

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



TESIS:

Microencapsulado de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) en alginato de sodio sobre la supervivencia en condiciones ambientales Ayacucho 2025

Para optar el título profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

PRESENTADO POR:

Bach. Juan Carlos BARZOLA RAMOS

ASESORA:

Mtra. Sulma Soledad HINOSTROZA PALOMINO

AYACUCHO - PERÚ

2025

DEDICATORIA

Finalmente, dedico este trabajo de investigación y mi formación profesional a mis padres, Juan y Felicitas, por su apoyo constante, esfuerzo y sacrificio para brindarme una educación y ayudarme a cumplir mi mayor anhelo de convertirme en Médico Veterinario. A ti, papá, por tu ejemplo de trabajo y perseverancia; y a ti, mamá, por tu amor incondicional, fortaleza y dedicación en cada etapa de mi formación universitaria y profesional.

A mis hermanos menores, Dayvis y Henry. Espero que mi esfuerzo les sirva de ejemplo y les recuerde que los sueños pueden alcanzarse con dedicación y perseverancia. Les deseo que continúen esforzándose, confíen en sus capacidades y logren cumplir cada una de sus metas. Siempre estaré orgulloso de ustedes y acompañándolos en cada etapa de su crecimiento, así como ustedes han estado presentes en el mío.

A mis tíos, tías y abuela materna, gracias por su apoyo, consejos y cariño brindados a lo largo de mi formación profesional. También dedico este trabajo a mis abuelos Saturnina, Lucio y Epifanio, quienes hoy me acompañan desde el cielo; sus enseñanzas, amor y recuerdos continúan siendo una guía y fortaleza en mi camino.

A mis amigos, gracias por su apoyo, ánimo y compañía durante esta etapa tan importante. Su amistad hizo más llevadero este proceso y fue un pilar fundamental para alcanzar esta meta.

AGRADECIMIENTO

Expreso mi sincero agradecimiento a mi Alma Máter, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, y a la Facultad de Ciencias Agrarias, por haberme permitido formarme en el ámbito académico y personal.

A la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, mi sincero reconocimiento por convertirse en el espacio donde consolidé mi vocación y reafirmé mi compromiso para proteger la vida y velar por el bienestar de quienes no tienen voz

A mi asesora, la Mtra. Sulma Soledad Hinostroza Palomino, le agradezco sus consejos brindados, su guía permanente, su dedicación y la confianza depositada a largo de mi formación profesional y durante el desarrollo de esta investigación. Su orientación y acompañamiento fue fundamental para culminar este trabajo con responsabilidad y rigor académico.

Expreso mi sincero agradecimiento al círculo de estudios APROLIM, como también a la responsable del Laboratorio de Microbiología e Inmunología, a la Dra. Gloria Betti Adrianzen Facundo, por su apoyo durante el desarrollo de esta investigación. Asimismo, agradezco al Ing. Wilber Quijano Pacheco, Dr. Arturo Rodríguez Zamora, Dra. Magaly Rodríguez Monge, Dr. Wiliam Palomino Conde por su colaboración y por la disposición de sus diferentes equipos y materiales para la ejecución del presente trabajo.

Finalmente, a mis docentes, gracias por su entrega y por compartir sus conocimientos con profesionalismo, motivándonos siempre a superarnos y a ejercer nuestra carrera con ética y vocación de servicio.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLA	vi
ÍNDICE DE FIGURA	vii
ÍNDICE DE ANEXO	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
MARCO TEÓRICO	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Base teórica	6
1.2.1. Probióticos	6
1.2.2. Selección de bacterias probióticas	8
1.2.3. Mecanismo de acción de probióticos	8
1.2.4. Bacterias ácido lácticas	11
1.2.5. <i>Lactobacillus sp.</i>	12
1.2.6. Encapsulado de microorganismos probióticos	13
1.2.7. Métodos de encapsulación	14
1.2.8. Alginato de sodio	15
1.2.8. gluconato de calcio 10 %	15
1.3. Método de cuantificación	15
CAPÍTULO II	17
METODOLOGÍA	17
2.1. Ubicación	17
2.2. Materiales	17
2.2.1. Material biológico	17
2.2.2. Materiales	17
2.2.3. Equipos	18

2.2.4. Insumos	18
2.3. Problema específico	18
2.4. Procedimiento metodológico	19
2.4.1. Determinación de la mejor dosis de alginato de sodio en porcentaje	19
2.4.2. Condiciones generales: activación y determinación de concentración de las BAL.	20
2.4.3. Encapsulación de las BAL	21
2.4.4. Evaluación de supervivencia de bacterias BAL encapsulados.....	21
2.5. Análisis de datos	21
2.5.1. Unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g).....	21
2.5.2. Transformación a escala logarítmica.....	22
2.5.3. Humedad (%)	22
2.5.4. Eficiencia de encapsulación (EE %)	22
2.5.5. Análisis estadístico	22
CAPÍTULO III	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.1. Dosis de alginato de sodio para la encapsulación de <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	23
3.1.1. Concentración de alginato al 1 %.....	24
3.1.2. Concentración de alginato al 2 %.....	24
3.1.3. Concentración de alginato al 3%.....	24
3.2. Cantidad de cápsulas por mL y evaluación de diámetro y peso durante almacenamiento.	25
3.3. Supervivencia de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> encapsulados en alginato de sodio al 2% a 0, 1, 2, 3 semanas.	28
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	33
ANEXOS	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Evaluación física de las cápsulas según concentración de alginato a temperatura ambiente</i>	23
Tabla 2 <i>Cantidad de cápsulas obtenidas por mL.....</i>	25
Tabla 3 <i>Eficiencia de proceso de encapsulación por método de extrusión</i>	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Cápsulas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato de sodio	23
Figura 2 Evaluación del diámetro (mm) y peso (g) de las cápsulas durante el almacenamiento al ambiente.	26
Figura 3 Supervivencia de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> encapsulados durante 0, 1, 2, 3 semanas	29

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. <i>Preparación de medios de cultivo y diluciones seriadas</i>	41
Anexo 2. <i>Crecimiento bacteriano</i>	41
Anexo 3. <i>Tinción de Gram</i>	41
Anexo 4. <i>Caracterización macroscópica de colonias de Lactobacillus delbrueckii</i>	42
Anexo 5. <i>Proceso de encapsulación de Lactobacillus delbrueckii</i>	42
Anexo 6. <i>Evaluación de supervivencia de Lactobacillus delbrueckii encapsuladas</i>	43
Anexo 7. <i>Evaluación de peso y diámetro de las cápsulas</i>	44
Anexo 8. <i>Recuento de bacterias Lactobacillus delbrueckii (UFC/g) antes y después del proceso de encapsulación</i>	44
Anexo 9. <i>Recuento de bacterias Lactobacillus delbrueckii (Log UFC/g) antes y después del proceso de encapsulación</i>	44
Anexo 10. <i>Datos de diámetro y peso de las cápsulas</i>	45

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL), como *Lactobacillus delbrueckii*, son relevantes en sanidad y producción animal por su capacidad de modular la microbiota intestinal y mejorar su capacidad absortiva. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del encapsulado de *L. delbrueckii* en alginato de sodio sobre su supervivencia en condiciones ambientales. Se utilizó el método de extrusión con concentraciones de alginato al 1 %, 2 % y 3 %. Se evaluaron características físicas de las cápsulas (morfología, consistencia y humedad) para seleccionar la concentración óptima en una fase preliminar. La cantidad de cápsulas por mL, la eficiencia de encapsulación (EE %) y la supervivencia bacteriana se determinaron a 0, 1, 2 y 3 semanas. La viabilidad se evaluó mediante siembras en medio MRS, con recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/g) a las 72 h de incubación, considerando una dilución 10^{-4} y transformación $\log_{10} (\text{UFC} + 1)$ para análisis estadístico (Shapiro–Wilk, Jamovi v.2.3). El alginato al 2 % produjo cápsulas esféricas, firmes y uniformes, con menor deformación estructural, y una eficiencia de encapsulación de $79.49 \% \pm 1.01$. La viabilidad de *L. delbrueckii* se mantuvo hasta la segunda semana y disminuyó significativamente en la tercera, evidenciando la eficacia temporal del encapsulado y la influencia de la integridad física de las cápsulas en la protección bacteriana. Se concluye que la encapsulación en alginato de sodio al 2 % permite conservar la supervivencia de *L. delbrueckii* hasta por dos semanas en condiciones ambientales, siendo útiles para ser usado en suplementos probióticos para animales de producción y compañía.

Palabras clave: *Lactobacillus delbrueckii*, encapsulación, alginato de sodio, supervivencia, probiótico.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB), such as *Lactobacillus delbrueckii*, are relevant in animal health and production due to their ability to modulate the intestinal microbiota and improve absorptive capacity. The aim of this study was to evaluate the effect of *L. delbrueckii* encapsulation in sodium alginate on its survival under environmental conditions. The extrusion method was used with alginate concentrations of 1%, 2%, and 3%. Physical characteristics of the capsules (morphology, consistency, and moisture content) were assessed to select the optimal concentration in a preliminary phase. The number of capsules per mL, encapsulation efficiency (EE%), and bacterial survival were determined at 0, 1, 2, and 3 weeks. Viability was evaluated by plating on MRS medium, with colony-forming unit (CFU/g) counts after 72 h of incubation, considering a 10^{-4} dilution and $\log_{10}(\text{CFU} + 1)$ transformation for statistical analysis (Shapiro–Wilk, Jamovi v.2.3). The 2% alginate produced spherical, firm, and uniform capsules with less structural deformation, and an encapsulation efficiency of $79.49\% \pm 1.01$. The viability of *L. delbrueckii* was maintained up to the second week and decreased significantly in the third week, demonstrating the temporary effectiveness of encapsulation and the influence of the physical integrity of the capsules in bacterial protection. It is concluded that encapsulation in 2% sodium alginate preserves the survival of *L. delbrueckii* for up to two weeks under environmental conditions, making it useful for probiotic supplements intended for production and companion animals..

Keywords: *Lactobacillus delbrueckii*, encapsulation, sodium alginate, survival, probiotic.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos grampositivos ampliamente distribuidos en ambientes naturales, alimentos fermentados y el tracto gastrointestinal de animales y humanos (Giraffa, 2004). Entre ellas, *Lactobacillus delbrueckii* se distingue por su capacidad para sintetizar metabolitos bioactivos, contribuir al equilibrio de la microbiota intestinal y favorecer procesos digestivos, impactando positivamente en la salud y el rendimiento productivo de animales de producción y compañía (FAO/WHO, 2002; Sanders et al., 2019). Estas características funcionales hacen que las BAL sean herramientas estratégicas en medicina veterinaria para mejorar la digestión, la estabilidad intestinal y el bienestar animal en distintos sistemas de producción.

A pesar de sus beneficios, la viabilidad de *L. delbrueckii* es altamente sensible a factores ambientales como temperatura, pH, actividad de agua y estrés oxidativo durante almacenamiento y procesamiento (Cook et al., 2012). La reducción significativa de unidades formadoras de colonia (UFC) compromete su función biológica, limitando su eficacia y los efectos esperados en el huésped animal (Kailasapathy, 2006; Tripathi & Giri, 2014). Por ello, se requiere implementar estrategias tecnológicas que protejan a las BAL frente a condiciones adversas y aseguren una mayor supervivencia hasta su administración.

La microencapsulación mediante matrices biopoliméricas, como el alginato de sodio, se presenta como una alternativa efectiva para preservar la viabilidad bacteriana (Anal & Singh, 2007). Esta técnica permite formar microcápsulas que actúan como barreras protectoras frente a agentes físicos y químicos adversos, facilitando la liberación controlada de las bacterias y mejorando su estabilidad durante el almacenamiento. Estudios previos han demostrado que la efectividad de la encapsulación depende de variables como la concentración de alginato, el método de encapsulación y las condiciones de almacenamiento (Krasaekoopt et al., 2003).

En el presente estudio se evaluó el efecto del encapsulado de *Lactobacillus delbrueckii* en alginato de sodio a concentraciones de 2 %, sobre la supervivencia bacteriana en condiciones ambientales propias de Ayacucho, la concentración de alginato al 2% fue seleccionada luego de una fase preliminar. Para la encapsulación se empleó el método de extrusión utilizando una solución de gluconato de calcio al 10 % y 2 M. Se evaluaron la morfología, consistencia y humedad de las cápsulas, así como la supervivencia de *L. delbrueckii* mediante siembra en

medio MRS y conteo de UFC/g a las semanas 0, 1, 2 y 3 de almacenamiento a temperatura ambiente. Los resultados preliminares mostraron que la viabilidad inicial fue de 6.47 Log UFC/g en la semana 0, disminuyendo a 5.24 Log UFC/g en la semana 1 y a 4.58 Log UFC/g en la semana 2, mientras que en la semana 3 no se observaron bacterias viables (0.00 Log UFC/g). Los datos de supervivencia fueron analizados para normalidad utilizando el software The jamovi project (2022), versión 2.3.

Esta investigación busca contribuir al desarrollo de tecnologías accesibles y efectivas que mejoren la estabilidad y funcionalidad de las BAL, facilitando su aplicación en la industria alimentaria animal local y regional. El trabajo se realizará en el laboratorio de Microbiología e Inmunología Veterinaria de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Distrito y Provincia de Ayacucho, Departamento de Ayacucho, Perú.

Objetivo general

- Evaluar el efecto del encapsulado de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) en alginato de sodio sobre la supervivencia en condiciones ambientales.

Objetivos específicos

- Determinar la concentración de alginato de sodio para la encapsulación de bacterias ácido lácticos (*Lactobacillus delbrueckii*) en una concentración estándar sobre la supervivencia en el ambiente.
- Determinar la cantidad de cápsulas por mL obtenidas en una concentración estándar de bacterias ácidas lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) para determinar su calidad a 0, 1, 2, 3 semanas.
- Determinar la supervivencia en el ambiente a 0, 1, 2, 3 semanas de las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) en una concentración estándar, encapsuladas en alginato de sodio.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

De acuerdo con Lee & Heo (2000), “Supervivencia de *Bifidobacterium longum* inmovilizado en esferas de alginato de calcio en jugos gástricos simulados y solución de sales biliares” en el Departamento de Ingeniería Biológica, Universidad de Inha, Incheon, Corea. Evaluó la supervivencia de dos cepas de *Bifidobacterium longum* encapsuladas en de alginato de calcio con diferentes concentraciones (2, 3 y 4%) y diámetros de aguja de 20 G. Las cápsulas se produjeron por el método de extrusión. La mezcla fue expulsada hacia una solución de CaCl_2 a 0.1 M. Se produjeron cápsulas de tamaño grande, mediano y pequeño con diámetros de 1,03; 1,75 y 2,62 mm. Los resultados evidenciaron que mayores concentraciones de alginato y un incremento en el tamaño de las cápsulas reducen la mortalidad microbiana. Asimismo, el estudio resalta la eficacia de la inmovilización en alginato con el propósito de mejorar la supervivencia de los probióticos durante su paso por el tracto gastrointestinal y aporta una herramienta útil para optimizar sistemas de encapsulación en alimentos funcionales y productos farmacéuticos. Además, se señala que la resistencia varía entre cepas, por lo que los parámetros del modelo deben ajustarse específicamente. En conjunto, la investigación constituye una base técnica relevante para el diseño de sistemas encapsulados que aseguren la supervivencia y funcionalidad de probióticos en aplicaciones prácticas.

