. A través de diversos estudios, se le han atribuido importantes beneficios a los microorganismos probióticos, que van desde la protección contra enfermedades gastrointestinales, facilitadores de la digestión, así como defensa contra infecciones respiratorias o urogenitales. Sin embargo, se necesitan alcanzar diversos requisitos para que los probióticos puedan proporcionar beneficios reales a la salud, como son presentar estabilidad frente a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal como lo son los ácidos gástricos y la bilis, además de poder encontrarse en concentraciones adecuadas, por lo que necesitan presentar una supervivencia a condiciones de procesamiento y de almacenamiento diversas. Para sortear estas dificultades, en este trabajo se propone la generación de microencapsulados de un probiótico a partir de una matriz a base de un concentrado de proteína de suero de leche, mediante la tecnología conocida como electrospraying. Esta tecnología permite la generación de microcápsulas de una forma sencilla y amigable (en comparación con otras técnicas de encapsulación), que permite recubrir a los microorganismos probióticos y les confiere resistencia a las condiciones adversas del tracto digestivo, así como presentar una mejora en su supervivencia a diferentes condiciones de almacenamiento, lo que conlleva a obtener productos de probióticos con beneficios reales a la salud humana.

## **4. HIPÓTESIS**

Las microcápsulas elaboradas por electrospraying utilizando como matriz un concentrado de proteína de suero de leche, mejoran la viabilidad y estabilidad del microorganismo probiótico.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Obtener un microencapsulado por técnica de electrospraying de un microorganismo probiótico utilizando como matriz un concentrado de proteína de suero de leche.

### **5.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

Estandarización de los parámetros de electrospraying para la elaboración de las microcápsulas.

Obtención de microcápsulas con el probiótico mediante la técnica de electrospraying.

Evaluación de la estabilidad en almacenamiento de las microcápsulas elaboradas, en cuanto a la viabilidad del microorganismo.

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1 Materiales:

Se utilizó como polímero un concentrado de proteína de suero de leche 80 bajo el nombre comercial Lacprodan (CPSL o WPC por sus siglas en inglés) donado por ARLA Foods ® y con una composición de 80g de proteína, 9g de lactosa y 8g de lípidos por cada 100 gramos del producto. Como solventes se utilizó leche descremada Lala® deslactosada light, con porcentaje de grasa del 0.5% así como una solución de búfer de fosfatos salino (PBS). La cepa utilizada de *Lactobacillus acidophilus* se obtuvo a partir de un comprimido. El medio de crecimiento bacteriano utilizado fue el Man, Rogosa y Sharp (MRS).

### 6.2 Cultivo de microorganismo probiótico

El microorganismo *Lactobacillus acidophilus* fue cultivado en medio MRS (pH final 6.2 +/- 0.2 a 25 °C). Después de ser incubadas las bacterias en 25 mL de caldo MRS a 37°C en un condiciones de microaerofilia, las células fueron colectadas mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos, lavadas dos veces en 20 mL de PBS, centrifugando después de cada lavada y resuspendidas en los distintos sistemas a probar ajustando a una concentración de 10<sup>9</sup> células/ml, por la técnica de McFarland. A través de una cinética de crecimiento se determinó la fase exponencial para obtener la mayor cantidad de biomasa del microorganismo. Para la determinación de la concentración bacteriana de 10<sup>9</sup> células/mL se realizó la técnica de McFarland, para ello se utilizaron diez tubos, donde a cada uno le fue agregado de 9.9 a 9.0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% y posteriormente se les adicionó BaCl<sub>2</sub> de 0.1 a 1.0 mL al 1% respectivamente, esto generó un precipitado de BaSO<sub>4</sub> en cada tubo con diferentes niveles de turbidez que puede ser relacionado con diferentes concentraciones de bacterias previamente establecidas en la técnica.

### 6.3 Elaboración de la soluciones

Se elaboraron las soluciones del concentrado de proteína de suero de leche disuelto en medio PBS y leche descremada a concentraciones de 40%.

Los sistemas utilizados fueron los siguientes: a) Células disueltas en PBS y leche descremada liofilizadas, respectivamente; b) células disueltas en PBS y en leche descremada adicionadas con CPSL, respectivamente y liofilizadas; y c) células disueltas en PBS y en leche descremada adicionadas con CPSL, respectivamente y encapsuladas por electrospaying para la obtención de las microcápsulas. Las muestras obtenidas liofilizadas y encapsuladas, fueron almacenadas a dos condiciones de temperatura (25°C y 4°C).

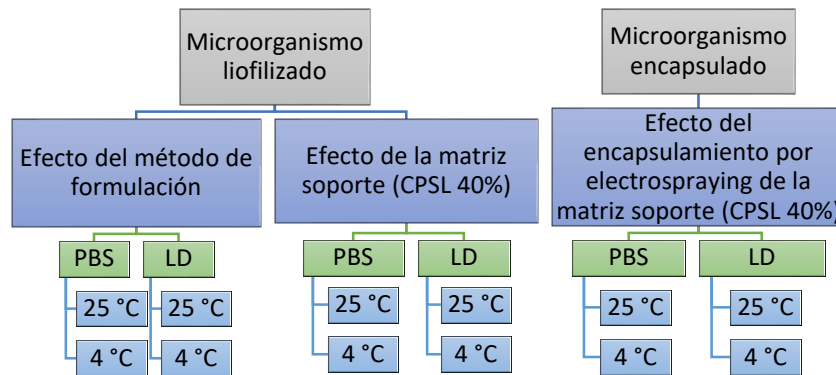


Figura 2. Distintos tratamientos probados durante las pruebas de viabilidad

#### 6.4 Parámetros para la elaboración de las microcápsulas por electrospaying

Para la técnica de electrospaying se utilizó un equipo marca NaBond con una fuente de poder de 0-30kV. El ánodo se fijó a una aguja de acero inoxidable (0.9mm) conectada a través de un cable de PTFE a una jeringa de plástico de 20 mL. La jeringa conteniendo la solución de concentrado de proteína de suero de leche se puso de manera horizontal y fue controlada de manera digital por una bomba. El electrodo a tierra de cobre fue conectado a una placa de acero donde las microcápsulas fueron colectadas. La distancia entre la aguja y el colector fue de 7 centímetros y posicionado de manera vertical. Los voltajes para la obtención de las cápsulas fueron obtenidos usando un voltaje de 22 a 25 kV a una tasa de flujo de 0.2mL/h. Estos parámetros se encuentran esquematizados en la figura 3.

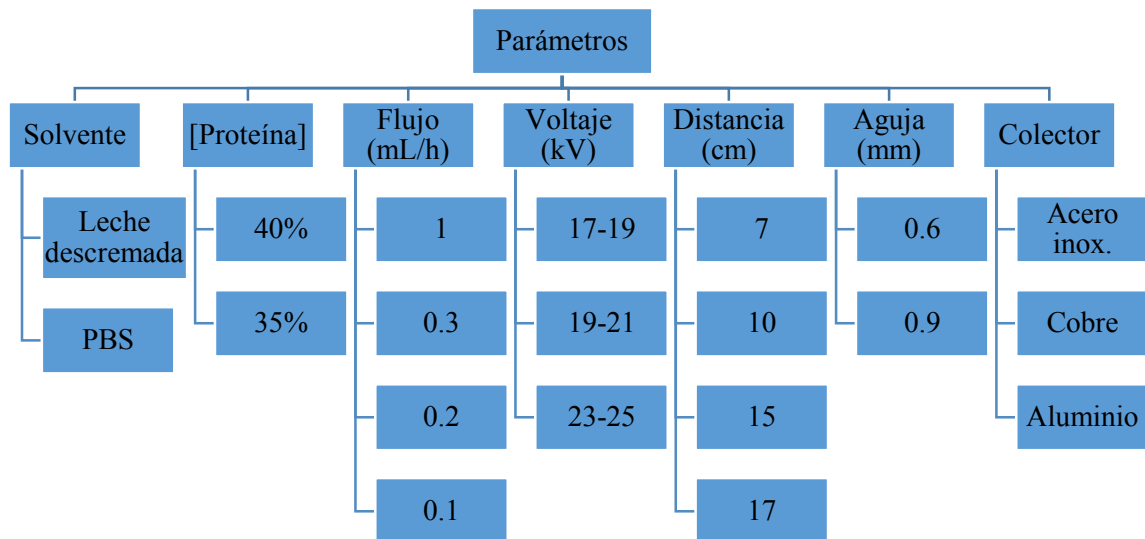


Figura 3. Distintas condiciones probadas durante el proceso de electrospaying.

### 6.5 Análisis y evaluación de las microcápsulas

Se realizó un análisis de la morfología y el tamaño de las microcápsulas mediante un microscopio óptico con un objetivo con escala graduada.

Con el objetivo de analizar que la presencia y distribución de las células dentro de las microcápsulas formadas se llevó a cabo el marcaje de estas con el marcador de isotiocianato de fluoresceína isómero I y se observaron mediante microscopía óptica de fluorescencia.

Un análisis más detallado de la morfología de las microcápsulas se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) apoyado con el software especializado (ImageJ).

El análisis de la composición de las soluciones empleadas en el proceso de microencapsulación así como de las microcápsulas se llevó a cabo por espectroscopia de infrarrojo (ATR-FTIR) en un equipo Thermo Scientific Nicolet iS10, con lecturas en las regiones de los 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  de acuerdo a lo reportado en la bibliografía.

La resistencia del microorganismo al proceso de encapsulamiento por electrospaying así como su estabilidad al almacenamiento, se evaluó determinando la viabilidad celular a

través de la técnica de cuenta viable en placa. Para esto una alícuota de los diferentes tratamientos y sus respectivos controles se diluyeron en PBS a temperatura ambiente por 1 hora, respectivamente, las diluciones en serie se cultivaron en agar MRS e incubaron a condiciones óptimas para el microorganismo, posteriormente se determinó el número de unidades formadoras de colonias (CFU). Las pruebas se realizaron por triplicado.

Para el análisis de diferencias significativas en viabilidad en los diferentes tratamientos se realizaron pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, mediante el paquete estadístico SPSS 20.0 (IBM Corporation) y R.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Cultivo del microorganismo probiótico

Se obtuvieron cultivos del microorganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* en caldo Man-Rogosa y Sharp (MRS) en condiciones microaerofílicas y 37°C; la morfología bacilar característica se observó mediante una tinción de Gram (figura 4).

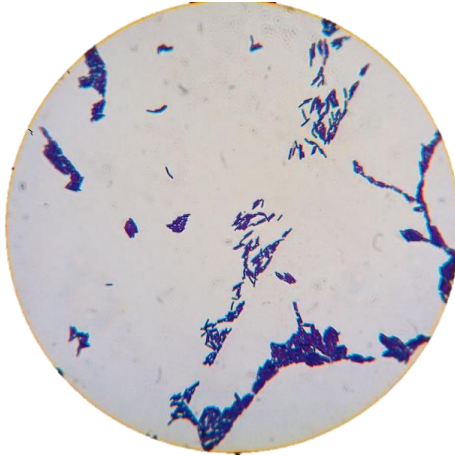


Figura 4. Cultivo del *Lactobacillus acidophilus* (100x)

La concentración inicial de *Lactobacillus acidophilus* en los diferentes tratamientos (microcápsulas y liofilizados) fue de  $2.1 \times 10^9$  UFC/mL, en base a la cinética de crecimiento del microorganismo.



Figura 5. Cultivo de *L. acidophilus* (derecha) a una concentración de  $2.1 \times 10^9$  células/mL, según la escala de McFarland.



## 7.2 Resultados de la elaboración de las soluciones

De las dos concentraciones de CPSL probadas en la metodología se seleccionó la concentración de 40% tanto en leche descremada como en el búfer de PBS, para obtener un flujo óptimo en el electrospaying; dicha concentración coincide con lo reportado en una investigación anterior donde se probó proteína de suero de leche en soluciones acuosas (López-Rubio y Lagarón 2012). La caracterización de las soluciones utilizadas se realizó mediante los parámetros de viscosidad, pH y conductividad. Estos parámetros se tomaron en cuenta debido a su importancia en la elaboración de microcápsulas por electrospaying y son mostrados en la tabla 5. Se pudo observar que el pH de ambas soluciones se encontró en un valor cercano a lo reportado en el trabajo previamente citado donde se demuestra estabilidad del proceso de electrospaying en CPSL en soluciones acuosas a pH alrededor de 5.5. La conductividad obtenida, así como la viscosidad de ambas soluciones mostraron valores esperados de acuerdo a su composición. Se obtuvo una alta conductividad en la solución a base de sales (PBS) en comparación de aquella de LD, donde a pesar de que el valor de conductividad es directamente proporcional a la concentración de sólidos disueltos, en el PBS se obtuvieron valores más altos debido a su gran cantidad de sustancias electrolíticas disueltas que permiten de una manera fácil el paso de la corriente eléctrica; en cambio, la viscosidad fue mucho más alta en la solución de LD debido a una mayor cantidad de sólidos disueltos como proteínas, azúcares y grasas. Ambos parámetros representaron diferencias en algunas condiciones usadas durante la técnica de electrospaying, donde la solución de sales necesitó de un incremento en el voltaje aplicado para un flujo constante y obtener un mayor rendimiento en la cantidad de producto, por otro lado, de forma paralela la solución con LD necesitó de un voltaje menor; estos ajustes a las condiciones del proceso de electrospaying coincidieron con lo reportado por Sánchez, 2013 (Tabla 3).

**Tabla 5. Características de las soluciones procesadas por electrospaying**

Solvente	CPSL	Viscosidad	pH	Conductividad mS
<b>LD</b>	40%	232.2	6.0	4.1
<b>PBS</b>	40%	76.1	6.15	8.88

CPSL (concentrado de proteína de suero de leche); mS (millisiemens)

La figura 6 corresponde a los liofilizados preparados de LD/CPSL, PBS/CPSL, LD y PBS que fueron utilizados como control en las pruebas de viabilidad y contrastados con los resultados en las microcápsulas elaboradas por electrospraying.

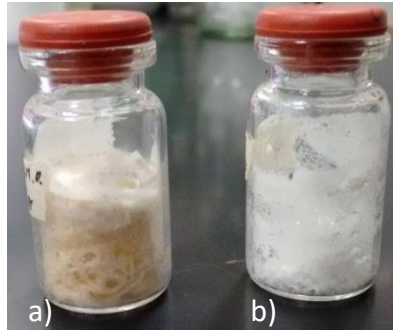


Figura 6. Liofilizados obtenidos de *L. acidophilus* en: a) LD/CPSL; b) PBS/CPSL; c) LD y d) PBS (no mostrados).

### 7.3 Parámetros para la elaboración de las microcápsulas por electrospraying

Una vez determinadas las características de las soluciones a utilizarse con el probiótico, se llevó a cabo la estandarización de los parámetros del electrospraying para la obtención de las microcápsulas con estas soluciones. Los parámetros obtenidos se encuentran en la tabla 6. En cuanto al voltaje aplicado, este se encontró en un rango de 21 a 22kV y de 24 a 25kV para las soluciones de LD/CPSL y PBS/CPSL respectivamente, este parámetro es de gran importancia debido a que determina el punto en que se forma el cono de Taylor que es donde las cargas eléctricas compiten con la tensión superficial de las soluciones utilizadas y deforman el líquido en la punta del capilar usado generando pequeñas gotas, las cuales deberán ser rápidamente dispersadas debido a las fuerzas de repulsión. Los valores de voltaje requerido para lograr la formación de las microcápsulas en ambas mezclas fueron mayores a los reportados en trabajos previos. En cuanto a la velocidad del flujo de las soluciones se encontró dentro de los rangos utilizados en trabajos previos, así como la distancia que es importante debido a que permite que las soluciones tengan el tiempo suficiente para evaporar la solución acuosa y obtener el material seco en el colector. El diámetro de la aguja que se decidió utilizar fue de 0.9 mm de diámetro interno debido que permitió un flujo más uniforme y con mejores resultados, mientras que el

colector que se utilizó fue una placa fija de acero inoxidable, (en lugar del cobre y el aluminio) ya que fue la que la que permitió obtener mayor cantidad de material y redujo la cantidad de producto húmedo debido al goteo de la aguja por una débil formación del cono de Taylor (Gómez-Mascaraque *et al.* 2016; López-Rubio *et al.* 2012).

**Tabla 6. Parámetros para la elaboración de las microcápsulas en los diferentes formulados**

Formulado	Voltaje (kV)	Flujo (mL/h)	Distancia (cm)	Tiempo (min)	Aguja (diámetro interno) (mm)	Colector
LD/CPSL	21-22	0.2	7	60	0.9	Acero inoxidable
PBS/CPSL	24-25	0.2	7	60	0.9	Acero inoxidable

En cuanto la producción alcanzada de microcápsulas en p/p, a partir de cada una de las mezclas LD/CPSL y PBS/CPSL, en el caso de las microcápsulas obtenidas de la primera mezcla, se obtuvo una producción promedio de 60 mg de material por hora, mientras que en el caso del PBS/CPSL se obtuvo entre 1 y 2 mg por hora.

En la figura 7, se muestran los halos obtenidos por electrospaying del material seco producido a partir de las mezclas LD/CPSL y PBS/CPSL. Esta gran diferencia en la producción con ambos disolventes es debido a la viscosidad a causa de los sólidos con los que cuenta la leche descremada como son carbohidratos, grasas y proteínas lo que mejora las características de la mezcla al ser procesadas por electrospaying (Pérez-Masiá *et al.* 2014).