Del mismo modo, Parthiban et al., (2006), “Estabilidad de *Lactobacillus reuteri* en diferentes tipos de microcápsulas” en Canadá. Evaluó la encapsulación individual de cinco cepas de *L. reuteri*, utilizando: alginato al 3 % (p/v); alginato al 2 % (p/v) con almidón al 2 % (p/v); β -carragenano al 1,75 % (p/v) junto con 0,75 % (p/v) de goma de algarrobo (LBG); y una mezcla de xantano al 1 % (p/v) con gellan al 0,5 % (p/v). La extrusión se realizó a través de una aguja de jeringa 21G hacia una solución de CaCl_2 0,5 M y emulsión en sistema de agua y aceite. Los resultados reportados por los autores indican que el tamaño y la morfología de las cápsulas variaron según el material y el método empleado. Con extrusión, los diámetros oscilaron entre 2 y 4 mm; las cápsulas de alginato y alginato con almidón fueron más esféricas y homogéneas, mientras que las demás presentaron formas menos regulares. Respecto a la viabilidad, las células libres mostraron una disminución significativa tras la exposición a jugo gástrico simulado (pH 1,5) durante dos horas. La encapsulación incrementó notablemente la

supervivencia en todas las formulaciones. Las cápsulas de alginato y alginato con almidón obtenidas por extrusión ofrecieron la mayor protección frente al ácido gástrico. En cambio, las formulaciones con β -carragenano o xantano con gellan fueron menos eficaces. En conclusión, tanto la naturaleza del polímero como la técnica de encapsulación influyen en la capacidad protectora sobre *L. reuteri*, destacándose el alginato, especialmente combinado con almidón y preparado por extrusión, como el sistema más eficiente bajo condiciones simuladas de estrés ácido.

Rosas-Ledesma et al., (2012), en su trabajo de investigación titulada “Cápsulas de alginato de calcio para la administración oral de bacterias probióticas en peces: evaluación de las condiciones óptimas de encapsulación.” hecho en el Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, España, el presente trabajo se evaluó diferentes concentraciones de alginato (1%, 2%, 3% y 4% p/v) y CaCl_2 (0,5%, 1%, 2% y 3% p/v) para determinar las condiciones óptimas de preparación de las cápsulas. La encapsulación se realizó por la técnica de goteo con una aguja de 16 G a una altura de caída de 7 cm para garantizar la formación de gotas esféricas y permanecieron en la solución de CaCl_2 durante 30 minutos y luego se transfirieron a una solución salina. Además, se analizó la influencia de la temperatura de almacenamiento y el paso a través del tracto gastrointestinal (TGI) de peces en la viabilidad de los probióticos. Los resultados muestran que el tamaño de las cápsulas se incrementa proporcionalmente a la concentración de alginato así mismo se observó que el contenido bacteriano de las cápsulas se reducirá a medida que aumentará la concentración de calcio. También indica, que las cápsulas conservadas a 4 °C durante al menos un mes, manteniendo tasas de supervivencia por encima del 90%. En cambio, al almacenarse a 22 °C, las cápsulas experimentaron una pérdida de viabilidad del 40% en un plazo de 30 días, independientemente del contenido de alginato o calcio. La pérdida de viabilidad observada a 22°C ocurrió más rápidamente (en 3 días) para las bacterias encapsuladas en cápsulas con mayor contenido de calcio (2% y 3%), mientras que los probióticos encapsulados en cápsulas con menor concentración de calcio mostraron tasas de inactivación más bajas. Por último, se confirma que los probióticos encapsulados mantienen su viabilidad al atravesar el tracto gastrointestinal de los peces.

Défas & Moreira (2017), realiza el siguiente trabajo, “Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en yogur sin sabor” en el Laboratorio de Análisis de Alimentos y el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano de la Escuela Agrícola, Honduras. El estudio tuvo como objetivo evaluar la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en alginato de sodio mediante el método de extrusión para mejorar su estabilidad en yogur natural. Se utilizó alginato al 2 % (p/v) y se hizo pasar a través de una aguja de 22G sobre la solución de CaCl_2 100 mM. Las cápsulas obtenidas presentaron un diámetro promedio de $2,19 \pm 0,20$ mm y una eficiencia de encapsulación aproximada del 76 %. En la simulación del tracto gastrointestinal, durante seis horas, se observó una disminución significativa del peso en la etapa gástrica, aunque las cápsulas conservaron su integridad estructural en las fases posteriores, concluyen que la encapsulación con alginato al 2 % empleando extrusión con aguja 22G generó cápsulas esféricas de aproximadamente 2,2 mm capaces de proteger eficazmente a *L. plantarum* frente a condiciones gastrointestinales simuladas y durante el almacenamiento en yogur. Sin embargo, el diámetro obtenido resultó inadecuado para evitar su detección sensorial, por lo que se sugiere reducir el tamaño de partícula para mejorar su aplicabilidad tecnológica.

Sancho, (2019). En su trabajo “Evaluación de la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* encapsulado con diferentes concentraciones de alginato” realizado en Universidad Miguel Hernández de Elche, España. En este estudio tuvo como objetivo encapsular *Lactobacillus acidophilus* mediante la técnica de extrusión utilizando distintas concentraciones de alginato (2, 4 y 6 %) con el fin de evaluar su efecto protector. Se utilizó una aguja de 21 G y una solución de CaCl_2 al 0.1 M. Los resultados evidenciaron que el aumento en la concentración de alginato generó cápsulas con mayor resistencia mecánica y estructura más compacta, aunque también con mayor diámetro. Asimismo, el uso de agujas de mayor calibre produjo cápsulas de mayor tamaño, mientras que agujas más finas permitieron obtener partículas más pequeñas y relativamente más uniformes. Los diámetros tuvieron variaciones entre 2.49 mm a 2.66 mm.. La eficiencia de encapsulación fue de 89.8 % a 100 %, obteniéndose mayor eficiencia a mayor concentración de alginato. Respecto a la supervivencia de durante la digestión in vitro, las cápsulas elaboradas con 6 % de alginato mostraron la menor disminución de viabilidad. Finalmente propone considerar el uso de cápsulas elaboradas con 6 % de alginato en estudios posteriores donde se incorporen a alimentos, evaluando su compatibilidad,

estabilidad durante el almacenamiento y asegurando una liberación controlada en el momento oportuno.

Azam et al., (2020). En su trabajo de investigación titulada, “Sistema de encapsulación biopolimérica basado en prebióticos para mejorar la supervivencia de *Lactobacillus rhamnosus*: encapsulación de *L. rhamnosus* basada en prebióticos para incrementar su viabilidad”. Desarrollado en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Agricultura de Faisalabad, Faisalabad, Punjab, Pakistán. En el presente trabajo se evaluó la supervivencia in vitro de *Lactobacillus rhamnosus* encapsulados en fructooligosacáridos (FOS) extraídos a partir de cáscara de plátanos y alginato de sodio (SA) al 2 %. Se empearon en diferentes proporciones: M0 (100 % SA), M1 (75 % SA + 25 % FOS), M2 (50 % SA + 50 % FOS), M3 (25 % SA + 75 % FOS) y M4 (100 % FOS). El método de encapsulación utilizado fue la técnica de extrusión, con aguja de distintos calibres (24, 25 y 27 G), depositadas en una solución de CaCl_2 0,4 M. En este trabajo de investigación se tuvo una eficiencia de encapsulación del $84 \pm 1\%$. Con respecto al diámetro de las cápsulas estuvo influenciado tanto por la relación entre alginato de sodio (SA) y fructooligosacáridos (FOS) como por el calibre de la aguja empleada. El menor tamaño se registró en la formulación M3 (25% SA + 75% FOS) utilizando una aguja de 24 G, mientras que el mayor diámetro correspondió a la formulación M1 (75% SA + 25% FOS) cuando se empleó una aguja de 27 G. Finalmente se concluye que la encapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* mediante una mezcla de fructooligosacáridos (FOS) y alginato de sodio (SA) incrementó de manera significativa la viabilidad del probiótico tanto en condiciones gastrointestinales simuladas como durante el almacenamiento. Esta combinación con efecto prebiótico constituye una estrategia natural y efectiva para proteger y favorecer una liberación controlada de microorganismos probióticos.

1.2. Base teórica

1.2.1. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que, en cantidades adecuadas, benefician la salud la salud del organismo que los hospedan (Gasbarrini et al., 2016), estableciéndose como una alternativa natural a los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento en animales, ya que favorecen la digestión, el aumento de peso y la conversión alimenticia sin efectos secundarios (Ramírez et al., 2013). Actualmente, los probióticos se emplean en

alimentos, medicamentos y suplementos ha demostrado eficacia en la prevención y tratamiento de enfermedades digestivas, hepáticas, autoinmunes y óseas. (Rappaccioli Salinas et al., 2021).

El término probióticos, viene del griego, donde "pro" significa "a favor" y "biótico" se refiere a "vida" (Pacheco Martínez et al., 2023), este concepto fue usado por el científico alemán Werner Kollath en 1953 para describir a “sustancias activas esenciales para un desarrollo saludable de la vida”. Posteriormente, Lilly y Stillwell (1965) utilizaron esta palabra en un sentido distinto, describiéndola como “sustancias producidas por un organismo que favorecen el crecimiento de otro” (Gasbarrini et al., 2016). De manera más específica, Fuller, en 1992, describió los probióticos como "suplementos alimenticios que contienen microorganismos vivos que benefician al huésped al optimizar el equilibrio de su microbiota intestinal (McFarland, 2015). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) los describe como "microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades apropiadas, confieren beneficios para la salud del huésped" (FAO/WHO, 2006; Pablo López et al., 2023), esta definición fue mantenida en 2013 por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP), (Pérez Leonard et al., 2013).

Los probióticos pueden contener una o varias cepas microbianas seleccionadas. En la Unión Europea, los suplementos alimenticios generalmente contienen bacterias Gram positivas, como las del género *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. También se consideran probióticos algunas cepas de hongos y levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces* son considerados como probióticos (Markowiak & Ślizewska, 2018). En la nutrición animal, los probióticos comúnmente empleados suelen estar compuestos por distintas cepas bacterianas, entre más prevalentes se encuentran las cepas de *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Algunos productos también contienen levadura viable y hongos, como: *Aspergillus oryzae*, *Candida pintolopesii*, *Saccharomyces boulardii* y *Saccharomyces cerevisiae*, proporcionando una variedad de microorganismos beneficiosos para la salud animal (FAO, 2016).

Los niveles de dosis eficaces de los probióticos varían según la cepa específica que se considere, no se puede asumir de manera universal que una única dosis sea eficaz para todas las cepas (Sanders, 2008). Sin embargo, una dosis diaria de 10^6 – 10^7 UFC/g de producto generalmente se reconoce como un rango efectivo para la gran parte de las aplicaciones probióticas (Krasaekoopt et al., 2003; Burgain et al., 2011).

1.2.2. Selección de bacterias probióticas

Para que un microorganismo pueda ser considerado como probiótico, debe poseer con varios criterios establecidos, los criterios más importantes incluyen: un número suficiente de bacterias viables, la capacidad de ejercer un efecto beneficioso sobre la salud del huésped y contribuir en el adecuado funcionamiento del aparato digestivo (Markowiak & Ślizewska, 2018) además debe ser capaz de sobrevivir condiciones de acidez y pH del tracto gastrointestinal, que pueden unirse a la mucosa intestinal y tener actividad antimicrobiana contra patógenos (Pranteda, 2011) , por ello, la elección adecuada de cepas bacterianas y la administración de una dosis correcta son aspectos clave (Markowiak & Ślizewska, 2018).

1.2.3. Mecanismo de acción de probióticos

Las vías por las cuales los probióticos ejercen sus efectos beneficiosos siguen siendo en gran parte desconocidos; sin embargo, es muy probable que estos mecanismos sean multifactoriales (Collado et al., 2010). Los mecanismos de acción de los probióticos pueden clasificarse en cuatro: adhesión al epitelio intestinal, desplazamiento competitiva de agentes patógenos, refuerzo de la barrera epitelial y modulación del sistema inmunitario (Camacho-Cruz et al., 2022).

1.2.3.1. Adhesión a la mucosa intestinal

Para considerar a una cepa microbiana como probiótico, debe cumplir ciertos requisitos esenciales para garantizar su eficacia y seguridad (Plaza-Díaz et al., 2019), por lo cual, la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal se considera en uno de los criterios fundamentales para seleccionar nuevos microorganismos probióticos (Juntunen et al., 2001).

Se ha demostrado que la adhesión es específica de cada cepa y puede variar considerablemente entre diferentes cepas probióticas. Especies como: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han demostrado la capacidad de adherirse al moco intestinal, aunque algunas cepas exhiben tasas de adhesión más altas que otras, este proceso, involucra diversas moléculas, como las adhesinas que son proteínas bacterianas, que reconocen receptores específicos en la mucosa, esta adhesión de los probióticos contribuye en sus efectos protectores al inhibir y desplazar bacterias patógenas (Collado et al., 2005).

1.2.3.2. Exclusión competitiva de patógenos

La exclusión competitiva se refiere a la situación en la que una especie de bacteria compete de manera más activa que otras por los sitios receptores en el tracto intestinal (Bermudez-Brito et al., 2012), mediante mecanismo como la disminución del pH luminal, la competencia por fuentes de nutrientes disponibles (Collado et al., 2010) y la producción de ácidos orgánicos, así como la producción de compuestos antibacterianos, como las bacteriocinas (Bermudez-Brito et al., 2012).

Los ácidos orgánicos, principalmente el ácido acético y el ácido láctico, poseen una capacidad antimicrobiana sobre las bacterias Gram negativas y considerándose como los principales compuestos antimicrobianos asociados a los probióticos, que son responsables del efecto inhibitorio sobre microorganismos patógenos (Alakomi et al., 2000). Estos ácidos, cuando se encuentran en su forma no ionizada, pueden atravesar la membrana bacteriana y se ioniza en su citoplasma, provocando una reducción del pH intracelular o la acumulación de la forma ionizada del ácido, lo que eventualmente puede llevar a la muerte del microorganismo patógeno (Collado et al., 2010).

Los probióticos, como lactobacilos y bifidobacterias son capaces de generar bacteriocinas, que limitan la proliferación de determinados patógenos (Plaza-Díaz et al., 2019), los mecanismos más comunes por los cuales las bacteriocinas eliminan microorganismos implica la eliminación de las células objetivo mediante la formación de poros y la inhibición de la formación de la pared celular (Hassan et al., 2012). Además los lactobacilos y bifidobacterias, pueden generar la estimulación de células epiteliales, creación de un ambiente hostil y mediante sus propiedades adhesivas impiden la colonización de microorganismos dañinos, otorgándoles una ventaja competitiva en el tracto intestinal (Bermudez-Brito et al., 2012).

1.2.3.3. Refuerzo de la barrera epitelial

El epitelio intestinal está expuesto de manera continua al contenido luminal, al diverso microbiota intestinal. La barrera intestinal representa un mecanismo de defensa fundamental para mantener la integridad epitelial y proteger al organismo (Bermudez-Brito et al., 2012). Sin embargo cuando la función de esta barrera se ve alterada, los antígenos bacterianos y alimentarios pueden llegar a la submucosa desencadenando una respuesta inflamatoria, lo que puede desencadenar trastornos intestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal (Sartor, 2006).

Las bacterias con capacidad probióticas han sido ampliamente estudiadas por su contribución en el mantenimiento de esta barrera. No obstante, los procesos específicos mediante los cuales los probióticos fortalecen la función de la barrera intestinal todavía no se comprenden por completo (Bermudez-Brito et al., 2012). Las mucinas son glucoproteínas macromoleculares que constituyen componentes esenciales de la capa de moco epitelial y han sido asociadas tanto con la salud como con diversas enfermedades. Se ha propuesto que los probióticos pueden estimular la secreción de moco como un mecanismo para fortalecer la función de la barrera intestinal y reduce la unión de patógenos. Diversas especies de *Lactobacillus* han demostrado la capacidad de aumentar la expresión de mucinas en celulares intestinales humanas (Bermudez-Brito et al., 2012).

1.2.3.4. Modulación del sistema inmunológico

El tracto gastrointestinal actúa como una interfaz clave entre el organismo y el entorno exterior, cumpliendo una doble función: impedir la entrada de patógenos y, al mismo tiempo, permitir la absorción de nutrientes (Borchers et al., 2009).

Entre los mecanismos más relevantes asociados a la acción de los probióticos se encuentra su capacidad para modular la respuesta inmune del huésped. El sistema inmune se clasifica en componentes innatos y adaptativos. La respuesta adaptativa depende de la participación de los linfocitos B y T, que reconocen y se unen a antígenos específicos. En cambio, la inmunidad innata actúa mediante el reconocimiento de estructuras comunes denominadas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), las cuales son compartidas por numerosos agentes patógenos. La respuesta inicial a los patógenos está mediada por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que interactúan con los PAMP. Entre estos receptores se encuentran los receptores tipo Toll (TLR), proteínas transmembrana expresadas en diversas células inmunes y no inmunes, incluyendo linfocito B, células asesinas naturales (NK), células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales (Plaza-Díaz et al., 2019). Los efectos inmunomoduladores resultan de la interacción de las bacterias probióticas con células epiteliales, células dendríticas, monocitos, macrófagos y linfocitos (D'Amelio & Sassi, 2018).

Las células dendríticas desempeñan un papel clave en la generación de una respuesta inflamatoria efectiva contra el agente nocivo, junto con la producción de citocinas como IL-2, IL-12 e IFN-gamma, que favorecen la diferenciación de los linfocitos TH1, además se ha evidenciado que los probióticos modulan la producción de citocinas, incrementan la secreción

de mucina, potencian la fagocitosis, activan las células T y las células asesinas naturales, estimulan la síntesis de IgA y afectan la proliferación de células T (Borchers et al., 2009).

Sin embargo, todavía es complicado llegar a una conclusión definitiva sobre la contribución de los probióticos al sistema inmunológico del huésped (Yan & Polk, 2011).

1.2.4. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) corresponden a un grupo funcional conformado por diversas especies de bacterias Gram positivas, pueden ser cocos o bacilos con capacidad aerobia o facultativamente anaerobia, no forman esporas, son negativas para las pruebas de oxidasa, catalasa y bencidina, carecen de citocromos, no reducen nitratos a nitritos, no producen gelatinasa y no pueden metabolizar el lactato, su longitud varía según el género, oscilando entre 0,5 y 0,8 μm (Carr et al., 2002). Estas bacterias son no patógenas, no toxigénicas, se clasifica en bacterias homofermentativas y heterofermentativas según los productos resultantes de su metabolismo. Las homofermentativas convierten los carbohidratos principalmente en ácido láctico, como producto final, mientras que las heterofermentativas generan, adicionalmente dióxido de carbono, etanol o ácido acético (Sánchez & Tromps, 2014).

Los criterios fundamentales para determinar que una cepa de bacterias ácido lácticas (BAL) sea considerada probiótica incluyen su capacidad para prosperar en un entorno con un pH inferior a 4,0, controlar la proliferación de bacterias patógenas, mantener su viabilidad en el tracto gastrointestinal, resistir a la exposición de sales biliares, y demostrar habilidad para adherirse tanto al mucus intestinal como a las células (Pacheco Martínez et al., 2023).

Dentro de las bacterias ácido lácticas (BAL), los géneros más empleados dentro de este grupo son los *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.* y *Streptococcus sp.* debido a su capacidad para generar ácido láctico, reducen el pH en el intestino, lo que complica la multiplicación y establecimiento de bacterias perjudiciales, contribuyendo así a evitar posibles daños en la superficie de absorción intestinal (Díaz López et al., 2017) y también los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus* (Vera Peña et al., 2019), de los cuales los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son posiblemente los microorganismos más seguros utilizados como probióticos. Esta seguridad se fundamenta en varias razones: debido a que estos microorganismos han sido tradicionalmente empleados de manera segura en la elaboración de diversos alimentos fermentados, también se encuentran de forma natural en el tracto gastrointestinal en humanos

y en animales en cantidades significativas y por último , las infecciones relacionadas con estos microorganismos son excepcionalmente infrecuentes (FAO, 2016).

La cantidad recomendada para que las BAL tenga los efectos beneficiosos en el organismo es mínimo 1×10^7 UFC de células probióticas vivas por gramo o mililitro en el producto al momento de ser ingerido y los productos alimenticios deben incluir una cantidad igual o superior a 1×10^6 UFC/g de bacterias probióticas viables en el producto final hasta el término de su periodo de validez (Vera Peña et al., 2019).

1.2.5. *Lactobacillus sp.*

Estos microorganismos son bacilos o cocobacilos grampositivos que no forman esporas (Coenye & Vandamme, 2003). Son estrictamente fermentativos, pueden ser aerotolerantes o anaerobios, y tienen una tolerancia o preferencia por medios ácidos. Además, poseen requerimientos nutricionales complejos, que incluyen carbohidratos, aminoácidos, péptidos, ésteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas (Bernardeau et al., 2006).

La temperatura óptima para su desarrollo se sitúa entre 30 y 40 °C, aunque tienen la capacidad de proliferar en un rango amplio de 5 a 53°C. Su intervalo de pH propicio para el crecimiento abarca desde 5,5 hasta 5,8, pero tienen la capacidad de tolerar niveles inferiores y superiores, llegando hasta un pH máximo de 7,2. Estos microorganismos son considerados acidúricos, ya que pueden reducir el pH de los alimentos que colonizan hasta alcanzar un valor de 4, siempre y cuando contengan un carbohidrato fermentable, inhibiendo el crecimiento o incluso la mortalidad de otras bacterias coexistentes (Pranteda Jiménez, 2011). El medio de cultivo adecuado para la identificación, aislamiento y cuantificación de lactobacilos y otras bacterias productoras de ácido láctico es el Agar M.R.S.

1.2.5.1. *Lactobacillus delbrueckii*

Es una bacteria ácido láctica de gran relevancia en la fermentación de productos lácteos como el yogur y los quesos, donde interviene en la acidificación de la leche, con potencial de efecto probiótico (Fariás et al., 2025). Pidiéndose encontrar de forma natural en diversos productos fermentados (Lorenzo et al., 2018). Estas bacterias se caracterizan por su forma de bacilos con extremos redondeados, con dimensiones aproximadas de 0.5–0.8 µm de ancho por

2–9 µm de largo, generalmente se observan aisladas o formando cadenas cortas, aunque en fase estacionaria tardía pueden aparecer cadenas largas (Teixeira, 1999). Gram positivo, no móvil y no formador de esporas, anaeróbico facultativo, se considera acidúrico o acidófilo, ya que requiere un pH bajo (aproximadamente entre 4.6 y 5.4) para crecer de manera eficiente, con un rango óptimo de temperatura entre 43 y 46 °C (Lorenzo et al., 2018). Asimismo, la morfología de *L. bulgaricus* varía según la composición del medio de cultivo y la tensión de oxígeno, pueden cultivarse en caldo MRS y conservarse a 4 °C, realizando transferencias periódicas a medios frescos de agar MRS por un periodo máximo de uno a dos meses.(Teixeira, 1999).

1.2.6. Encapsulado de microorganismos probióticos

Los probióticos, son asociados con una variedad de efectos positivos en la salud de animales y humanos: como la regulación de la microbiota intestinal al inhibir microorganismos dañinos y la modulación de respuestas inmunitarias (Molina, 2019). Sin embargo, para que estos microorganismos con propiedades probióticas puedan inducir estos efectos beneficiosos, necesitan resistir los factores ambientales a los que están expuestos (Rodrigues et al., 2020) y, además, sobrevivir las condiciones desfavorables que encuentran a su paso a través del tracto gastrointestinal superior (Pranteda, 2011), disminuyendo su eficiencia y supervivencia (Sancho, 2019).

Un estudio previo en humanos se examinó la capacidad de varios probióticos disponibles en el mercado, no encapsulados, para sobrevivir durante su tránsito por el tracto gastrointestinal (GIT). Los resultados revelaron que, en tan solo cinco minutos de exposición a los fluidos gástricos, cada producto comercial probado experimentó una reducción significativa de 10^6 veces en las unidades formadoras de colonias (UFC) (Dodoo et al., 2017). En su viaje hacia el intestino delgado y posteriormente al colon, los probióticos enfrentan desafíos importantes, como competir con bacterias preexistentes, adherirse a la capa mucosa intestinal y lograr prosperar y reproducirse, la actividad de enzimas digestivas y la presencia de bilis también disminuyen la capacidad de adherencia de las cepas probiótica (Sun et al., 2023). Debido a esa problemática, se deduce que la técnica de encapsulación puede mejorar la capacidad de los probióticos para sobrevivir y funcionar de manera óptima en el tracto intestinal (Rodrigues et al., 2020).

Dado el tamaño de los microorganismos probióticos, que oscila entre 1 y 5 µm, no es factible utilizar nanotecnologías para su encapsulación. Por esta razón, generalmente se recurre

a la microencapsulación de probióticos. (Pranteda, 2011). La microencapsulación se describe como la técnica de envolver sólidos, líquidos y gases con materiales de revestimiento de diversas composiciones, con el fin de formar cápsulas de dimensiones microscópicas que pueden liberar su contenido de forma regulada en respuesta a condiciones particulares (Pérez Leonard et al., 2013) y establecer un entorno propicio para su mejor supervivencia y estabilidad (Sun et al., 2023).

Se emplean diversas técnicas para la encapsulación de probióticos, lo que da lugar a la obtención de partículas con distintas características. Entre las principales metodologías utilizadas para encapsular microorganismos probióticos se encuentran la extrusión, la emulsión, el secado por aspersión, el enfriamiento por aspersión y el lecho fluidizado (Rodrigues et al., 2020). Hasta ahora, los microorganismos probióticos que se han sometido a microencapsulación son principalmente de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Numerosos estudios han evidenciado que es factible proteger los cultivos probióticos utilizando una diversidad de materiales encapsulantes (Pérez Leonard et al., 2013).

1.2.7. Métodos de encapsulación

1.2.7.1. Método extrusión o goteo

La técnica de extrusión, es ampliamente empleada para encapsular células bacterianas, es conocida por su simplicidad, fácil de uso y reducido costo, además, es un proceso suave que garantiza una alta supervivencia de los microorganismos encapsulados (Rodrigues et al., 2020). La técnica requiere el uso de soluciones de hidrocoloide que contienen cultivos microbianos (Rodrigues et al., 2017), durante el proceso se mezclan probióticos con un hidrocoloide y luego se introduce la mezcla resultante en una extrusora, comúnmente una jeringa, al ejercer presión sobre el émbolo de la jeringa, el contenido se desplaza hacia una solución gelificante mientras se agita suavemente, el tamaño y la forma de las gotas dependen del diámetro de la aguja y la distancia entre ésta, la solución gelificante (Gbassi & Vandamme, 2012) y la viscosidad de la mezcla hidrocoloide (Dong et al., 2013). Es preciso mencionarlo que cuando se realiza en de laboratorio, se emplea una jeringa, mientras que a nivel piloto se utiliza un dispositivo extrusor con control sobre su tamaño y velocidad de dispensación (De Araújo U. et al., 2015). La extrusión es un método simple y directo que permite retener un alto número de células.

Actualmente, hay procesos automatizados que aplican este principio (Gbassi & Vandamme, 2012).

Diversas investigaciones han evidenciado que esta metodología no ocasiona daño a las células, lo que garantiza una elevada supervivencia de los microorganismos probióticos. Además, es posible realizarlo bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas, y no emplea de disolventes nocivos (De Araújo U. et al., 2015), sin embargo, los inconvenientes de esta técnica es que son procesos lentos, lo que complica su uso a gran escala; además carece de eficacia para producir microesferas de tamaño inferior a 500 μm ; y necesita utilizar soluciones hidrocoloides con viscosidad baja a moderada.

1.2.8. Alginato de sodio

El alginato es un polisacárido de origen natural, obtenido a partir de diferentes especies de algas, y está compuesto por ácidos β -D-manurónico y α -L-gulurónico (Burgain et al., 2011). El alginato de calcio es el resultado de la combinación del alginato de sodio con un ion de calcio, que es generalmente utilizado para procesos de encapsulación de probióticos debido a que es un método sencillo, no tóxico, biocompatible y de menor costo (Krasaekoopt et al., 2003).

1.2.9. Gluconato de calcio 10 %

El gluconato de calcio al 10 %, es una solución utilizada como fuente de calcio y constituye como la principal alternativa terapéutica para el manejo de la hipocalcemia grave en la medicina de urgencia (Turner et al., 2019). Asimismo, se ha demostrado que favorece el incremento de la densidad mineral ósea en pacientes que han sido sometidos a una gastrectomía y supera al carbonato de calcio en el mantenimiento del equilibrio del calcio cuando la producción de ácido gástrico es deficiente (Krause et al., 2015). En el proceso de la formación de las cápsulas alginato, el calcio aportado por el gluconato de calcio al 10%, cumple una función importante, induciendo el proceso de gelificación iónica, en el cual los iones calcio establecen enlaces entre las cadenas poliméricas del alginato, originando la formación de cápsulas (Pasqualim et al., 2010).

1.3. Método de cuantificación

La cuantificación de microorganismos resulta fundamental en los estudios de ecología microbiana y microbiología clínica es esencial determinar la cantidad de estos microorganismos presentes. Este dato permite evaluar si poseen la capacidad suficiente para ejercer una función beneficiosa o, por el contrario, ocasionar un daño (Corral-Lugo et al., 2012). El método de recuento en placa es una de las técnicas más utilizadas para estimar la cantidad de microorganismos viables presentes (Ramírez S et al., 2017).

1.3.1.1. La metodología de recuento en placa por plaqueo

También conocida como recuento en placa mediante siembra en superficie (Ramírez S et al., 2017) o extensión (Madigan et al., 2015). Este método se basa en realizar diluciones seriadas en proporción 1:10 y distribuir 100 µl de cada dilución sobre una placa de cultivo. Luego, las placas se incuban hasta que las colonias sean visibles y puedan contarse, para determinar la cantidad en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro o miligramo, una de las principales ventajas de esta técnica es que ofrece un buen límite de detección (Corral-Lugo et al., 2012).

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología e Inmunología Veterinaria de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, ubicada en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga Departamento de Ayacucho, a una altura de 2790 m.s.n.m., con temperatura media de 17.5 °C y una humedad relativa media de 60% (SENAMHI, 2026).