Figura 7. Halos generados en un colector de acero a partir de una solución de PBS/CPSL (izquierda) y PBS/CPSL (derecha), ambas adicionadas con el probiótico.

#### 7.4 Análisis y evaluación de las microcápsulas

Las imágenes obtenidas por microscopía óptica de las microcápsulas elaboradas con las mezclas de PBS/CPSL y LD/CPSL conteniendo el probiótico se muestran en la figura 8. En la imagen a), se puede observar las microcápsulas de la solución a base de PBS/CPSL en donde se aprecian las estructuras esféricas obtenidas, menores a 1 micra, tamaño que coincide con lo reportado en la literatura (López-Rubio y Lagarón 2012). Cabe señalar que este tamaño parece no ser óptimo para la encapsulación de *L. acidophilus* ya que este microorganismo presenta un tamaño promedio a lo largo de entre 2 y 4 micras (Holt 1994) por lo que estas dimensiones podrían llegar a afectar la viabilidad de los microorganismos incorporados al deformar su estructura. Para el caso de las microcápsulas de LD/CPSL obtenidas en la imagen b), estas mostraron un tamaño de entre 2.5 y 3 micras de diámetro, este resultado coincide con lo reportado por López-Rubio 2012, por lo que en contraste con las microcápsulas de PBS, estas presentan un incremento en dimensiones de al menos 5 veces. Según un trabajo previo (López-Rubio y Lagarón 2012), el pH parecer tener implicaciones en cuanto al tamaño obtenido de las microcápsulas debido a variaciones de la tensión superficial; en este trabajo citado se utilizó una solución de CPSL que se probó a diferentes niveles de pH, en donde se encontró que se elevó de manera considerable la cantidad de microcápsulas de entre 2 a 3 micras a pH entre 5.5 y 6.4, lo que coincide con los resultados obtenidos de la mezcla de LD/CPSL, que presentaba un pH cercano a 6. Para los dos casos, se puede observar que la formación de microcápsulas mediante la técnica de electrospraying llevo a la generación de estructuras de tamaños mucho menores a otras técnicas más comunes de encapsulamiento de ingredientes activos (Rokka y Rantamaki 2010). Además, aunque se han establecido hipótesis en trabajos previos que tamaños de las microcápsulas menores a las dimensiones de la bacteria pueden llegar afectar su viabilidad, el obtener microcápsulas de tamaño pequeño es una característica deseable ya que de esta manera si estas son añadidas se afecta en menor medida la textura de los alimentos y su apariencia, así como el impacto en los parámetros del proceso de elaboración; además puede verse incrementada la fuerza adhesiva y poseer un tiempo de tránsito gastrointestinal más prolongado (Chen *et al.* 2006).

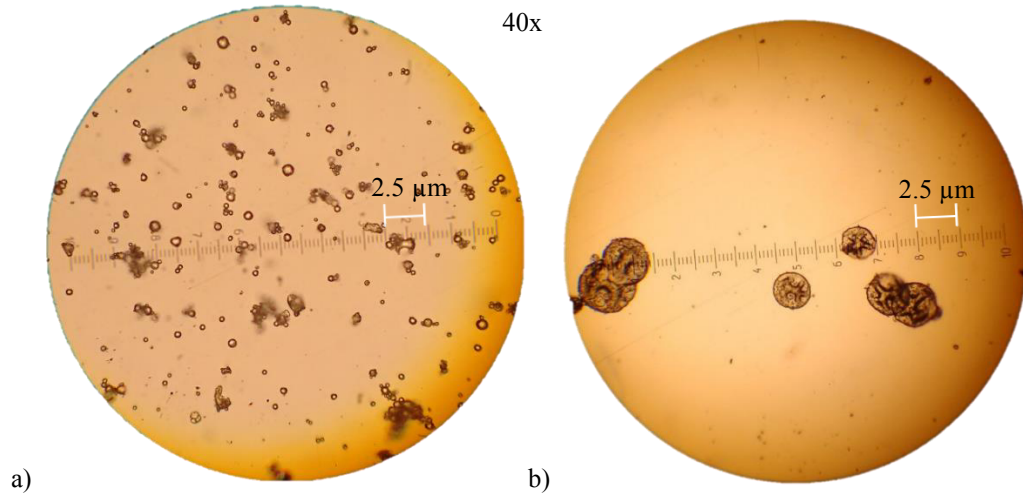


Figura 8. Microcápsulas elaboradas a base de concentrado de proteína de suero de leche por electrospaying. Estructuras elaboradas a partir de PBS/CPSL y LD/CPSL (40x, la escala indica 0.25  $\mu\text{m}$  entre cada línea).

La presencia de *Lactobacillus acidophilus* a las microcápsulas obtenidas fue confirmado por la prueba de microscopía de fluorescencia; en la figura 9, se puede observar la presencia de la bacteria que fue marcada con isotiocianato de fluoresceína, en este caso ambas imágenes corresponden a la misma muestra de microcápsulas a base de LD/CPSL en distintos campos de observación, y en ellos se puede apreciar la morfología bacilar característica de este microorganismo del género *Lactobacillus*. A pesar de detectar mediante esta técnica la presencia de la bacteria, no fue posible con ella conocer si el microorganismo se encontraba dentro de las microcápsulas por lo que se realizó otra aproximación mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM), por sus siglas en inglés, para posteriormente considerar una microencapsulación exitosa al evaluar viabilidad del probiótico.

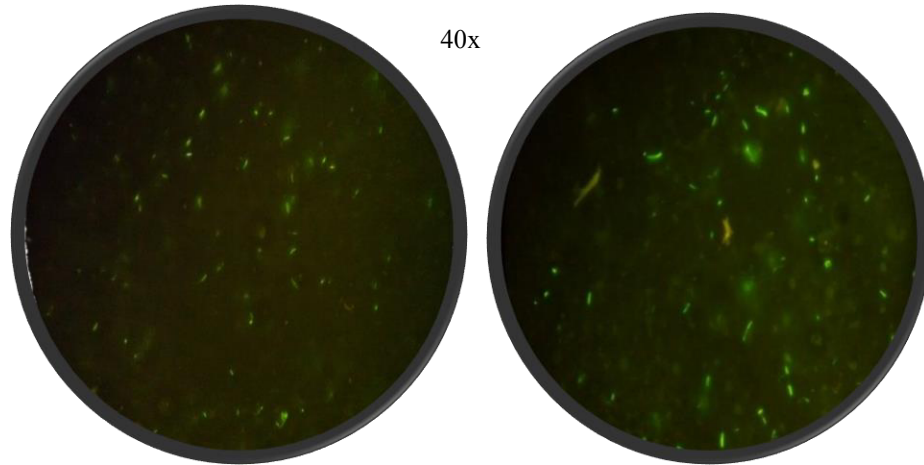


Figura 9. Microscopía de fluorescencia de *L. acidophilus* en las microcápsulas elaboradas (distintos campos)

Se realizó el análisis por SEM de las estructuras elaboradas por electrospraying mediante un equipo NOVA NANOSEM 200. En la figura 10, en la imagen a), se observan las microcápsulas producidas con LD/CPSL y en la figura b), la misma mezcla con el microorganismo encapsulado. Como se puede observar no hubo gran diferencia en la morfología de las microcápsulas, ya que en ambos tratamientos presentan estructuras redondas, con una superficie lisa y pequeños hundimientos u ondulaciones, el tamaño promedio que se presentó fue de entre 2 a 3 micrómetros en ambos casos lo que coincide con los resultados mostrados por microscopía óptica. Los resultados obtenidos con LD/CPSL son muy parecidos a los reportados en trabajos previos (López-Rubio *et al.* 2012), ya que se encontraron microcápsulas con diámetros similares, sin embargo, en el caso de la mezcla con presencia del microorganismo b), no se obtuvieron estructuras de un tamaño mayor a 4 micras a diferencia de lo reportado por estos autores.

En la imagen c), PBS/CPSL y d) PBS/CPSL con *L. acidophilus* se puede apreciar que estas formaron una masa de material amorfo, sin embargo, en ambos casos fue posible apreciar en la superficie las estructuras esféricas unidas. Estas presentaron un tamaño de 2 a 3 micras en promedio, lo que es similar a lo descrito en el trabajo de López-Rubio de 2012. Este mismo autor reporta haber obtenido microcápsulas bien definidas en su superficie cuando fueron elaboradas con PBS/CPSL, observando posteriormente una masa amorfa, una vez incorporado el probiótico utilizado (*Bifidobacterium animalis*)

Basándose en el tamaño de las microcápsulas observadas por SEM tanto con LD/CPSL como con PBS/CPSL, así como por lo anteriormente visto por microscopía óptica, se puede corroborar nuevamente que la técnica de electrospinning llevo a la formación de microcápsulas de menor tamaño que otras técnicas de encapsulación más comunes (Rokka & Rantamaki 2010).

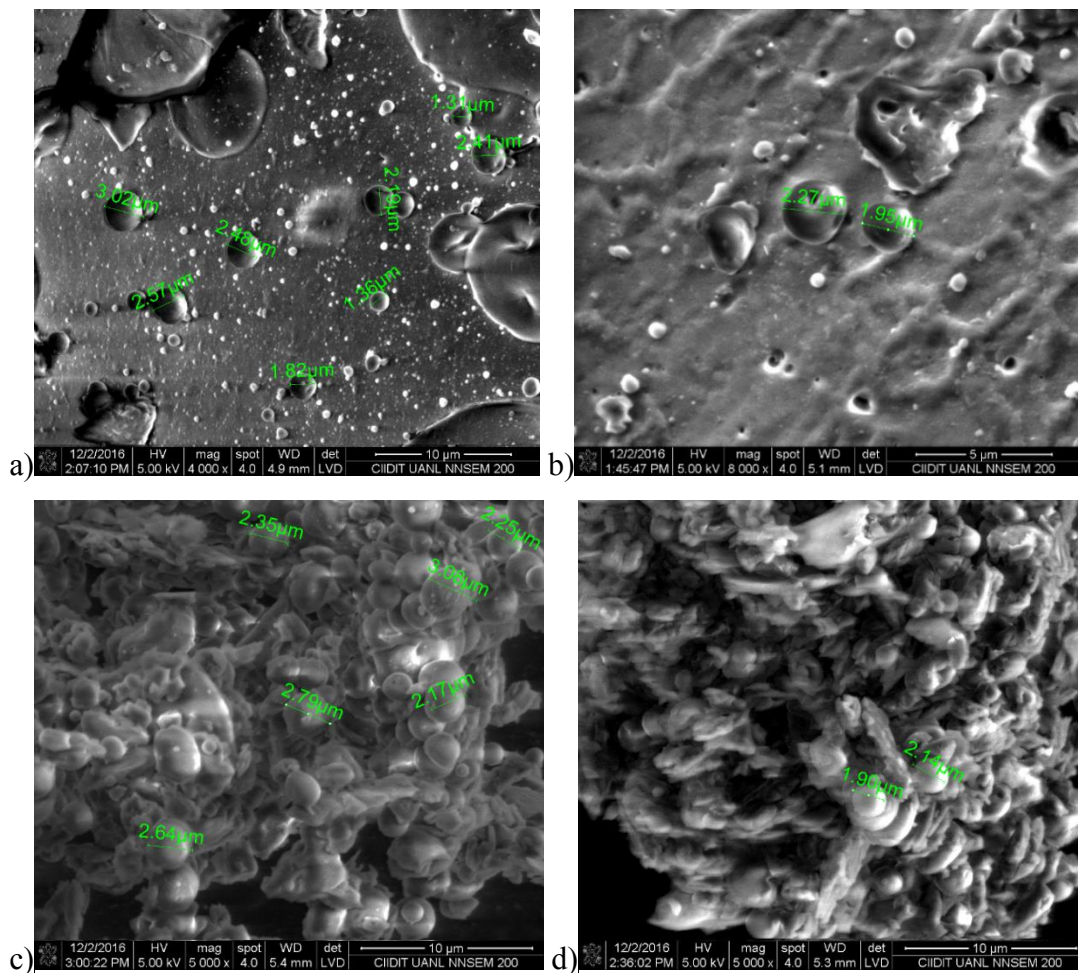


Figura 10. Imágenes por SEM de las microcápsulas obtenidas. a) LD/CPSL; b) LD/CPSL/*L. acidophilus*; c) PBS/CPSL; d) PBS/CPSL/*L. acidophilus*. El diámetro promedio de las estructuras fluctuó entre 1.36 a 3.08  $\mu\text{m}$ .

El análisis por FTIR realizado a las microcápsulas obtenidas con LD/CPSL con *L. acidophilus*, así como de cada uno de sus componentes individuales que las constituyen es mostrado en la figura 11. Se encuentra marcado en verde la región de los 3340-3600  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la señal de los grupos N-H y O-H, donde se observa un incremento en la intensidad en dicha señal en las microcápsulas con respecto a los otros componentes

individuales, principalmente contra el concentrado de proteína de suero de leche. En la zona de 1600 a 1700  $\text{cm}^{-1}$  se encontraron las señales correspondientes a las amidas I, como los grupos carbonilo y amino; también, se encontró la banda de las amidas II en la longitud de onda de 1480-1580  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al grupo N-H. De forma similar se puede observar en todos los espectros las señales de estos grupos funcionales característicos de las proteínas, sin embargo, se vio un incremento en la intensidad de la señal en estas bandas para las microcápsulas con respecto a los componentes individuales. Se puede concluir que las combinaciones de estos componentes contribuyen a un incremento en la intensidad de la señal de las microcápsulas, sin embargo, parece no haber interacción entre la matriz de LD/CPSL y del microorganismo adicionado ya que no se observaron desplazamientos en las señales típicas de las proteínas. (López-Rubio *et al.* 2012).

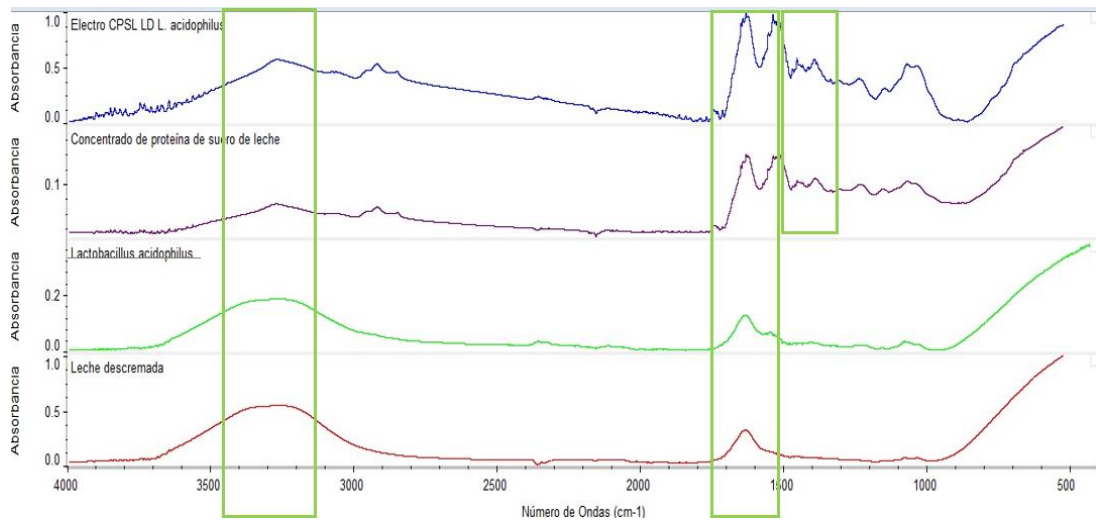


Figura 11. Análisis de FT-IR obtenidos del formulado de LD/CPSL al 40% y los componentes individuales que lo conforman.

El objetivo de la microencapsulación es proporcionar al probiótico un ambiente que permita mantener la viabilidad de este para realizar su función en relación al tiempo. La resistencia del microorganismo al procesamiento por electrospraying fue evaluado mediante la técnica de cuenta viable en placa. En la figura 12, se muestra los resultados de la dilución en serie en las microcápsulas de LD/CPSL conteniendo el microorganismo probiótico. Este procedimiento se repitió por triplicado con las muestras del probiótico microencapsulado, así como con los liofilizados utilizados como control.



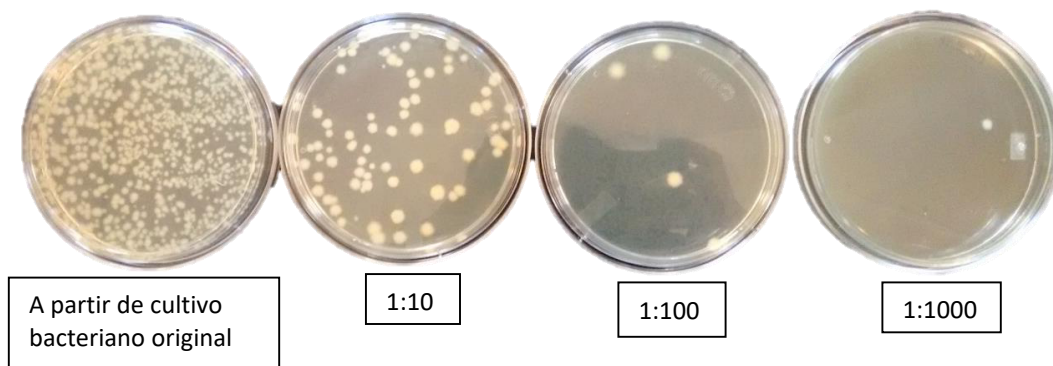


Figura 12. *L. acidophilus* a partir de las microcápsulas generadas mediante la solución de LD/CPSL.