2.2. Materiales

2.2.1. Material biológico

- Bacteria ácido láctica comercial (*Lactobacillus delbrueckii*)

2.2.2. Materiales

- Vasos precipitados
- Placa Petri
- Varilla
- Jeringas de 3, 5, 10 mL
- Aguja hipodérmica de 25 G
- Micropipeta de 100 -1000 uL
- Tips Azules 100-1000 uL
- Asa de digralsky
- Probetas 20 mL, 100 mL
- Matraz Erlenmeyer 250 mL, 500 mL
- Tubos de ensayo 15 mL
- Gradillas
- Papel filtro
- Papel toalla
- Láminas portaobjetos
- Mortero y pilón
- Mechero

- Gorra descartable
- Guantes de látex
- Mascarilla descartable
- Algodón
- Pabilo

2.2.3. Equipos

- Incubadora de Laboratorio
- Refrigeradora
- Agitador orbital
- Balanza analítica
- Autoclave
- Vernier digital
- Vórtex
- Microscopio

2.2.4. Insumos

- Gluconato de calcio al 10%
- Alginato de sodio
- Agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS)
- Caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS)
- Agua destilada

2.3. Problema específico

- ¿Cuál será la concentración en porcentaje de alginato de sodio para la encapsulación de bacterias ácido lácticos (*Lactobacillus delbrueckii*) en una concentración estándar para la supervivencia en el ambiente?
- ¿Cuál será la cantidad de cápsulas por mililitro (mL) obtenidas en una concentración estándar de bacterias ácidas lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) para determinar su calidad a 0, 1, 2, 3 semanas?
- ¿Cuál será la supervivencia en el ambiente evaluados a 0, 1, 2, 3 semanas de las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) en una concentración estándar, encapsuladas en alginato de sodio?

2.4. Procedimiento metodológico

El presente trabajo se dividió en cuatro etapas principales:

2.4.1. Determinación de la mejor concentración de alginato de sodio en porcentaje

Se llevó a cabo una etapa preliminar de encapsulación sin la inclusión de bacterias, con el propósito de determinar la concentración óptima de alginato de sodio que permita obtener cápsulas con la mayor estabilidad y calidad física a temperatura ambiente. Esta fase fue fundamental para asegurar que las cápsulas formadas presenten características adecuadas que favorezcan la viabilidad y protección de las bacterias ácido lácticas durante el tiempo y las condiciones ambientales evaluadas.

Preparación:

- El alginato de sodio fue mezclado en 20 mL de agua destilada a diferentes concentraciones de 1%, 2% y 3%.
- Cada mezcla en diferentes concentraciones de alginato de sodio fue homogenizada hasta eliminar los grumos.
- Posteriormente, se procedió a realizar la formación de las cápsulas mediante el método de extrusión, cada mezcla fue cargada en una jeringa de 3 mL y se dejó caer gota a gota mediante una aguja de 25 G, sobre la solución de gluconato de calcio al 0.2 M contenida en un vaso precipitado, mantenida en constante agitación con ayuda del agitador orbital a 250 rpm.
- Las cápsulas permanecieron en la solución de gluconato de calcio durante 30 minutos en constante agitación.
- Concluido ese tiempo, las cápsulas de alginato contenidas en el vaso precipitado fueron lavadas tres veces con agua destilada para eliminar los restos de la solución de gluconato de calcio a 0.2 M.
- Se tomaron las cápsulas al azar de cada una de las concentraciones a una placa Petri para su evaluación en forma y consistencia.

Finalmente, se optó utilizar la concentración de alginato de sodio al 2 % para el proceso de encapsulado de *Lactobacillus delbrueckii*, debido a que presentó una mejor forma y consistencia de las cápsulas en comparación con las concentraciones al 1% y 3 %. Los resultados están descriptos en el capítulo III.

2.4.2. Condiciones generales: activación y determinación de concentración de las BAL.

2.4.2.1. Activación y crecimiento de las bacterias

Se tomó 1 g del cultivo bacterias comercial de *Lactobacillus delbrueckii* y se inoculó en 10 ml de caldo MRS. La mezcla se incubó a 37 °C durante 72 horas, obteniéndose así la solución madre.

La activación y el crecimiento de las bacterias fueron evaluados mediante:

- Observación del cambio de color del medio líquido MRS, indicador de la producción de ácido láctico (de amarillo ámbar a marrón)
- Presencia de sedimentación, la cual sugirió un crecimiento significativo.
- Tinción de Gram confirmando que las bacterias eran Gram positivas, característica esperada de la cepa utilizada.

Las imágenes correspondientes se encuentran en los anexos 2 y 3.

2.4.2.2. Determinación de la concentración de BAL

A partir de la solución madre se realizaron diluciones seriadas a hasta alcanzar una concentración de 10^{-4} , la cual se incubó a 37 °C durante 72 horas. Posteriormente, se tomaron 100 µL de la dilución y se sembraron por duplicado en agar MRS, usando el método de extensión con una asa de Digralsky. Las placas se incubaron 37 °C durante 72 horas.

Se realizó la caracterización macroscópica de las colonias, evaluando: forma, tamaño, elevación, consistencia, superficie y borde. Las colonias de *Lactobacillus delbrueckii* presentan unas formas circulares, tamaño de pequeñas a medianas, elevación convexa y lisa, consistencia cremosa, de superficie lisa con bordes regulares y rara vez se presentan con superficie rugosa con borde irregulares (Ramírez-Baca et al., 2009). Las imagen y caracterización correspondiente se encuentran en el anexo 4.

Finalmente, se calculó la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo antes del encapsulado, contabilizando las colonias presentes en cada placa. Para el análisis, los recuentos bacterianos fueron transformados a escala logarítmica (Log UFC/g), siguiendo las recomendaciones de Jarvis (2016) y Brunelle et al. (2012), debido a que los datos de recuentos con múltiples diluciones no se ajustan a distribución normales ni de Poisson.

2.4.3. Encapsulación de las BAL

El proceso de encapsulación de *Lactobacillus delbrueckii* se realizó mediante el método de extrusión y llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos:

- La mezcla de alginato al 2% y *Lactobacillus delbrueckii* (10^{-4}) se preparó en una proporción de 4 :1 respectivamente, contenida en un vaso de precipitado se agitó hasta obtener una homogeneización completa.
- La solución de gluconato de calcio 0.2 M se preparó en vasos de precipitados. La mezcla de alginato con bacterias *Lactobacillus delbrueckii* (10^{-4}) se cargó en una jeringa con una aguja de calibre 25 G y se dejó caer gota a gota sobre la solución de calcio
- Durante este proceso se determinó la cantidad de cápsulas por mililitro (mL) de la mezcla mediante cinco conteos independiente.
- Las cápsulas permanecieron en la solución de gluconato de calcio durante 30 minutos en constante agitación con ayuda del agitador orbital a 250 rpm.
- Posteriormente, las cápsulas fueron recuperadas en papel filtro y lavadas tres veces con agua destilada y transferidos a una placa Petri para evaluar la supervivencia de las bacterias a la 0 semana, 1 semana, 2 semana y 3 semana a condiciones ambientales.

2.4.4. Evaluación de supervivencia de BAL encapsulados

Para determinar la viabilidad de las bacterias *Lactobacillus delbrueckii* encapsuladas:

- Se tomaron 100 cápsulas al azar y se trituraron en un mortero.
- Se añadieron 10 mL de caldo MRS y la mezcla fue homogenizada antes de transferirse un tubo de ensayo.
- Se sembraron 100 μ L de la muestra por duplicado, en agar MRS usando el método de extensión con ayuda asa de Digrafsky, (Yeung et al., 2016).
- Las placas fueron incubadas 37 °C durante 72 horas.
- Finalmente, se contabilizó el número de colonia y los datos se reportados como Log UFC/g.

El mismo procedimiento se aplicó a todas las repeticiones a la semana 0, 1, 2 y 3.

2.5. Análisis de datos

2.5.1. Unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g)

$$UFC/g = \frac{\text{Colonias enumeradas}}{\text{mL sembrados}} \times \text{Factor de dilución (Madigan et al., 2015)}.$$

Mediante la siguiente formula se determinó las UFC/g antes y después del proceso de encapsulado de las bacterias *Lactobacillus delbrueckii*, considerando la dilución 10^{-4} en cada una de las repeticiones.

2.5.2. Transformación a escala logarítmica

Se aplico la siguiente formula:

$$\log_{10}(UFC + 1)$$

Se aplica cuando los datos incluyen ceros, donde “+ 1” es la correccion matemática. Todos los datos transformados se reportan como Log UFC/g (Jarvis, 2016).

2.5.3. Humedad (%)

Para determinar la humedad de las cápsulas se usó la siguiente formula:

$$Humedad (\%) = \frac{PH(g) - PS(g)}{PH(g)} \times 100$$

(Sancho, 2019), Donde:

- PH (g) = peso de cápsulas húmedas en gramo.
- PS (g) = peso de cápsulas secas en gramos.

2.5.4. Eficiencia de encapsulación (EE %)

Para determinar la EE %, se aplicó la formula:

$$EE \% = \frac{N}{N_0} \times 100$$

(Mirzamani et al., 2021), Donde:

- N = número de bacterias liberadas de la cápsula (Log UFC/g)
- N_0 = número de bacterias libres (Log UFC/g) añadidas a la solución de alginato

2.5.5. Análisis estadístico

La normalidad de los datos de supervivencia se evaluó mediante la prueba de Shapiro–Wilk. El análisis estadístico se realizó con el software The jamovi project (2022), version 2.3. La desviación estándar de las medias se calculó utilizando Microsoft Excel.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Concentración de alginato de sodio para la encapsulación de *Lactobacillus delbrueckii*.

Tabla 1

Evaluación física de las cápsulas según concentración de alginato a temperatura ambiente

Repetición	Concentración de Alginato (%)	Condición de Almacenamiento	Estado de las Cápsulas (Forma y consistencia)
R1	1%	Ambiente (25°C)	Esférica, blanda
R2	1%	Ambiente (25°C)	Esférica, blanda
R3	1%	Ambiente (25°C)	Esférica, blanda
R1	2%	Ambiente (25°C)	Esférica, dura
R2	2%	Ambiente (25°C)	Esférica, dura
R3	2%	Ambiente (25°C)	Esférica, dura
R1	3%	Ambiente (25°C)	Pleomórfica, dura
R2	3%	Ambiente (25°C)	Pleomórfica, dura
R3	3%	Ambiente (25°C)	Pleomórfica, dura

Nota. Se muestra las características físicas evaluadas de las cápsulas. Se consideraron tres repeticiones para cada concentración de alginato.

Los resultados de la fase preliminar muestran la influencia de la concentración de alginato de sodio (1 %, 2 % y 3 %) sobre la forma y consistencia de las cápsulas, con el objetivo de establecer un protocolo de encapsulación que garantice cápsulas esféricas y consistentes. Esta fase se realizó sin inclusión de *Lactobacillus delbrueckii*, bajo condiciones ambientales controladas (25 °C), utilizando una aguja de 25 G para la formación de las cápsulas.

Como se observa en la tabla 1, la concentración de alginato que produjo mejores características físicas fue la concentración de 2 %, con cápsulas esféricas y de consistencia dura. Por esta razón se seleccionó esta concentración para el encapsulado de *Lactobacillus delbrueckii* en el presente trabajo de investigación.

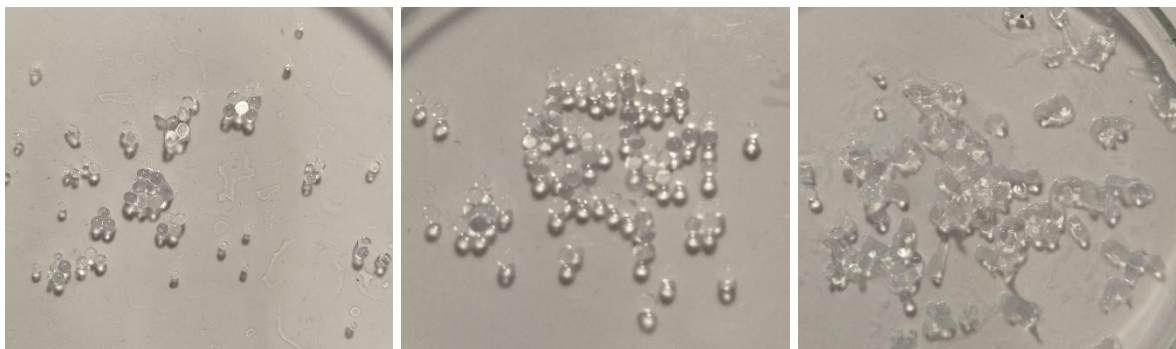
Figura 1

Cápsulas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato de sodio

A

B

C



Nota. Se muestran las cápsulas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato de sodio. Las cápsulas presentan características físicas similares dentro de cada concentración, mientras que se observan variaciones al comparar las concentraciones de 1 %, 2 % y 3 %.

Los resultados obtenidos en las repeticiones de cada concentración de alginato, muestran las mismas características físicas, pero si se muestra variaciones al comparar las concentraciones de alginato de 1 %, 2% y 3% de alginato de sodio.

3.1.1. Concentración de alginato al 1 %.

Las cápsulas obtenidas a esta concentración presentaron una forma esférica y una consistencia blanda al tacto. Durante la preparación, la mezcla de alginato y agua destilada mostró un aspecto muy fluido y de baja viscosidad, lo que contribuyó a la consistencia blanda observada en las cápsulas.

3.1.2. Concentración de alginato al 2 %

Las cápsulas obtenidas con una concentración de 2% mantuvieron la forma esférica y presentaron una consistencia dura al tacto en comparación a la concentración de 1 %. La mezcla de alginato y agua destilada presentó una moderada fluidez y viscosidad moderadas, lo que favoreció la formación de cápsulas uniformes y esféricas.

3.1.3. Concentración de alginato al 3%

A una concentración de 3% visualmente las cápsulas presentan formas pleomórficas, elípticas y en forma de lágrimas, la consistencia al tacto es más dura a comparación de la concentración 1% y 2%. La mezcla presentó menor fluides, con presencia de grumos y se tuvo mayor dificultad para homogenizarse, así como una viscosidad más alta, lo que dificultó la obtención de cápsulas esféricas.

No se encontró referencia bibliográfica que describan específicamente las características físicas evaluadas en el presente estudio como la forma y consistencia de la capsula a diferentes

concentraciones de alginato de sodio (1%, 2%, 3%), utilizando una aguja de 25G, con el cual se pueda discutir esta fase preliminar. Sin embargo, existen reportes que describen procedimientos similares utilizando calibre de aguja diferentes. Por ejemplo Lee & Heo (2000), utilizaron una aguja de 20 G y concentraciones de alginato de 2 al 4 %, obtuvieron cápsulas esféricas, sin embargo, al usar concentración por debajo de 2% , no lograron obtener cápsulas de forma esféricas. Parthiban et al.(2006), emplearon una aguja de 21 G y 3 % de alginato mediante el método de encapsulación por extrusión, obtuvieron cápsulas esféricas y regulares. Rosas-Ledesma et al.(2012), al emplear una aguja de 16 G y concentraciones de alginato de 1% a 4%, reportaron que en las concentraciones de 3% y 4 % permitieron obtener cápsulas más esféricas a comparación a 2 %, asimismo, al observar las cápsulas al microscopio óptico determinaron que la concentración inferior a 2 % no producen cápsulas esféricas.

En el presente estudio la concentración de alginato de sodio al 2 % elaboradas con una aguja de 25 G, proporcionó una adecuada fluides y viscosidad permitiendo obtener cápsulas esféricas, en consecuencia, fue elegida para el encapsulado de *Lactobacillus delbrueckii*. A diferencia de los estudios mencionados, todos ellos obtuvieron cápsulas esféricas a concentraciones de alginato igual o superiores a 3%, esta diferencia podría atribuirse al uso de agujas de mayor calibre, lo que facilita el paso de la solución incluso cuando la viscosidad de la misma sea alta. Del mismo modo, en la concentración de alginato al 1% se obtuvieron cápsulas visualmente esféricas, resultado que no concuerda con lo reportado por Lee & Heo (2000) y Rosas-Ledesma et al. (2012).

En síntesis, la forma de las cápsulas puede verse influenciados por factores como la distancia de caída de las gotas sobre la solución de gluconato de calcio o la concentración de alginato de sodio.

3.2. Cantidad de cápsulas por mL y evaluación de diámetro y peso durante almacenamiento.

Tabla 2

Cantidad de cápsulas obtenidas por mL.

Repetición	Cap./mL	Cap./mL	Cap./mL	Cap./mL	Cap./mL	Promedio
M1	78	82	83	79	78	80
M2	83	81	79	78	79	80
M3	79	83	77	81	80	80

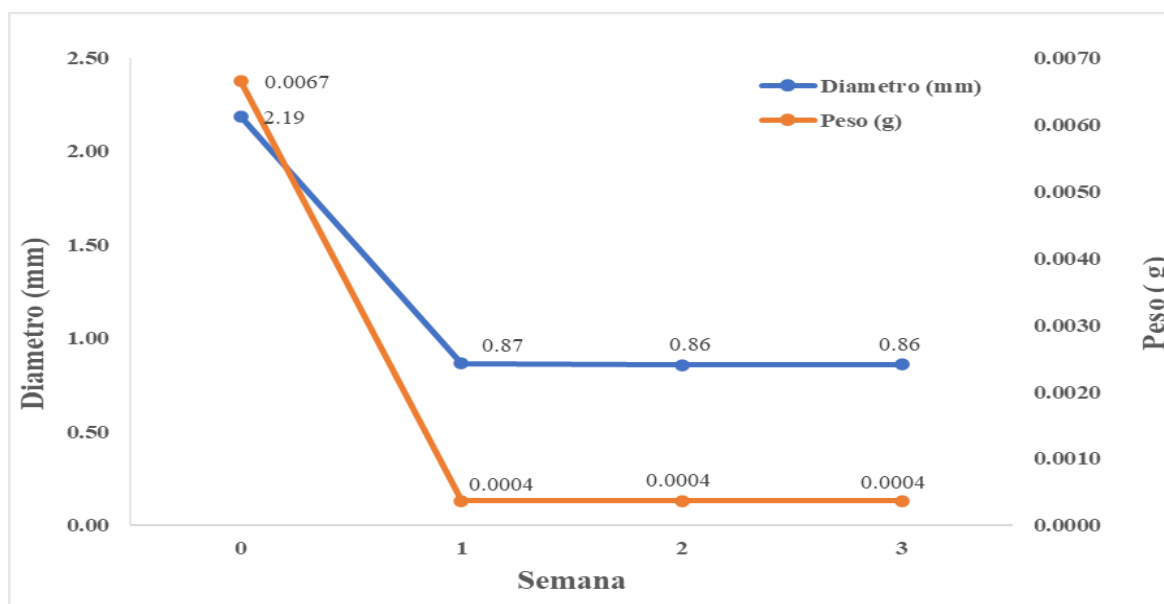
M4	82	80	76	84	78	80
M5	85	77	79	81	78	80

Nota: M1-M5 representan las repeticiones del proceso de encapsulación. Cap./mL. Indica la cantidad de cápsulas obtenidas por mililitro de mezcla de alginato y bacterias.

Los resultados de la tabla 2, muestran la cantidad de cápsulas por mL obtenidas a partir de la mezcla de alginato y *Lactobacillus delbrueckii*. Para cada repetición se realizaron cinco conteos independientes, extrayendo 1 mL de la mezcla mediante una jeringa y se utilizando una aguja de 25 G para la formación de las cápsulas. Se observan pequeñas variaciones entre conteos y repeticiones, probablemente debido a la diferencia en la presión ejercida sobre el embolo de la jeringa durante la extrusión. Sin embargo, la media de cápsulas por mL fue consistente en todas las repeticiones, con un valor promedio de 80 cápsulas/mL. No se encontraron referencias bibliográficas que reporten la cantidad de cápsulas obtenidas por mL bajo condiciones similares, por lo que no fue posible realizar una comparación directa.

Figura 2

Evaluación del diámetro (mm) y peso (g) de las cápsulas durante el almacenamiento al ambiente.



Nota. La figura muestra los cambios en diámetro (mm) y peso (g) de las cápsulas durante las 3 semanas. Cada valor representa la media de las 5 repeticiones.

En la semana 0, las cápsulas recién obtenidas mediante el método de extrusión presentaron un diámetro promedio de 2.19 mm y peso promedio de 0.0067 g. Para la semana 1

se observa una disminución en ambas variables donde el diámetro se redujo hasta una media de 0.87 mm y peso media de 0.0004 g. Este cambio inicial se atribuye a la pérdida de agua contenida en las cápsulas recién formadas.

En comparación con la literatura, Lee & Heo (2000) reportaron cápsulas con diámetro promedio de 1.03 mm al emplear una aguja de 20 G, concentración de alginato de 2 % y solución de CaCl_2 0.1 M. Parthiban et al. (2006), utilizando 3 % de alginato, aguja de 21 G y CaCl_2 0.5 M, obtuvieron cápsulas de 2.37 mm, mientras que Sancho (2019), con condiciones similares al presente estudio pero aguja de 21 G, registró un diámetro de 2.49 mm. Finalmente Azam et al. (2020), empleando aguja de 25 G, 2 % de alginato y CaCl_2 0.4 M, reportó cápsulas de 1.8 mm..

Los resultados obtenidos en el presente estudio, se obtuvieron cápsulas con un mayor diámetro en comparación con los resultados reportados por Azam et al. (2020), a pesar de emplear el mismo calibre de aguja, mientras que, en comparación con los demás autores, los resultados obtenidos son inferiores. Estas variaciones con respecto a diámetro de las capsulas se podrían atribuirse al uso de diferentes calibres de aguja, variación en la concentración alginato de sodio y concentración de gluconato de calcio utilizada en el proceso de encapsulación. Además de la velocidad de flujo durante la extrusión, la distancia de caída de las gotas hacia la solución de cloruro de calcio, el tiempo de permanencia de las cápsulas en los agentes gelificante (cloruro o gluconato de calcio) y la velocidad de agitación del agente gelificante durante el proceso de formación de la cápsulas (Rosas-Ledesma et al., 2012).

A partir de la semana 1 hasta la semana 3, el diámetro y el peso de las cápsulas permanecieron prácticamente constantes con valores promedio de 0.87-0.86 mm y 0.0004 g respectivamente, lo que se evidencia una estabilización estructural de las cápsulas tras la pérdida inicial de agua.

El contenido de humedad de las cápsulas obtenidas con una concentración de alginato al 2 % en el presente estudio fue de 94.5% , resultado que se asemeja a los reportes hechos por Sancho (2019), quien registro una humedad de 94.92% utilizando una concentración de alginato similar, sin embargo, utilizó una aguja de 21G para el proceso de encapsulación. No se encontró referencias que describan el comportamiento del peso de las cápsulas luego de la deshidratación con el cual se pueda realizar una comparación directa con los resultados obtenidas en este estudio.

3.3. Supervivencia de *Lactobacillus delbrueckii* encapsulados en alginato de sodio al 2% a 0, 1, 2, 3 semanas.

Tabla 3

Eficiencia del proceso de encapsulación por método de extrusión

Repetición	Antes de encapsulación (Log UFC/g)	Después de encapsulación (Log UFC/g)	Eficiencia de encapsulación (EE %)
R1	8.01	6.31	78.85
R2	8.11	6.37	78.58
R3	8.05	6.35	78.86
R4	8.27	6.65	80.46
R5	8.28	6.68	80.71
Media ± DE	8.14 ± 0.12	6.47 ± 0.18	79.49 ± 1.01

Nota: Cada repetición representa la media de cultivos realizados por duplicado.

Los resultados de la tabla 3 muestra que la concentración bacteriana antes de la encapsulación fue de una media de 8.14 ± 0.12 Log UFC/g, mientras que después de la encapsulación disminuyó a una media de 6.47 ± 0.18 Log UFC/g. Asimismo, la eficiencia de encapsulación obtenida fue de una media de $79.49 \% \pm 1.01$, lo que indica que, durante el presente trabajo de investigación, la encapsulación de la *Lactobacillus delbrueckii* permitió retener cerca del 80 % de las bacterias viables iniciales mediante el método de extrusión.

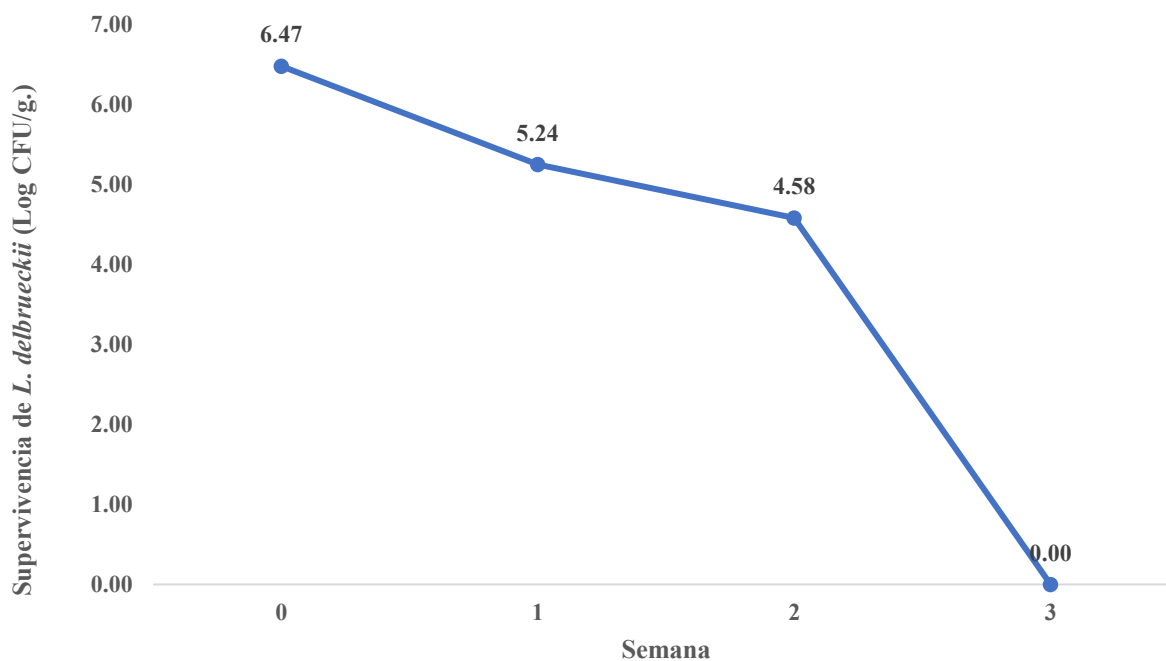
Los resultados obtenidos en el presente estudio se asemejan a los reportes realizados por Défas & Moreira (2017), reportaron una eficiencia de $76 \% \pm 0.69$ utilizando 2 % de alginato y aguja de 22 G. Sancho (2019), con 2 % de alginato y aguja de 21 G, obtuvo una EE de 89.8 %, mientras que, Azam et al. (2020), reportaron una eficiencia de $84 \% \pm 1$. Estas comparaciones sugieren que la eficiencia obtenida, se encuentran dentro de los valores reportados por estudios similares, a pesar de haberse utilizado una aguja de menor calibre durante el proceso de encapsulación en el presente trabajo de investigación.

Además, Sancho (2019), al evaluar la eficiencia de encapsulación con diferente concentración de alginato de sodio, reportó una eficiencia a 100 % con una contracción de 6%. Este resultado podría ser atribuirse a que a mayor concentración de alginato generan cápsulas con menor porosidad, permitiendo obtener mayor concentración bacterias viables dentro de las capsulas, además evitaría que las bacterias probióticas se dispersen hacia el medio externo

durante el proceso de reticulación, es decir, cuando el alginato se solidifique o se forme las cápsulas al entrar en contacto con la solución de gluconato de calcio.

Figura 3

*Supervivencia de *Lactobacillus delbrueckii* encapsulados durante 0, 1, 2, 3 semanas*



Nota: Los valores representan la media de cinco repeticiones de supervivencia de *Lactobacillus delbrueckii* en Log UFC/g, durante 3 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente.

En la semana 0, la supervivencia de *Lactobacillus delbrueckii* luego de proceso de encapsulación fue de una media de 6.47 Log UFC/g. A la semana 1, disminuyó a 5.24 Log UFC/g, para la semana 2, la supervivencia disminuyó a 4.58 Log UFC/g. Finalmente, en la semana 3, no se evidenció bacterias de *Lactobacillus delbrueckii* viables 0.00 Log UFC/g.

Los resultados obtenidos demuestran que, durante las dos primeras semanas, las bacterias permanecieron viables dentro de las cápsulas. Sin embargo, la concentración de alginato de sodio al 2 % como agente encapsulante, no resultó suficiente para mantener la viabilidad durante periodos prolongados de almacenamiento a temperatura ambiente. La caída abrupta en la semana 3, podría atribuirse a diversos factores, entre ellos la limitada o agotamiento de nutrientes dentro de la cápsula, deshidratación de las cápsulas, o la poca capacidad protectora del agente encapsulante frente a las condiciones ambientales.

La literatura indica que la supervivencia de probióticos encapsulados puede mejorar al aumentar la concentración de alginato y el diámetro de las cápsulas, reduciendo el tamaño y

número de poros y mejorando la retención de las bacterias (Lee & Heo, 2000). Esto sugiere que ajustar estos parámetros podría prolongar la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* en condiciones ambientales similares a las evaluadas en este estudio.

CONCLUSIONES

1. La concentración de alginato al 2 % permitió obtener cápsulas físicamente estables, con forma esférica y consistencia adecuada para el encapsulado de *Lactobacillus delbrueckii*.
2. La cantidad promedio de cápsulas obtenidas por mililitro de la mezcla de alginato y *Lactobacillus delbrueckii* fue de 80 cápsulas/mL, asegurando uniformidad en el proceso de encapsulación.
3. El método de encapsulación por extrusión presentó una eficiencia de $79.49 \% \pm 1.01$ en la retención de *Lactobacillus delbrueckii*, manteniendo su viabilidad durante las dos primeras semanas de almacenamiento, con disminución total a la semana 3.