Se compararon los resultados de viabilidad de las bacterias contenidas en las microcápsulas de LD/CPSL, con los liofilizados de LD, LD/CPSL, PBS, PBS/CPSL. Debido a que para las microcápsulas de PBS/CPSL se obtuvo una baja producción (1mg/h), no fue posible utilizar este tratamiento para esta prueba.

En los estudios de estabilidad al almacenamiento durante 45 días a 25°C, se aprecia en la figura 13 que aunque se observan diferencias significativas en la cuenta inicial del microorganismo entre los tratamientos liofilizados con PBS y aquellos con LD (leche descremada) como solvente incluyendo a las microcápsulas ( $p < 0.05$ ), estos se encuentran en un orden de magnitud de  $1 \times 10^5$  UFC/g; para el día 15 los tratamientos liofilizados con así como las microcápsulas, todos ellos conteniendo LD mostraron un incremento en el número de UFC/mg con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ellos, sin embargo los tratamientos a base de PBS presentaron un decremento de dos órdenes de magnitud sin diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ).

Para el día 30 se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los liofilizados de PBS, los liofilizados de LD y las microcápsulas, se puede observar que el tratamiento correspondiente a las microcápsulas mantiene estabilidad en la viabilidad del lactobacilo, mientras que los tratamientos liofilizados con LD disminuyeron en comparación con este último, así mismo los tratamientos con PBS siguieron con valores de viabilidad menores ( $p > 0.05$ ).

Para el día 45 fue más evidente las diferencias en la viabilidad de los tratamientos de LD y PBS ( $p < 0.05$ ), se pudo observar que las microcápsulas siguen siendo el tratamiento que mantuvo una mayor estabilidad en relación al tiempo, aunque los tratamientos liofilizados con LD con y sin proteína también mostraron valores similares de viabilidad a los 45 días ( $p > 0.05$ ).

En general es notoria la disminución de la viabilidad en los tratamientos con PBS durante el periodo de almacenamiento a 25°C.

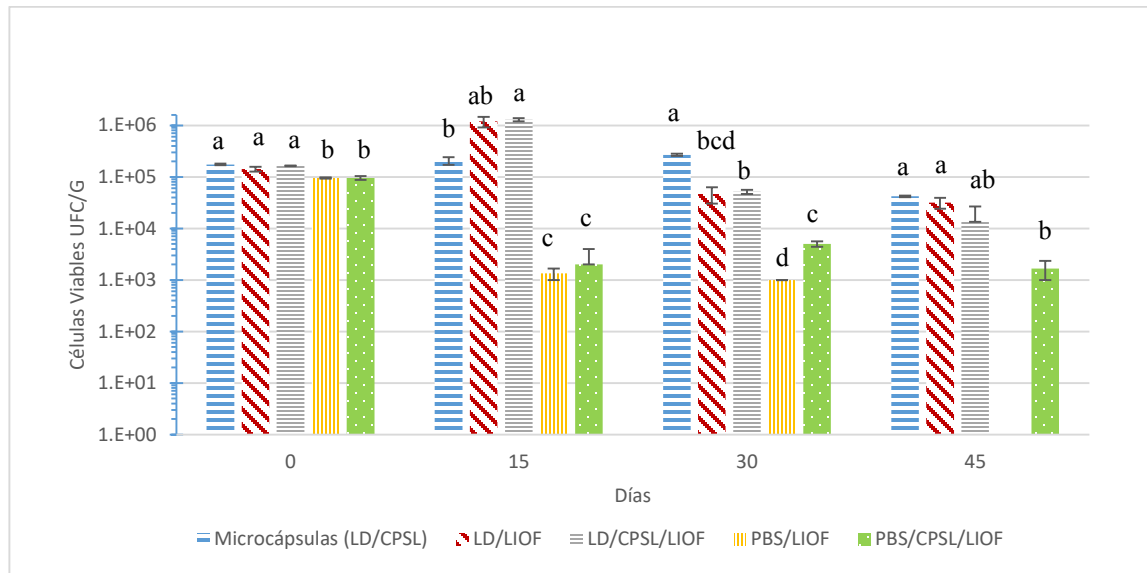


Figura 13. Viabilidad en almacenamiento a 25 °C de *Lactobacillus acidophilus* en los distintos tratamientos.

En cuanto al análisis de la viabilidad de cada uno de los tratamientos a través del tiempo (figura 14), se observó que las microcápsulas de LD/CPSL con *Lactobacillus acidophilus* mostraron estabilidad a través del tiempo principalmente en los primeros 30 días con una disminución en los valores para el día 45 ( $p < 0.05$ ).

En el caso de los tratamientos de LD liofilizados se observó un incremento en la viabilidad en el día 15 ( $p < 0.05$ ); sin embargo, para el resto de los días no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), aunque se observa una tendencia a disminuir la viabilidad con el tiempo; de igual manera en el tratamiento liofilizado de LD con CPSL mostró un comportamiento similar al previamente mencionado.

Para el tratamiento de PBS liofilizado, se observó claramente una disminución en la viabilidad de dos logaritmos al día 15 ( $p < 0.05$ ), y en menor medida para el día 30 alcanzando una pérdida total de la viabilidad al día 45. Finalmente, para el último tratamiento de PBS/CPSL, la disminución de dos logaritmos en la viabilidad permaneció constante a partir del día 15 hasta el día 45.

Lo anterior evidencia el efecto de la LD al ejercer protección al probiótico para mantener la viabilidad por más tiempo en comparación con los liofilizados a base de PBS, los cuales no presentan este ingrediente, sin embargo, como se puede apreciar en estos últimos, aquél con CPSL al día 45 parece tener una mejora en la estabilidad probablemente atribuible a un efecto protector a esta proteína, aunque no al nivel que se observa con la leche descremada.

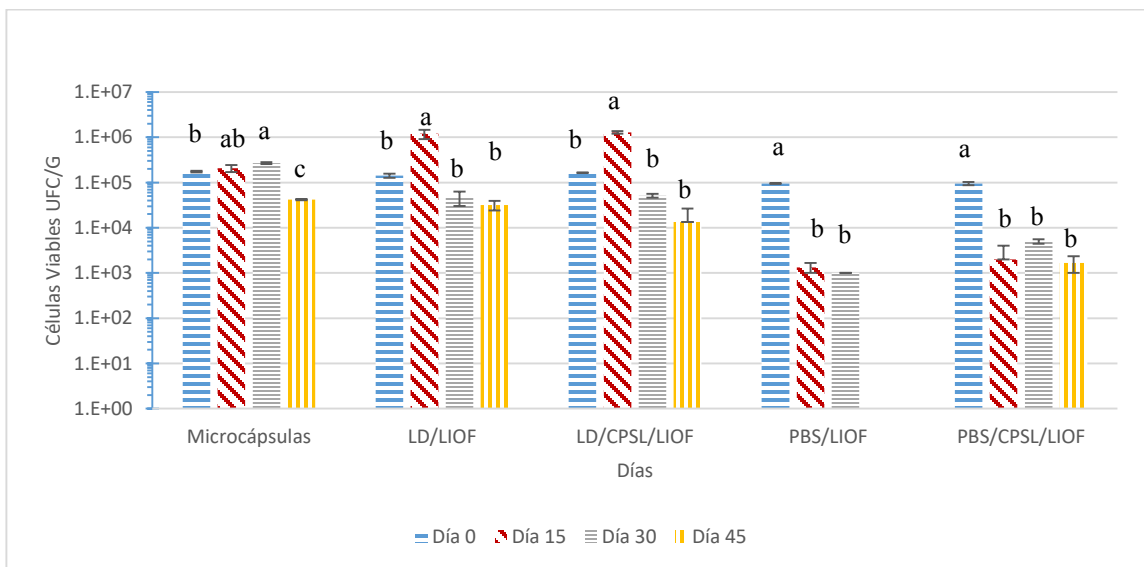


Figura 14. Análisis de los tratamientos de forma individual a través del tiempo a 25°C

Se pueden observar en los resultados de los tratamientos a 4°C (figura 15) que al día 0, de igual forma que los tratamientos a 25°C, se presentó un conteo inicial del microorganismo con valores de  $1 \times 10^5$  UFC, con resultados que nuevamente indican una diferencia entre los tratamientos de microcápsulas y liofilizados con LD, con respecto a los liofilizados de PBS ( $p < 0.05$ ).