RECOMENDACIONES

- Para futuros trabajos de investigación sobre encapsulación de bacterias probióticas, se recomienda estandarizar y controlar factores como el calibre de la aguja, la altura de caída de la gota, la presión durante la extrusión, la concentración de gluconato de calcio y la velocidad de agitación.
- Considerar sistemas de doble encapsulación mediante la incorporación de polisacáridos como quitosano o xantano, o lípidos como el glicerol, para reducir el estrés ambiental sobre las bacterias encapsuladas.
- Considerar la liofilización de las cápsulas como estrategia de conservación, y posteriormente evaluar la supervivencia bacteriana a condiciones ambientales.
- Evaluar la liberación de bacterias en condiciones gastrointestinales simuladas, a fin de determinar la funcionalidad y viabilidad del proceso antes de su aplicación en modelos animales.
- Realizar pruebas en modelos animales para evaluar colonización, tolerancia y efectos beneficiosos de las bacterias encapsuladas, asegurando la dosis mínima efectiva.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2001–2005.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18(5), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>
- Azam, M., Saeed, M., Pasha, I., & Shahid, M. (2020). A prebiotic-based biopolymeric encapsulation system for improved survival of *Lactobacillus rhamnosus* prebiotic based encapsulation of *L. rhamnosus* for improved survival. *Food Bioscience*.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100679>
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61, 160–174. <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Bernardeau, M., Guguen, M., & Vernoux, J. P. (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: Long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(1), 487–513.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x>
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*, 44(1), 26–46.
<https://doi.org/10.1007/s00535-008-2296-0>
- Brunelle, S., LaBudde, R., Nelson, M., & Wehling, P. (2012). Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. *AOAC INTERNATIONAL*, 1–46.
http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/AOAC_Vali_dation_Guidelines_for_Food_Microbiology-Prepub_version.pdf
- 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, 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>
- Camacho-Cruz, J., Castañeda-Gutierrez, L. D., Mongui-Gutierrez, D., Martin-Ramirez, A., Espinosa Orozco, A. M., Castillo Chiquiza, J. S., Valencia Huera, L., Cuesta Valencia, J. F., Avellaneda Martínez, J. S., Gutiérrez Burgos, C. A., Martin Ramírez, P. A., Rincón

- González, C. A., & Romero Bernal, P. S. (2022). Probiotics: a look into the mechanism of action and clinical applications in Pediatrics. *Salud Uninorte*, 38(3), 891–918. <https://doi.org/10.14482/sun.38.3.618.92>
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: The lactic acid bacteria as a test case. *Microbiology*, 149(12), 3507–3517. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26515-0>
- Collabo, M. C., Gueimonde, M., Hernández, M., Sanz, Y., & Salminen, S. (2005). Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection*, 68(12), 2672–2678. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.12.2672>
- Collado, M. C., Gueimonde, M., & Salminen, S. (2010). Probiotics and Fungal Colonization of Gastrointestinal Tract. In *Bioactive Foods in Promoting Health* (pp. 371–383). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374938-3.00024-4>
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo.” *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 147–156. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/37416/40417>
- D’Amelio, P., & Sassi, F. (2018). Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcified Tissue International*, 102(4), 415–425. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0331-y>
- De Araújo U., N., Gutiérrez Ramírez, L. A., Ruiz Villadiego, O. S., & Montoya Campuzano, O. I. (2015). Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: una revisión. *Revista Alimentos Hoy*, 23(36), 112–126.
- Défas, A., & Moreira, J. (2017). *Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de Lactobacillus plantarum en yogur sin sabor*. Trabajo para optar título de Ingenieron en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Díaz López, E. A., Isaza, J. Á., & Ángel B., D. (2017). Probióticos en la avicultura. *Revista de*

- Medicina Veterinaria*, 35, 177.
- Dodoo, C. C., Wang, J., Basit, A. W., Stapleton, P., & Gaisford, S. (2017). Targeted delivery of probiotics to enhance gastrointestinal stability and intestinal colonisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 530(1–2), 224–229.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.068>
- Dong, Q. Y., Chen, M. Y., Xin, Y., Qin, X. Y., Cheng, Z., Shi, L. E., & Tang, Z. X. (2013). Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(7), 1339–1351.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.12078>
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ont. Canada., 11.
- FAO/WHO. (2006). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO. Food and Nutrition Paper*, 1–56.
<https://doi.org/10.1097/JPN.0000000000000375>
- FAO. (2016). Probiotics in animal nutrition: Production, impact and regulation by Yadav S. Bajagai, Athol V. Klieve, Peter J. Dart and Wayne L. Bryden. In H. P. S. Makkar (Ed.), *Animal Production and Health Paper No. 179*.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1954.34.1.25>
- Farías, M., Jaramillo, C., Rambay, H., Rosales, I., & Santin, O. (2025). Potencial probiótico de *Lactobacillus delbrueckii* subsp . en la fermentación de alimentos lácteos : innovación y valor agregado en la producción agroalimentaria. *Revista CCentífica Internacional*, 12, 3560–3569.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50(2), S116–S119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>
- Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4(1), 149–163.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics4010149>
- Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 251–260.
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.005>
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., & Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: Characteristics and potential applications to fight against

- antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113(4), 723–736.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x>
- Jarvis, B. (2016). *Statistical aspects of the microbiological examination of foods* (3rd ed.). Academic Press is an imprint of Elsevier.
https://books.google.com/books/about/Statistical_Aspects_of_the_Microbiologic.html?hl=es&id=FQNKCCgAAQBAJ
- Juntunen, M., Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., & Isolauri, E. (2001). Adherence of Probiotic Bacteria to Human Intestinal Mucus in Healthy Infants and during Rotavirus Infection. *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY*, 8(2), 293–296. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.2.293>
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *Lwt*, 39, 1221–1227.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.013>
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13.
[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
- Krause, M., Keller, J., Beil, B., Driel, I. Van, Zustin, J., & Register, B. (2015). Calcium gluconate supplementation is effective to balance calcium homeostasis in patients with gastrectomy. *Springer*, 26, 987–995. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2965-1>
- Lee, K., & Heo, T. (2000). Survival of Bifidobacterium longum Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution Survival of Bifidobacterium longum Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. *Applied Environ. Microbiol*, 66(2), 869–873.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.869-873.2000.Updated>
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J. A., & Franco, D. (2018). Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: General aspects and overall description. In *Innovative technologies for food preservation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (M. Martín-Romo (ed.); 14th ed.).
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, 10(21), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>

- McFarland, L. V. (2015). From yaks to yogurt: The history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(Suppl 2), S85–S90.
<https://doi.org/10.1093/cid/civ054>
- Mirzamani, S. S., Bassiri, A. R., Tavakolipour, H., Azizi, M. H., & Kargozari, M. (2021). Survival of fluidized bed encapsulated *Lactobacillus acidophilus* under simulated gastrointestinal conditions and heat treatment during bread baking. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(6), 5477–5484. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01108-0>
- Molina, A. (2019). Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 601–611. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.34432>
- Pablo López, Y. L., Torres-Rosas, R., & Argueta-Figueroa, L. (2023). Probiotic action mechanisms in the inhibition of cariogenic microorganisms. *Revista Medica Clinica Las Condes*, 34(3), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2023.03.010>
- Pacheco Martínez, C. K., Saucedo Castañeda, G., Rodríguez Durán, L. V., & Pérez Chabela, M. de L. (2023). Características de microorganismos utilizados como probióticos tradicionales y nuevos probióticos. *Actualidades Biológicas*, 45(119), 1–12.
<https://doi.org/10.17533/udea.acbi/v45n119a05>
- Parthiban, M., Allan-Wojtas, P., & Holley, R. A. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in Different Types of Microcapsules. *Food Microbiology and Safety*, 71(1), 20–24.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb12395.x>
- Pasqualim, P., Culpi, T. A., Kaminski, G. A., Fin, M. T., Sasso, D. G. B., Costa, C. K., Miguel, M. D., Fujiwara, G. M., Rodrigues, B. H., & Zanin, S. M. W. (2010). *Microcápsulas de alginato de cálcio e óleo vegetal pela técnica de gelificação iônica: um estudo da capacidade de encapsulamento e aplicação dermatológica*. 11(1), 23–37.
- 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*, 47(1), 14–25.
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 10, S49–S66.
<https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>
- Pranteda, M. L. (2011). *Microorganismos Probióticos Encapsulados en Polímeros Microbianos: Evaluación De La Capacidad Protectora De La Encapsulación Para Su Administración Oral* [Trabajo de investigación para optar el grado de Doctor, Facultad

- de Farmacia, Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Granada, España.]. <http://hera.ugr.es/tesisugr/19121507.pdf>
- Ramírez-Baca, P., García-Cansino, B., Moreno-Hernández, E., Ríos-Carmona, J. M., odríguez- Cisneros, C., Vázquez-Arroyo, J., Rodríguez-Martínez, R., Esparza-González, S., & Nevárez-Morrillón, G. V. (2009). Morfología y diferenciación de Colonias de Tres Tipos de Bacterias Lácticas. *Revista Agraria - Nueva Epoca*, 6(1), 14–18.
- Ramírez, L. A., Montoya, O. I., & Zea, J. M. (2013). Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. *Producción + Limpia*, 8(1), 135–146.
- Ramírez S, J. A., Parra V., J. A., & Alvarez Aldana, A. (2017). Recuento en placa y aplicacion en la Cámara de Neubauer en Microorganismos. *Mente Joven*, 6, 01–08.
- Rappaccioli Salinas, R., Zeror Loaiciga, V., & Herrera Jaramillo, S. (2021). Probióticos : desafíos , revisión y alcance. *Médica Sinergia*, 6(6), e686.
- 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*, 137, 109682. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>
- Rodrigues, F. J., Omura, M. H., Cedran, M. F., Dekker, R. F. H., Barbosa Dekker, A. M., & Garcia, S. (2017). Effect of natural polymers on the survival of *Lactobacillus casei* encapsulated in alginate microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 34(5), 431–439. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1343872>
- Rosas-Ledesma, P., León-Rubio, J. M., Alarcón, F. J., Moriño, M. A., & Balebona, M. C. (2012). Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: Assessment of optimal conditions for encapsulation. *Aquaculture Research*, 43(1), 106–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02809.x>
- Sánchez, L., & Tromps, J. (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Revista de Salud Animal*, 36(2), 124–129.
- Sancho, J. (2019). *Evaluacion de la supervivencia de Lactobacillus acidophilus encapsulado con diferentes concentraciones de alginato*. Trabajo para Obtención Grado en Ciencia y tecnología de los Alimentos, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández De Elche, Valenciana, España.
- Sanders, M. E. (2008). Probiotics: Definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46(SUPPL. 2), S58-61. <https://doi.org/10.1086/523341>

- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Sartor, R. B. (2006). Mechanisms of disease: Pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, 3(7), 390–407. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0528>
- Sun, Q., Yin, S., He, Y., & Cao, Y. (2023). Biomaterials and Encapsulation Techniques for Probiotics: Current Status and Future Prospects in Biomedical Applications. *Nanomaterials (Basel)*, 13(15), 2185. <https://doi.org/10.3390/nano13152185>
- Teixeira, P. C. (1999). *Lactobacillus bulgaris* (pp. 1137–1444). Escola Superior Biotecnología, Porto.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Turner, J., Gittoes, N., Selby, P., & Committee, the S. for E. C. (2019). Emergency management of acute hypocalcaemia in adult patients. *Endocrine Connections*, 8(8), 1.
- Vera Peña, M. Y., Cortés Rodríguez, M., & Valencia García, F. E. (2019). Secado por atomización de bacterias ácido lácticas: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 15(29), 179–213. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.15.29.7>
- Yan, F., & Polk, D. B. (2011). Probiotics and immune health. *Current Opinion in Gastroenterology*, 27(6), 496–501. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834baa4d>
- Yeung, T. W., Arroyo-Maya, I. J., McClements, D. J., & Sela, D. A. (2016). Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: Enhancing: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LM0230 viability using calcium alginate beads. *Food and Function*, 1–8. <https://doi.org/10.1039/c5fo00801h>

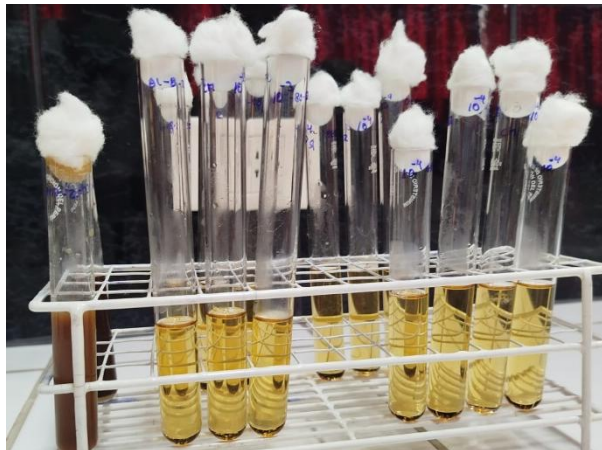
ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medios de cultivo y diluciones seriadas

A



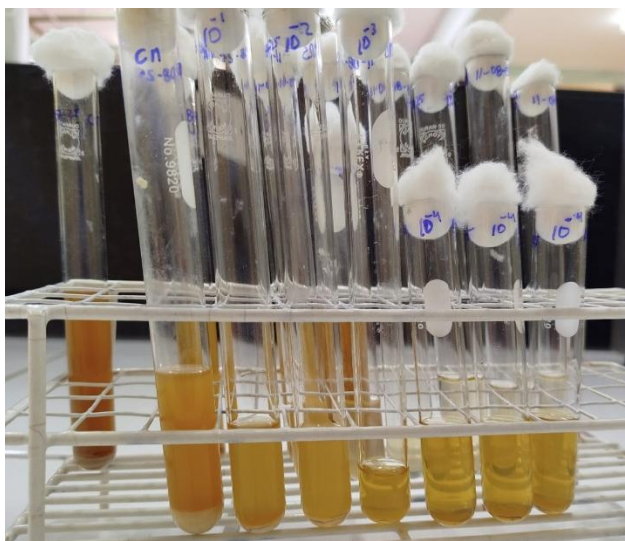
B



Nota: Foto A, se preparacion de caldo y agar MRS. Foto B se parecia las dilusiones seriadas a partir de la solucion madre.

Anexo 2. Crecimiento bacteriano

A

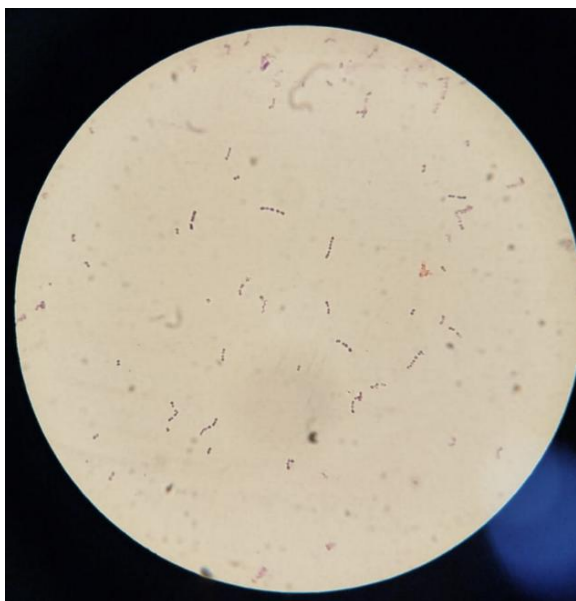


B



Nota: la foto A se aprecia un cambio de color de caldo MRS amarillo ámbar, La foto B se puede apreciar presencia de sedimentación el cual es indicativo a crecimiento de bacterias de *Lactobacillus delbrueckii* luego de 72 horas de incubación.

Anexo 3. Tinción de Gram



Nota: En la foto se puede apreciar bacilos en cadenas cortas, teñidas de color violeta, propio de una bacteria Gram positiva, concordando con las características microscópica del *Lactobacillus delbrueckii*.

Anexo 4. Caracterización macroscópica de colonias de *Lactobacillus delbrueckii*



Nota: Se aprecian colonias de formas circulares, tamaño de pequeñas a medianas, elevación convexa, consistencia cremosa, de superficie lisa con bordes regulares.

Anexo 5. Proceso de encapsulación de *Lactobacillus delbrueckii*

A

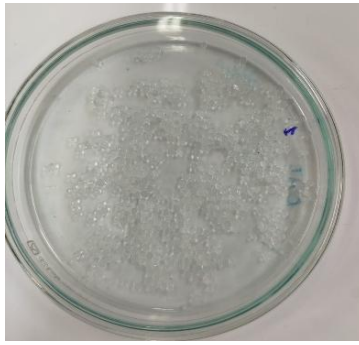


B



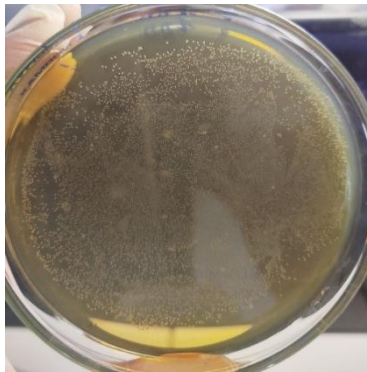
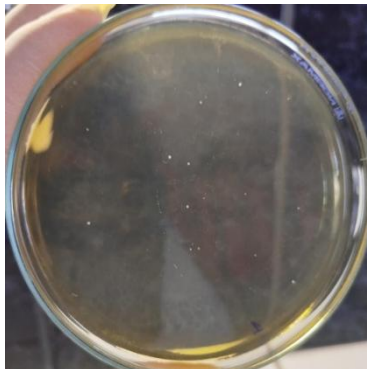
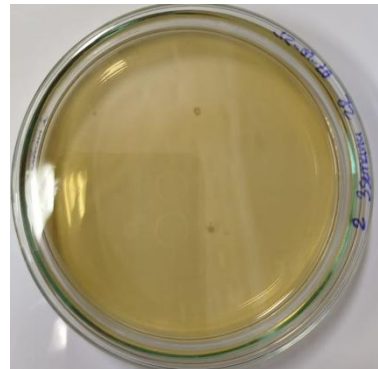
C



D**E**

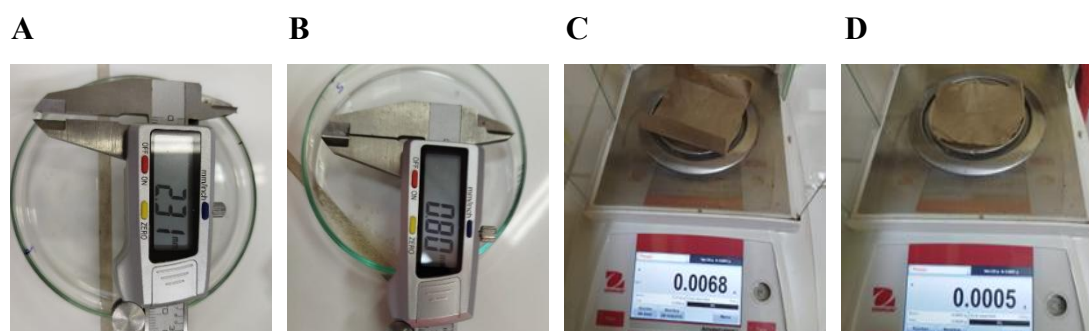
Nota: la foto A, se observa la mezcla de alginato de sodio 2% y agua destilada. Foto B, agregación del cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* (10^{-4}). Foto C y D muestran la extrusión de la mezcla, previamente cargada a una jeringa. Foto E, cápsulas obtenidas tras el proceso de extrusión.

Anexo 6. Evaluación de supervivencia de *Lactobacillus delbrueckii* encapsuladas

A**B****C****D****E****F**

Nota: Foto A, siembra por duplicado en cada repetición. Foto B, colonias de la dilución 10^{-4} antes del proceso encapsulación. Foto C, colonias semana 0 después de la encapsulación. Foto D, colonias semana 1. Foto E, colonia semana 2. Foto F, colonia semana 3.

Anexo 7. Evaluación de peso y diámetro de las cápsulas



Nota: Foto A, diámetro de la cápsula recién elaborada. Foto B, diámetro de cápsula a partir de semana 1. Foto C, peso de cápsula recién elaborada. Foto D, peso de cápsula a partir de la semana 1.

Anexo 8. Recuento de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* (UFC/g) antes y después del proceso de encapsulación

Repeticiones	Antes de encapsulado (UFC/g)	Después de encapsulado por semana (UFC/g)			
		0	1	2	3
R1	1.02E+08	2.06E+06	1.66E+05	3.65E+04	0.00
R2	1.28E+08	2.34E+06	1.38E+05	3.51E+04	0.00
R3	1.13E+08	2.24E+06	1.32E+05	3.65E+04	0.00
R4	1.86E+08	4.51E+06	2.35E+05	3.65E+04	0.00
R5	1.89E+08	4.79E+06	2.34E+05	4.59E+04	0.00

Nota: Los datos valores presentados se encuentran en UFC/g, antes y después de la encapsulación.

Anexo 9. Recuento de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* (Log UFC/g) antes y después del proceso de encapsulación.

Repeticiones	Log UFC/g antes de encapsulado	Log UFC/g Luego de encapsulado por semana			
		0	1	2	3
R1	8.01	6.31	5.22	4.56	0.00
R2	8.11	6.37	5.14	4.55	0.00
R3	8.05	6.35	5.12	4.56	0.00
R4	8.27	6.65	5.37	4.56	0.00

R5	8.28	6.68	5.37	4.66	0.00
Media $\pm$ DE	8.14 $\pm$ 0.12	6.47 $\pm$ 0.18	5.24 $\pm$ 0.12	4.58 $\pm$ 0.05	0.00 $\pm$ 0.00

Nota: los datos están representados en Log UFC/g usando la fórmula $\log_{10}(\text{UFC}+1)$ (Jarvis, 2016).

Anexo 10. Datos de diámetro y peso de las cápsulas

Semana	R1		R2		R3		R4		R5	
	Diámetro (mm)	Peso (g)	Diámetro (mm)	Peso (g)	Diámetro (mm)	Peso (g)	Diámetro (mm)	Peso (g)	Diámetro (mm)	Peso (g)
0	2.26	0.0066	2.15	0.0066	2.03	0.0067	2.24	0.0067	2.25	0.0066
1	0.93	0.0004	0.87	0.0004	0.93	0.0004	0.82	0.0004	0.81	0.0004
2	0.92	0.0004	0.85	0.0004	0.90	0.0004	0.82	0.0004	0.80	0.0004
3	0.91	0.0004	0.85	0.0004	0.91	0.0004	0.82	0.0004	0.79	0.0004

Nota: los valores mostrados son resultados de una media de 10 cápsulas evaluadas en diámetro y peso en cada repetición.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. JUAN CARLOS BARZOLA RAMOS
R.D. N° 252-2026-UNSCH-FCA-D

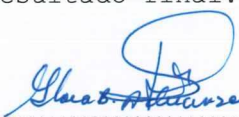
En la ciudad de Ayacucho, a los veintidós días del mes de junio del año dos mil veintiséis, siendo las dieciséis horas, se reunieron en el auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias, bajo la presidencia del Dr. Felipe Escobar Ramírez Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias; los miembros del jurado conformado por el Mtra. Gloria Betti Adrianzen Facundo, Mtra. Sulma Soledad Hinostroza Palomino como asesora y el Mg. Wilber Samuel Quijano Pacheco; actuando como secretario de actas el Mtro. Rodolfo Alca Mendoza, para recibir la sustentación de la Tesis titulado: **Efecto del encapsulado de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) en alginato de sodio sobre la supervivencia en condiciones ambientales Ayacucho 2025**, para obtener el Título Profesional de Médico Veterinario, presentado por el Bachiller **JUAN CARLOS BARZOLA RAMOS**.

El señor Decano previa verificación de los documentos exigidos solicitó se proceda con la sustentación y posterior defensa de la tesis en un periodo de cuarenta y cinco minutos de acuerdo al reglamento de grados y títulos vigente. Terminado la exposición, los miembros del Jurado, formularon sus preguntas, aclaraciones y/o observaciones correspondientes. Luego se invitó a los miembros del jurado pasar a otra aula para la deliberación y calificación del trabajo de tesis, teniendo el siguiente resultado:

Jurado evaluador	Exposición	Respuestas a las preguntas	Generación de conocimiento	Promedio
Mtra. Gloria Betti Adrianzen Facundo	15	14	16	15
Mtra. Sulma Soledad Hinostroza Palomino	17	17	18	17
Mg. Wilber Samuel Quijano Pacheco	16	16	16	16
PROMEDIO GENERAL				16

OBSERVACION: Por acuerdo unánime de los miembros del jurado, el título del trabajo de investigación debe ser: **Microencapsulado de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) en alginato de sodio sobre la supervivencia en condiciones ambientales Ayacucho 2025**

Acto seguido se invita a la sustentante y público en general para dar a conocer el resultado final. Firman el acta.


.....
Mtra. Gloria Betti Adrianzen Facundo
Presidente


.....
Mtra. Sulma Soledad Hinostroza Palomino
Asesora


.....
Mg. Wilber Samuel Quijano Pacheco
Jurado


.....
Mtro. Rodolfo Alca Mendoza
Secretario Docente



UNSCH

FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS

CONSTANCIA DE CONTROL DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

El que suscribe, miembro de la comisión de docentes instructores responsables de operativizar, verificar, garantizar y controlar la originalidad de los trabajos de **TESIS** de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, autorizado mediante RD N° 213-2025-UNSCH-FCA-D; hace constar que el trabajo titulado;

Microencapsulado de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) en alginato de sodio sobre la supervivencia en condiciones ambientales Ayacucho 2025

Autor : Juan Carlos Barzola Ramos
Asesor : Sulma Soledad Hinostroza Palomino

Ha sido sometido al control de originalidad mediante el software TURNITIN UNSCH, acorde al Reglamento de originalidad de trabajos de tesis, aprobando mediante de RCU 039-2021-UNSCH-CU, arrojando un resultado de once **(6%)** de índice de similitud, realizado con **depósito de trabajo estándar**.

En consecuencia, se otorga la presente Constancia de Originalidad para los fines pertinentes.

Nota: Se adjunta el resultado con identificador de la entrega: 2999143638

Ayacucho, 16 de julio de 2026

Mtro. Julio Alberto Ruiz Maquén
Docente AUTC

Microencapsulado de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) en alginato de sodio sobre la supervivencia en condiciones ambientales Ayacucho 2025

por Juan Carlos Barzola Ramos

Fecha de entrega: 16-jul-2026 11:12p. m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2999143638

Nombre del archivo: TESIS_BARZOLA_16-07-26.docx (4.56M)

Total de palabras: 13737

Total de caracteres: 79355

Microencapsulado de bacterias ácido lácticas (Lactobacillus delbrueckii) en alginato de sodio sobre la supervivencia en condiciones ambientales Ayacucho 2025

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%	6%	1%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net	2%
	Fuente de Internet	
2	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga	1%
	Trabajo del estudiante	
3	idoc.pub	1%
	Fuente de Internet	
4	cybertesis.unmsm.edu.pe	<1%
	Fuente de Internet	
5	Submitted to Universidad de Nebrija	<1%
	Trabajo del estudiante	
6	vdocuments.site	<1%
	Fuente de Internet	
7	www.researchgate.net	<1%
	Fuente de Internet	
8	repodigital.unrc.edu.ar	<1%
	Fuente de Internet	
9	Submitted to Universidad de Guadalajara - Posgrados	<1%
	Trabajo del estudiante	
10	repositorio.unsch.edu.pe	<1%
	Fuente de Internet	
11	1library.co	<1%
	Fuente de Internet	
12	www.scribd.com	<1%
	Fuente de Internet	

Microencapsulado de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) en alginato de sodio sobre la supervivencia en condiciones ambientales Ayacucho 2025.

Juan Carlos Barzola Ramos¹

juan.barzola.24@unsch.edu.pe

Sulma Soledad Hinostroza Palomino²

sulma.hinostroza@unsch.edu.pe

Área de investigación: Ciencias de la salud

Línea de investigación: Medicina y salud animal, salud pública y saneamiento ambiental.

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL), como *Lactobacillus delbrueckii*, son relevantes en sanidad y producción animal por su capacidad de modular la microbiota intestinal y mejorar su capacidad adsorptiva. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del encapsulado de *L. delbrueckii* en alginato de sodio sobre su supervivencia en condiciones ambientales. Se utilizó el método de extrusión con concentraciones de alginato al 1 %, 2 % y 3 %. Se evaluaron características físicas de las cápsulas (morfología, consistencia y humedad) para seleccionar la concentración óptima en una fase preliminar. La cantidad de cápsulas por mL, la eficiencia de encapsulación (EE %) y la supervivencia bacteriana se determinaron a 0, 1, 2 y 3 semanas. La viabilidad se evaluó mediante siembras en medio MRS, con recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/g) a las 72 h de incubación, considerando una dilución 10^{-4} y transformación $\log_{10}$ (UFC + 1) para análisis estadístico (Shapiro–Wilk, Jamovi v.2.3). El alginato al 2 % produjo cápsulas esféricas, firmes y uniformes, con menor deformación estructural, y una eficiencia de encapsulación de $79.49 \% \pm 1.01$. La viabilidad de *L. delbrueckii* se mantuvo hasta la segunda semana y disminuyó significativamente en la tercera, evidenciando la eficacia temporal del encapsulado y la influencia de la integridad física de las cápsulas en la protección bacteriana. Se concluye que la encapsulación en alginato de sodio al 2 % permite conservar la supervivencia de *L. delbrueckii* hasta por dos semanas en condiciones ambientales, siendo útiles para ser usado en suplementos probióticos para animales de producción y compañía.

Palabras clave: *Lactobacillus delbrueckii*, encapsulación, alginato de sodio, supervivencia, probiótico.

Microencapsulation of lactic acid bacteria (*Lactobacillus delbrueckii*) in sodium alginate for survival under environmental conditions, Ayacucho, 2025.

Juan Carlos Barzola Ramos¹

juan.barzola.24@unsch.edu.pe

Sulma Soledad Hinostroza Palomino²

sulma.hinostroza@unsch.edu.pe

Research Area: Health Sciences

Research Line: Medicine and animal health, public health and environmental sanitation.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB), such as *Lactobacillus delbrueckii*, are relevant in animal health and production due to their ability to modulate the intestinal microbiota and improve absorptive capacity. The aim of this study was to evaluate the effect of *L. delbrueckii* encapsulation in sodium alginate on its survival under environmental conditions. The extrusion method was used with alginate concentrations of 1%, 2%, and 3%. Physical characteristics of the capsules (morphology, consistency, and moisture content) were assessed to select the optimal concentration in a preliminary phase. The number of capsules per mL, encapsulation efficiency (EE%), and bacterial survival were determined at 0, 1, 2, and 3 weeks. Viability was evaluated by plating on MRS medium, with colony-forming unit (CFU/g) counts after 72 h of incubation, considering a 10^{-4} dilution and $\log_{10}(\text{CFU} + 1)$ transformation for statistical analysis (Shapiro–Wilk, Jamovi v.2.3). The 2% alginate produced spherical, firm, and uniform capsules with less structural deformation, and an encapsulation efficiency of $79.49\% \pm 1.01$. The viability of *L. delbrueckii* was maintained up to the second week and decreased significantly in the third week, demonstrating the temporary effectiveness of encapsulation and the influence of the physical integrity of the capsules in bacterial protection. It is concluded that encapsulation in 2% sodium alginate preserves the survival of *L. delbrueckii* for up to two weeks under environmental conditions, making it useful for probiotic supplements intended for production and companion animals..