Para el día 15, nuevamente se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos liofilizados de PBS y los de LD incluyendo las microcápsulas. Aquí se puede observar más claramente que el tratamiento de PBS liofilizado sin CPSL presentó una pérdida total de la cuenta viable ( $p < 0.05$ ).

Para el día 30 la viabilidad bacteriana se mantuvo tanto en la LD liofilizada como en las microcápsulas en niveles similares de cuenta viable sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), sin embargo, en este caso el tratamiento de LD/CPSL tuvo una caída de dos logaritmos, lo que fue un comportamiento fuera de la tendencia ya que se esperaba que la leche descremada mantuviera la viabilidad en este tratamiento. Para el día 45 de igual manera que la fecha anterior, el tratamiento de liofilizado con LD y las microcápsulas mantuvieron los niveles de viabilidad estables en comparación con los demás tratamientos. Es importante mencionar que para este día el tratamiento correspondiente al liofilizado de LD/CPSL presentó una caída total de la viabilidad, resultado que de igual manera fue no esperado ya que esto no se observó en el tratamiento a condiciones de 25°C, además de que, en trabajos similares, se ha visto que la leche descremada, así como la proteína actúan como protectores en procesos de liofilización. Finalmente, el tratamiento de PBS/CPSL continuó su tendencia a la baja cayendo otro logaritmo.

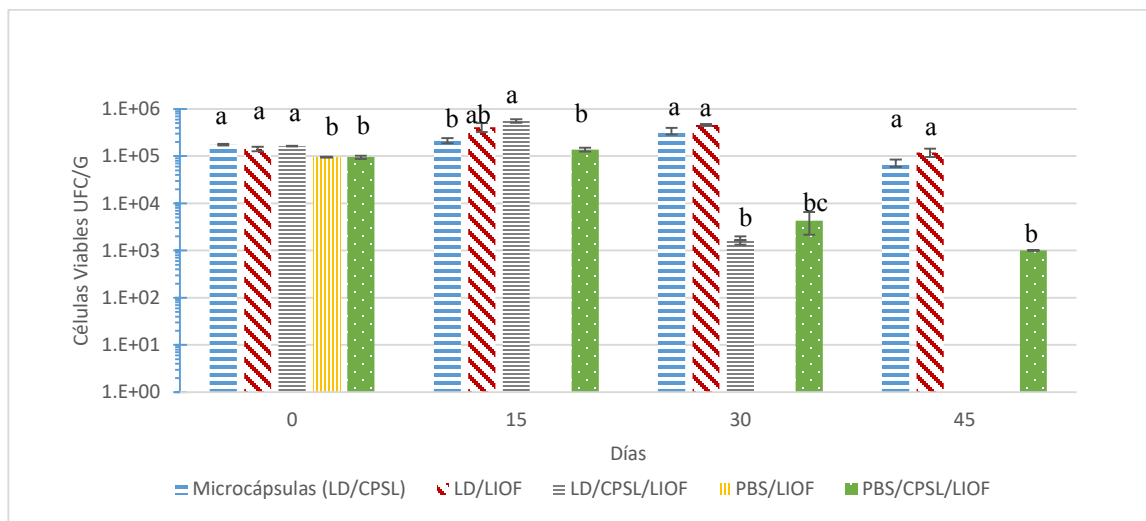


Figura 15. Viabilidad en almacenamiento a 4 °C de *Lactobacillus acidophilus* en los distintos tratamientos.

Para el caso de la comparación del comportamiento de cada tratamiento a 4°C a través del tiempo (figura 16), se encontró que las microcápsulas en general mostraron estabilidad a

través del tiempo alcanzando un valor máximo el día 30, con una disminución al día 45 ( $p>0.05$ ).

El tratamiento liofilizado de LD presentó al igual que en las microcápsulas una estabilidad con tendencia a incrementos en la viabilidad hasta el día 30 sin diferencias significativas ( $p>0.05$ ), observándose que el incremento continuó al menos hasta el día 45 ( $p<0.05$ ). El tratamiento de LD/CPSL mostró el mismo comportamiento al alza que los anteriores hasta el día 15 ( $p<0.05$ ), sin embargo, a partir del día 30 se encontró una tendencia a la baja en la cuenta viable con una pérdida total al día 45, a pesar de la presencia de CPSL. En el caso del tratamiento de PBS liofilizado se pudo observar la pérdida total de la viabilidad a partir del día 15 ( $p<0.05$ ), contrastando con la estabilidad proporcionada por la leche descremada en el resto de los tratamientos en cuanto a la viabilidad del probiótico. En el tratamiento de PBS/CPSL liofilizado se observó un comportamiento semejante al liofilizado de LD/CPSL ya que en ambos se presentó una disminución de la viabilidad a partir del día 30 con diferencias significativas entre cada día hasta el día 30 ( $p<0.05$ ).

Los resultados donde los tratamientos liofilizados contenían CPSL, difieren de lo reportado por López-Rubio en 2012 en donde la presencia de la proteína mantuvo la viabilidad similar al liofilizado estándar de LD. Una hipótesis a este comportamiento pudiera ser que estos tratamientos no hubieran estado bien homogeneizados, ya que la leche descremada junto con proteínas de leche, han sido por un tiempo ampliamente utilizados como agentes protectores en técnicas de conservación como el secado por spray (Ananta, Volkert, & Knorr 2005; Gardiner *et al.* 2002).

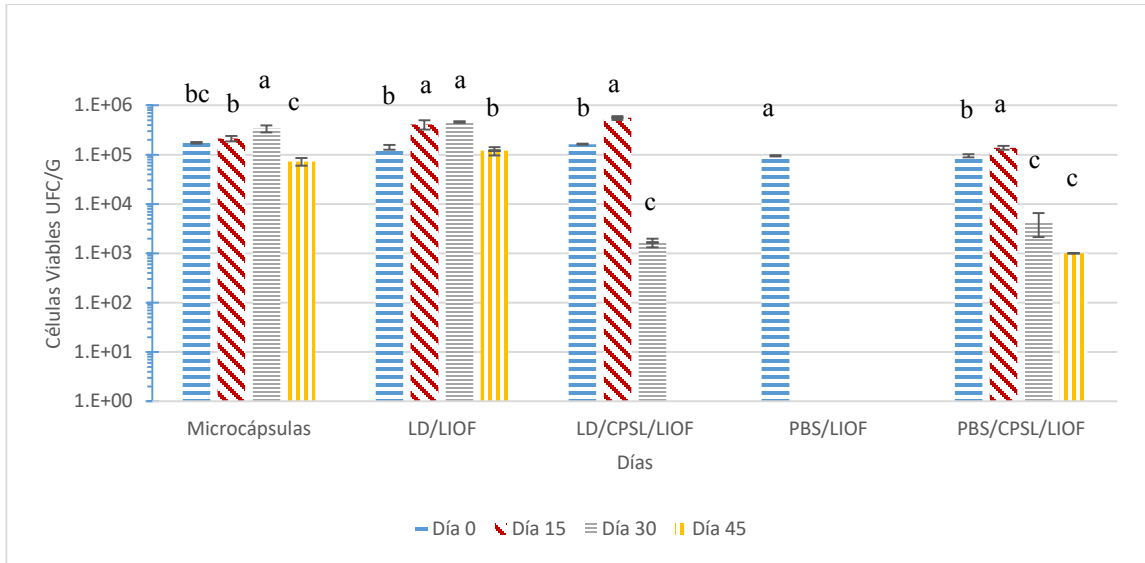


Figura 16. Análisis de los tratamientos de forma individual a través del tiempo a 4 °C

Finalmente, se compararon los diferentes tratamientos en las dos temperaturas empleadas (4°C y 25°C); se observó en el caso de las microcápsulas que en los cuatro tiempos del ensayo no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la viabilidad (figura 17).

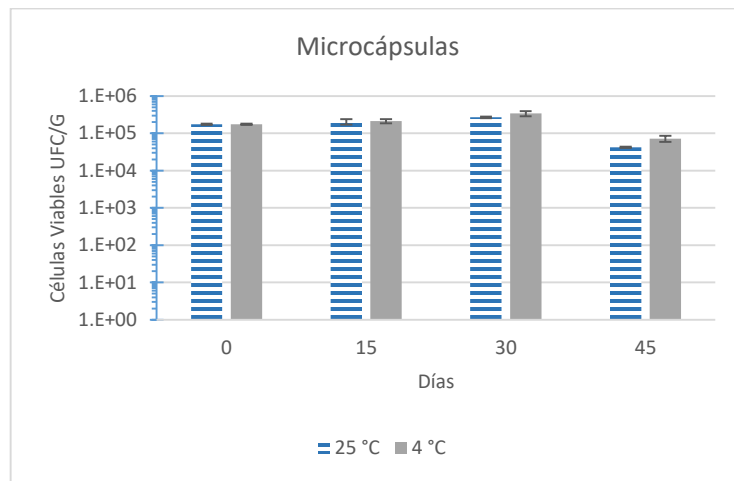


Figura 17. Comparación de la viabilidad del probiótico en las microcápsulas en dos distintas temperaturas

Para el caso de los tratamientos liofilizados (figura 18), tenemos que el primero de ellos, la LD/LIOF, mantuvo la viabilidad en valores medios similares tanto a 4°C como a 25°C hasta el día 15 ( $p > 0.05$ ), a partir del día 30 y el día 45 se obtuvo que hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos, con un descenso lento en ambas temperaturas ( $p < 0.05$ ).

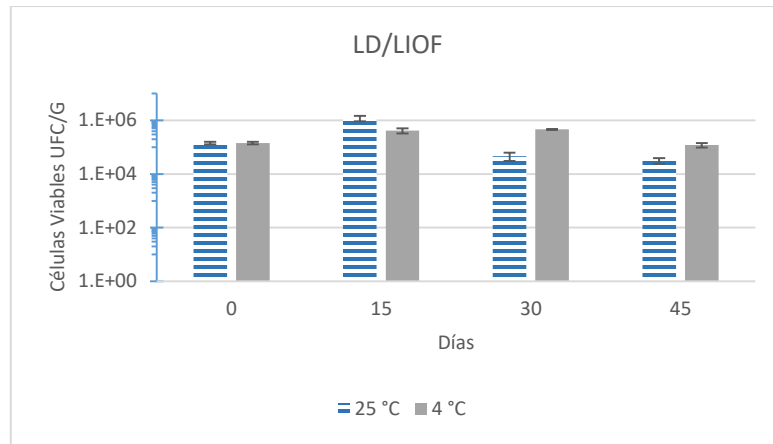


Figura 18. Comparación de la viabilidad del probiótico en el liofilizado de LD/LIOF en dos distintas temperaturas

Para el tratamiento de LD/CPSL, se puede observar en la figura 19 que este se mantuvo en valores similares a ambas temperaturas hasta el día 15 donde inicio un decremento en la viabilidad en ambas temperaturas, con diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ) ya que la muestra almacenada a 4°C presentó una disminución más acentuada, tales resultados presentan una diferencia importante con lo esperado y lo reportado en trabajos previos (López-Rubio *et al.* 2012) con leche descremada y proteína como agentes protectores.

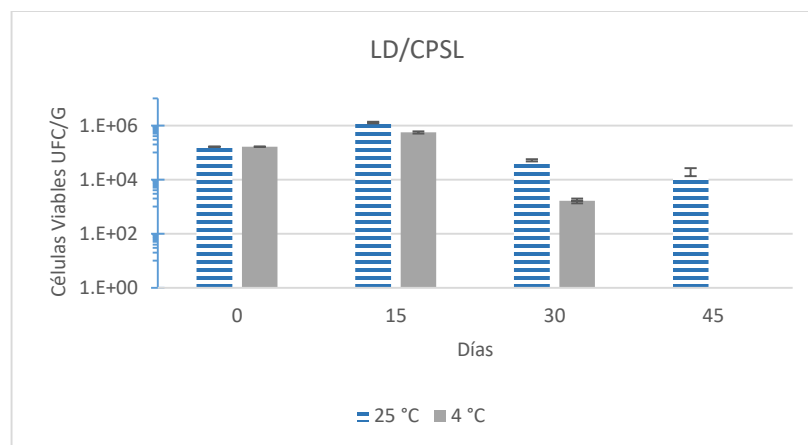


Figura 19. Comparación de la viabilidad del probiótico en el liofilizado de LD/CPSL en dos distintas temperaturas

Para el caso del tratamiento de PBS liofilizado, se pudo apreciar en la figura 20 que no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en las dos temperaturas hasta el día 15, punto en

el cual ambas presentaron un descenso considerable en el número de UFC, donde a 4°C se perdió totalmente la viabilidad.

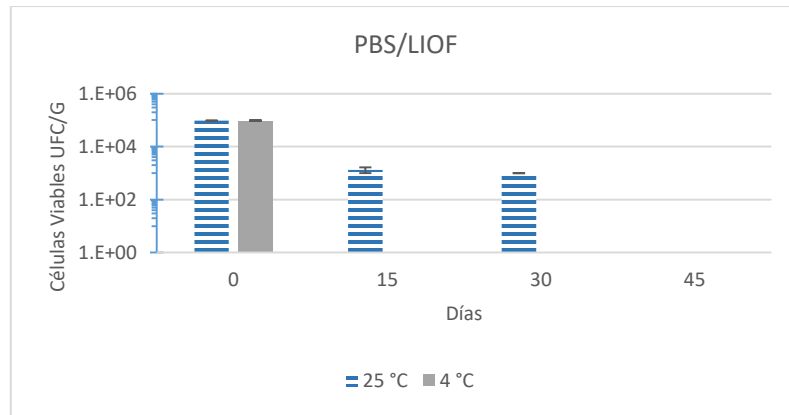


Figura 20. Comparación de la viabilidad del probiótico en el liofilizado de PBS/LIOF en dos distintas temperaturas

Para el último tratamiento, PBS/CPSL (figura 21), se observó estabilidad en ambas temperaturas hasta el día 15, en donde ambas temperaturas mostraron diferencias significativas en el conteo ( $p < 0.05$ ), a partir del día 30 en ambas condiciones de temperatura hubo un descenso considerable en el conteo de células viables aunque no se encontró diferencias significativas entre estas ( $p > 0.05$ ), sin embargo la disminución no alcanza los valores del tratamiento de PBS/liofilizado, probablemente debido a la presencia de CPSL proporcionando esta cierta protección al proceso de liofilización y almacenamiento en ambas temperaturas.

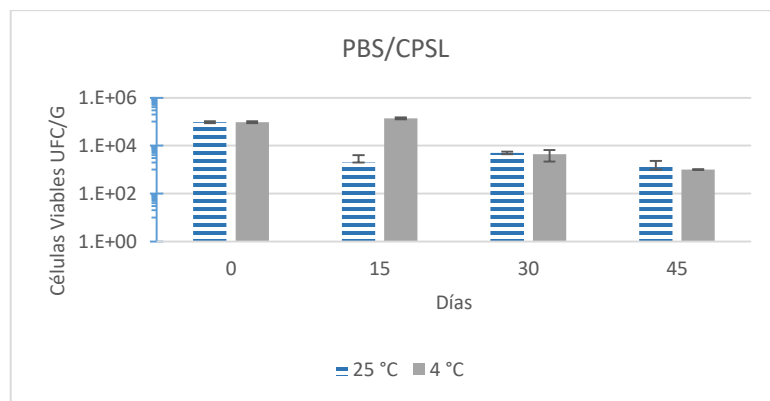


Figura 21. Comparación de la viabilidad del probiótico en el liofilizado de PBS/CPSL en dos distintas temperaturas



Estos resultados difirieron de forma general con lo reportado por otros trabajos en cuanto a una mejor estabilidad a menor temperatura, ya que en cultivos liofilizados de lactobacilos se mantuvo la estabilidad por más tiempo bajo condiciones de refrigeración que a temperatura ambiente (Jofré *et al.* 2014), por lo que, en este trabajo, alguna desviación en el procedimiento de conservación por liofilización pudo haber afectado la estabilidad.

Finalmente, en cuanto a la estabilidad de las formulaciones de los liofilizados de LD y las microcápsulas, los resultados obtenidos fueron semejantes a lo reportado por López-Rubio en 2012, los cuales con tratamientos semejantes mantuvieron niveles similares hasta aproximadamente los 45 días de la prueba mientras que en los liofilizados de PBS la viabilidad se vio disminuida durante todo el período. También, se encontró que las cuentas viables reflejaron niveles similares a otros trabajos por métodos de encapsulamiento a través de técnicas de conservación como la emulsión o el entrecruzamiento (Reid *et al.* 2005; Annan, Borza y Hansen 2008; Capela *et al.* 2007).

## 8. CONCLUSIONES

Es posible la obtención de microcápsulas por la técnica de electrospraying, a partir de soluciones de leche descremada adicionadas con una matriz de concentrado de proteína de suero de leche.

Es posible la encapsulación de un microorganismo en microcápsulas elaboradas por la técnica de electrospraying.

Se demostró que el probiótico fue encapsulado dentro de la matriz de concentrado de proteína de suero de leche por microscopía de fluorescencia, microscopía electrónica de barrido y la determinación de la viabilidad.

Las microcápsulas obtenidas por un concentrado de proteína de suero de leche presentan un diámetro promedio de 2.5 micrómetros, menor a lo reportado en diferentes técnicas de encapsulación, sin embargo, es mayor a lo reportado en otros trabajos por electrospraying, lo cual puede ser una ventaja para encapsular a *Lactobacillus acidophilus*.

El microorganismo probiótico microencapsulado por electrospraying presentó valores de viabilidad menor a lo reportado en otros trabajos por esta la técnica, sin embargo, estos se encuentran dentro del rango de otras técnicas de encapsulamiento, así como de otros métodos de conservación, particularmente la liofilización.

El uso de leche descremada mejoró en general la viabilidad de todos los tratamientos, tanto los microencapsulados como los liofilizados, sin embargo, el uso de la matriz de CPSL, aunque es necesaria para el encapsulamiento, parece no haber proveído de una protección adicional sustancial como se pudo apreciar en los resultados de viabilidad en los distintos tratamientos liofilizados.

## **9. PERSPECTIVAS**

La técnica de encapsulamiento por electrospraying es una técnica prometedora por lo que se plantean las siguientes perspectivas.

Continuar la estandarización de los parámetros de diferentes matrices para la protección de ingredientes activos, principalmente para el uso con microorganismos probióticos.

Sería interesante la realización de pruebas con distintos microorganismos probióticos, para realizar comparaciones de viabilidad, además de comprobar el efecto del tamaño de las microcápsulas generadas con respecto a las dimensiones de distintos microorganismos.

Se obtuvieron buenos resultados en cuanto a la viabilidad del microorganismo mediante la microencapsulación por electrospraying así como con algunos de los controles liofilizados, sin embargo para trabajos posteriores se debe buscar incrementar la cantidad de repeticiones de los tratamientos para reducir la variabilidad.

Sería de gran interés probar el uso de sistemas artificiales que simulen las condiciones del tracto digestivo (disolutores) para probar la estabilidad de las microcápsulas elaboradas por la técnica mediante el uso de distintas matrices.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Amine, K. M., Champagne, C. P., Salmieri, S., Britten, M., St-Gelais, D., Fustier, P., & Lacroix, M. (2014). Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying. *LWT-Food Science and Technology*, *56*(1), 111-117.

Anandharamakrishnan, C. (2015). *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation*. John Wiley & Sons. pp.91

Ananta, E., Volkert, M., & Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, *15*(4), 399-409.

Annan, N. T., Borza, A. D., & Hansen, L. T. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, *41*(2), 184-193.

Birnbaum, D. T., Kosmala, J. D., Henthorn, D. B., & Brannon-Peppas, L. (2000). Controlled release of  $\beta$ -estradiol from PLGA microparticles: The effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *Journal of Controlled Release*, *65*(3), 375-387.

Brandenberger, H., Nüssli, D., Piech, V., & Widmer, F. (1999). Monodisperse particle production: A method to prevent drop coalescence using electrostatic forces. *Journal of electrostatics*, *45*(3), 227-238.

Bruschi, M. L., Cardoso, M. L. C., Lucchesi, M. B., & Gremião, M. P. D. (2003). Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, *264*(1), 45-55.

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.

Capela, P., Hay, T. K. C., & Shah, N. P. (2007). Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Research International*, *40*(10), 1261-1269.

Chávarri, M., Marañón, I., & Villarán, M. C. (2012). *Encapsulation technology to protect probiotic bacteria*. INTECH Open Access Publisher. pp 501-540.

Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, *17*(5), 272-283.

Chen, M. J., & Chen, K. N. (2007). Applications of probiotic encapsulation in dairy products. *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*, 83-112.

Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., McIver, K. S., Hagman, K. E., Ott, C. M., Schurr, M. J. (2008). Skim Milk Enhances the Preservation of Thawed -80°C Bacterial Stocks. *Journal of Microbiological Methods*, *75*(1), 135–138.

Conway, P. L., Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*, *70*(1), 1-12.

De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., & Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics—compensation for lactase insufficiency. *The American journal of clinical nutrition*, *73*(2), 421s-429s.

FAO. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. 2006. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.

Favaro-Trindade, C. S., Heinemann, R. J. B., & Pedroso, D. L. (2011). Developments in probiotic encapsulation. *CAB Rev*, 6, 1-8.

Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Collins, J. K., Fitzgerald, G. & Stanton, C. (2002). A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal*, 12(9), 749-756.

Gibbs, Selim Kermasha, Inteaz Alli, Catherine N. Mulligan, B. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213-224.

Goldin, B. R., & Gorbach, S. L. (1984). The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *The American journal of clinical nutrition*, 39(5), 756-761.

Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (1999). Bifidobacterium spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4), 139-157.

Gómez-Mascaraque, L. G., Morfin, R. C., Pérez-Masiá, R., Sanchez, G., & Lopez-Rubio, A. (2016). Optimization of electrospraying conditions for the microencapsulation of probiotics and evaluation of their resistance during storage and in-vitro digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 438-446.

Guarner, F., & Schaafsma, G. J. (1998). Probiotics. *International journal of food microbiology*, 39(3), 237-238.

Haghi, A. K., & Akbari, M. (2007). Trends in electrospinning of natural nanofibers. *physica status solidi (a)*, 204(6), 1830-1834.

Hartman, R. P. A., Brunner, D. J., Camelot, D. M. A., Marijnissen, J. C. M., & Scarlett, B. (2000). Jet break-up in electrohydrodynamic atomization in the cone-jet mode. *Journal of Aerosol Science*, 31(1), 65-95.

Hatakka, K., Savilahti, E., Pönkä, A., Meurman, J. H., Poussa, T., Näse, L., & Korpela, R. (2001). Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *Bmj*, 322(7298), 1327.

Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 374s-379s.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., & Calder, P. C. (2014). Expert consensus document: 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.

Holt, J.G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (eds.): Genus *Vibrio*, pp. 192-194. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed., Baltimore, Williams and Wilkins 1994<sup>a</sup>.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 365s-373s.

Jofré, A., Aymerich, T., & Garriga, M. (2014). Impact of different cryoprotectants on the survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei/paracasei* during long-term storage. *Beneficial microbes*, 6(3), 381-386.

Lawless, H. T., & Heymann, H. 2010. *Sensory evaluation of food: principles and practices* (Vol. 5999). Springer Science & Business Media. pp.266

Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, *147*(3659), 747-748.

López-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., & Lagaron, J. M. (2012). Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, *28*(1), 159-167.

López-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2012). Whey protein capsules obtained through electrospaying for the encapsulation of bioactives. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *13*, 200-206.

Lozada, A. E. (2001). El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. *Enferm. Infecc. Microbiol*, *21*(3), 106-114.

Marteau, P. R., De Vrese, M., Cellier, C. J., & Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American journal of clinical nutrition*, *73*(2), 430s-436s.

Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2014). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *27*, 15-25.

Mauguet, M. C., Legrand, J., Brujes, L., Carnelle, G., Larre, C., & Popineau, Y. (2002). Gliadin matrices for microencapsulation processes by simple coacervation method. *Journal of microencapsulation*, *19*(3), 377-384.

Pérez-Masiá, R., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2014). Development and optimization of novel encapsulation structures of interest in functional foods through electrospaying. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(11), 3236-3245.



Pérez-Masiá, R., López-Nicolás, R., Periago, M. J., Ros, G., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2015). Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. *Food chemistry*, *168*, 124-133.

Pham, Q. P., Sharma, U., & Mikos, A. G. (2006). Electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules*, *7*(10), 2796-2805.

Reid, G. (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *The American journal of clinical nutrition*, *73*(2), 437s-443s.

Reid, A. A., Vuilleumard, J. C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., & Champagne, C. P. (2005). Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca<sup>2+</sup>-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *Journal of Microencapsulation*, *22*(6), 603-619.

Rokka, S., & Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, *231*(1), 1-12.

Sánchez, L. M. D., Rodriguez, L., & López, M. (2013). Electrospinning: la era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, *14*(1), 10-27.

Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of dairy science*, *83*(4), 894-907.

Technavio (2016). Global probiotic market 2015–2019. <http://www.technavio.com/report/probiotics-market>

Wendorff, JH, Agarwal S & Greiner A. (2012). Electrospinning, Materials, Processing, and Applications. *Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschstr. 12*. 69-71

Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 449-458.

Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 3-29). Springer New York.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Miguel Arturo Ortiz González

Candidato para el Grado de  
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: ENCAPSULAMIENTO POR ELECTROSPRAYING DE UN PROBIÓTICO  
UTILIZANDO UN CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE

Campo de estudio: Biotecnología

Datos personales: Nacido en León, Guanajuato el 28 de Marzo de 1990, hijo de Lourdes  
Patricia González Rodríguez y Miguel Ortiz Cruz.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido en  
Licenciado en Biotecnología Genómica en el 2013.

Experiencia profesional: Auxiliar de laboratorio en CIATEJ de 2013 a 2014, tutor de  
bachillerato en la Universidad Ciudadana de Nuevo León desde  
2017.