Keywords: *Lactobacillus delbrueckii*, encapsulation, sodium alginate, survival, probiotic.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos grampositivos ampliamente distribuidos en ambientes naturales, alimentos fermentados y el tracto gastrointestinal de animales y humanos (Giraffa, 2004). Entre ellas, *Lactobacillus delbrueckii* se distingue por su capacidad para sintetizar metabolitos bioactivos, contribuir al equilibrio de la microbiota intestinal y favorecer procesos digestivos, impactando positivamente en la salud y el rendimiento productivo de animales de producción y compañía (FAO/WHO, 2002; Sanders et al., 2019). Estas características funcionales hacen que las BAL sean herramientas estratégicas en medicina veterinaria para mejorar la digestión, la estabilidad intestinal y el bienestar animal en distintos sistemas de producción.

A pesar de sus beneficios, la viabilidad de *L. delbrueckii* es altamente sensible a factores ambientales como temperatura, pH, actividad de agua y estrés oxidativo durante almacenamiento y procesamiento (Cook et al., 2012). La reducción significativa de unidades formadoras de colonia (UFC) compromete su función biológica, limitando su eficacia y los efectos esperados en el huésped animal (Kailasapathy, 2006; Tripathi & Giri, 2014). Por ello, se requiere implementar estrategias tecnológicas que protejan a las BAL frente a condiciones adversas y aseguren una mayor supervivencia hasta su administración.

La microencapsulación mediante matrices biopoliméricas, como el alginato de sodio, se presenta como una alternativa efectiva para preservar la viabilidad bacteriana (Anal & Singh, 2007). Esta técnica permite formar microcápsulas que actúan como barreras protectoras frente a agentes físicos y químicos adversos, facilitando la liberación controlada de las bacterias y mejorando su estabilidad durante el almacenamiento. Estudios previos han demostrado que la efectividad de la encapsulación depende de variables como la concentración de alginato, el método de encapsulación y las condiciones de almacenamiento (Krasaekoopt et al., 2003).

En el presente estudio se evaluó el efecto del encapsulado de *Lactobacillus delbrueckii* en alginato de sodio a concentraciones de 2 %, sobre la supervivencia bacteriana en condiciones ambientales propias de Ayacucho, la concentración de alginato al 2% fue seleccionada luego de una fase preliminar. Para la encapsulación se empleó el método de extrusión utilizando una solución de gluconato de calcio al 10 % y 2 M. Se evaluaron la morfología, consistencia y humedad de las cápsulas, así como la supervivencia de *L. delbrueckii* mediante siembra en

medio MRS y conteo de UFC/g a las semanas 0, 1, 2 y 3 de almacenamiento a temperatura ambiente. Los resultados preliminares mostraron que la viabilidad inicial fue de 6.47 Log UFC/g en la semana 0, disminuyendo a 5.24 Log UFC/g en la semana 1 y a 4.58 Log UFC/g en la semana 2, mientras que en la semana 3 no se observaron bacterias viables (0.00 Log UFC/g). Los datos de supervivencia fueron analizados para normalidad utilizando el software The jamovi project (2022), versión 2.3.

Esta investigación busca contribuir al desarrollo de tecnologías accesibles y efectivas que mejoren la estabilidad y funcionalidad de las BAL, facilitando su aplicación en la industria alimentaria animal local y regional.

Objetivo general

- Evaluar el efecto del encapsulado de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) en alginato de sodio sobre la supervivencia en condiciones ambientales.

Objetivos específicos

- Determinar la concentración de alginato de sodio para la encapsulación de bacterias ácido lácticos (*Lactobacillus delbrueckii*) en una concentración estándar sobre la supervivencia en el ambiente.
- Determinar la cantidad de cápsulas por mL obtenidas en una concentración estándar de bacterias ácidas lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) para determinar su calidad a 0, 1, 2, 3 semanas.
- Determinar la supervivencia en el ambiente a 0, 1, 2, 3 semanas de las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii*) en una concentración estándar, encapsuladas en alginato de sodio.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1. Ubicación

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología e Inmunología Veterinaria de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, ubicada en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga Departamento de Ayacucho, a una altura de 2790 m.s.n.m., con temperatura media de 17.5 °C y una humedad relativa media de 60% (SENAMHI, 2026).

2.2. Materiales

2.2.1. Material biológico

- Bacteria ácido láctica comercial (*Lactobacillus delbrueckii*)

2.2.2. Materiales

- | | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| - Vasos precipitados | - Tubos de ensayo 15 mL |
| - Placa Petri | - Gradillas |
| - Varilla | - Papel filtro |
| - Jeringas de 3, 5, 10 mL | - Papel toalla |
| - Aguja hipodérmica de 25 G | - Láminas portaobjetos |
| - Micropipeta de 100 -1000 uL | - Mortero y pilón |
| - Tips Azules 100-1000 uL | - Mechero |
| - Asa de digralsky | - Algodón |
| - Probetas 20 mL, 100 mL | - Pabilo |
| - Matraz Erlenmeyer 250 mL,
500 mL | - E.P.P. |

2.2.3. Equipos

- | | |
|-----------------------------|-------------------|
| - Incubadora de Laboratorio | - Autoclave |
| - Refrigeradora | - Vernier digital |
| - Agitador orbital | - Vórtex |
| - Balanza analítica | - Microscopio |

2.2.4. Insumos

- Gluconato de calcio al 10%
- Alginato de sodio
- Agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS)
- Caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS)
- Agua destilada

2.3. Procedimiento metodológico

El presente trabajo se dividió en cuatro etapas principales:

2.3.1. Determinación de la mejor concentración de alginato de sodio en porcentaje

Se llevó a cabo una etapa preliminar de encapsulación sin la inclusión de bacterias, con el propósito de determinar la concentración óptima de alginato de sodio que permita obtener cápsulas con la mayor estabilidad y calidad física a temperatura ambiente. Esta fase fue fundamental para asegurar que las cápsulas formadas presenten características adecuadas que favorezcan la viabilidad y protección de las bacterias ácido lácticas durante el tiempo y las condiciones ambientales evaluadas.

Preparación:

- El alginato de sodio fue mezclado en 20 mL de agua destilada a diferentes concentraciones de 1%, 2% y 3%.
- Cada mezcla en diferentes concentraciones de alginato de sodio fue homogenizada hasta eliminar los grumos.
- Posteriormente, se procedió a realizar la formación de las cápsulas mediante el método de extrusión, cada mezcla fue cargada en una jeringa de 3 mL y se dejó caer gota a gota mediante una aguja de 25 G, sobre la solución de gluconato de calcio al 0.2 M contenida en un vaso precipitado, mantenida en constante agitación con ayuda del agitador orbital a 250 rpm.
- Las cápsulas permanecieron en la solución de gluconato de calcio durante 30 minutos en constante agitación.
- Concluido ese tiempo, las cápsulas de alginato contenidas en el vaso precipitado fueron lavadas tres veces con agua destilada para eliminar los restos de la solución de gluconato de calcio a 0.2 M.
- Se tomaron las cápsulas al azar de cada una de las concentraciones a una placa Petri para su evaluación en forma y consistencia.

Finalmente, se optó utilizar la concentración de alginato de sodio al 2 % para el proceso de encapsulado de *Lactobacillus delbrueckii*, debido a que presentó una mejor forma y consistencia de las cápsulas en comparación con las concentraciones al 1% y 3 %.

2.3.2. Condiciones generales: activación y determinación de concentración de las BAL.

2.3.2.1. Activación y crecimiento de las bacterias

Se tomó 1 g del cultivo bacterias comercial de *Lactobacillus delbrueckii* y se inoculó en 10 ml de caldo MRS. La mezcla se incubó a 37 °C durante 72 horas, obteniéndose así la solución madre.

La activación y el crecimiento de las bacterias fueron evaluados mediante:

- Observación del cambio de color del medio líquido MRS, indicador de la producción de ácido láctico (de amarillo ámbar a marrón)
- Presencia de sedimentación, la cual sugirió un crecimiento significativo.
- Tinción de Gram confirmando que las bacterias eran Gram positivas, que es característica esperada de la cepa utilizada.

2.3.2.2. Determinación de la concentración de BAL

A partir de la solución madre se realizaron diluciones seriadas a hasta alcanzar una concentración de 10^{-4} , la cual se incubó a 37 °C durante 72 horas. Posteriormente, se tomaron 100 µL de la dilución y se sembraron por duplicado en agar MRS, usando el método de extensión con una asa de Digralsky. Las placas se incubaron 37 °C durante 72 horas.

Se realizó la caracterización macroscópica de las colonias de *Lactobacillus delbrueckii*, observándose en formas circulares, tamaño pequeñas a medianas, elevación convexa, color cremosa, consistencia pastosa, superficie lisa con bordes regulares., concordando por lo reportado por Ramírez-Baca et al.(2009).

Finalmente, se calculó la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo antes del encapsulado, contabilizando las colonias presentes en cada placa. Para el análisis, los recuentos bacterianos fueron transformados a escala logarítmica (Log UFC/g), siguiendo las recomendaciones de Jarvis (2016) y Brunelle et al. (2012), debido a que los datos de recuentos con múltiples diluciones no se ajustan a distribución normales ni de Poisson.

2.3.3. Encapsulación de las BAL

El proceso de encapsulación de *Lactobacillus delbrueckii* se realizó mediante el método de extrusión y llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos:

- La mezcla de alginato al 2% y *Lactobacillus delbrueckii* (10^{-4}) se preparó en una proporción de 4 :1 respectivamente, contenida en un vaso de precipitado se agitó hasta obtener una homogeneización completa.
- La solución de gluconato de calcio 0.2 M se preparó en vasos de precipitados. La mezcla de alginato con bacterias *Lactobacillus delbrueckii* (10^{-4}) se cargó en una jeringa con una aguja de calibre 25 G y se dejó caer gota a gota sobre la solución de calcio
- Durante este proceso se determinó la cantidad de cápsulas por mililitro (mL) de la mezcla mediante cinco conteos independiente.
- Las cápsulas permanecieron en la solución de gluconato de calcio durante 30 minutos en constante agitación con ayuda del agitador orbital a 250 rpm.
- Posteriormente, las cápsulas fueron recuperadas en papel filtro y lavadas tres veces con agua destilada y transferidos a una placa Petri para evaluar la supervivencia de las bacterias a la 0 semana, 1 semana, 2 semana y 3 semana a condiciones ambientales.

2.3.4. Evaluación de supervivencia de BAL encapsulados

Para determinar la viabilidad de las bacterias *Lactobacillus delbrueckii* encapsuladas:

- Se tomaron 100 cápsulas al azar y se trituraron en un mortero.
- Se añadieron 10 mL de caldo MRS y la mezcla fue homogenizada antes de transferirse un tubo de ensayo.
- Se sembraron 100 μ L de la muestra por duplicado, en agar MRS usando el método de extensión con ayuda asa de Digrafsky, (Yeung et al., 2016).
- Las placas fueron incubadas 37 °C durante 72 horas.
- Finalmente, se contabilizó el número de colonia y los datos se reportados como Log UFC/g.

El mismo procedimiento se aplicó a todas las repeticiones a la semana 0, 1, 2 y 3.

2.4. Análisis de datos

2.4.1. Unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g)

$$UFC/g = \frac{\text{Colonias enumeradas}}{\text{mL sembrados}} \times \text{Factor de dilución (Madigan et al., 2015)}.$$

Mediante la siguiente formula se determinó las UFC/g antes y después del proceso de encapsulado de las bacterias *Lactobacillus delbrueckii*, considerando la dilución 10^{-4} en cada una de las repeticiones.

2.4.2. Transformación a escala logarítmica

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\log_{10} (UFC + 1)$$

Se aplica cuando los datos incluyen ceros, donde “+ 1” es la corrección matemática. Todos los datos transformados se reportan como Log UFC/g (Jarvis, 2016).

2.4.3. Humedad (%)

Para determinar la humedad de las cápsulas se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{PH(g) - PS(g)}{PH(g)} \times 100$$

(Sancho, 2019), Donde:

- PH (g) = peso de cápsulas húmedas en gramo.
- PS (g) = peso de cápsulas secas en gramos.

2.4.4. Eficiencia de encapsulación (EE %)

Para determinar la EE %, se aplicó la fórmula:

$$EE \% = \frac{N}{N_0} \times 100$$

(Mirzamani et al., 2021), Donde:

- N = número de bacterias liberadas de la cápsula (Log UFC/g)
- N_0 = número de bacterias libres (Log UFC/g) añadidas a la solución de alginato

2.4.5. Análisis estadístico

La normalidad de los datos de supervivencia se evaluó mediante la prueba de Shapiro–Wilk. El análisis estadístico se realizó con el software The jamovi project (2022), versión 2.3. La desviación estándar de las medias se calculó utilizando Microsoft Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Concentración de alginato de sodio para la encapsulación de *Lactobacillus delbrueckii*.

Tabla 1

Evaluación física de las cápsulas según concentración de alginato a temperatura ambiente

Repeticición	Concentración de Alginato (%)	Condición de Almacenamiento	Estado de las Cápsulas (Forma y consistencia)
R1	1%	Ambiente (25°C)	Esférica, blanda
R2	1%	Ambiente (25°C)	Esférica, blanda
R3	1%	Ambiente (25°C)	Esférica, blanda
R1	2%	Ambiente (25°C)	Esférica, dura
R2	2%	Ambiente (25°C)	Esférica, dura
R3	2%	Ambiente (25°C)	Esférica, dura
R1	3%	Ambiente (25°C)	Pleomórfica, dura
R2	3%	Ambiente (25°C)	Pleomórfica, dura
R3	3%	Ambiente (25°C)	Pleomórfica, dura

Nota. Se muestra las características físicas evaluadas de las cápsulas. Se consideraron tres repeticiones para cada concentración de alginato.

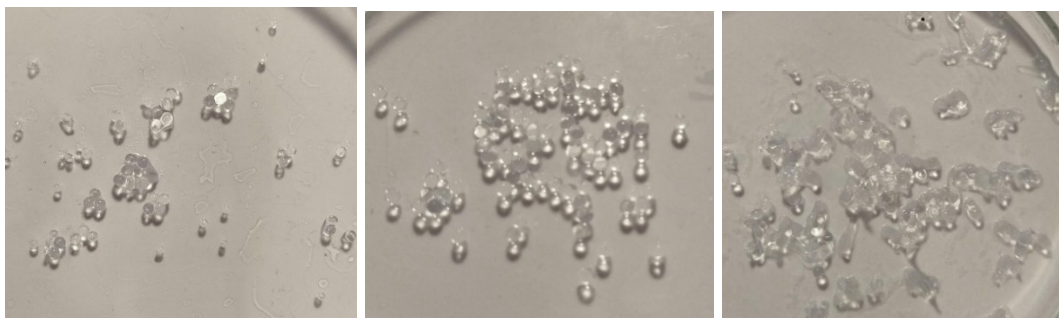
Los resultados de la fase preliminar muestran la influencia de la concentración de alginato de sodio (1 %, 2 % y 3 %) sobre la forma y consistencia de las cápsulas, con el objetivo de establecer un protocolo de encapsulación que garantice cápsulas esféricas y consistentes. Esta fase se realizó sin inclusión de *Lactobacillus delbrueckii*, bajo condiciones ambientales controladas (25 °C), utilizando una aguja de 25 G para la formación de las cápsulas.

Como se observa en la tabla 1, la concentración de alginato que produjo mejores características físicas fue la concentración de 2 %, con cápsulas esféricas y de consistencia dura. Por esta razón se seleccionó esta concentración para el encapsulado de *Lactobacillus delbrueckii* en el presente trabajo de investigación.

Figura 1

Cápsulas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato de sodio

A**B****C**



Nota. Se muestran las cápsulas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato de sodio. Las cápsulas presentan características físicas similares dentro de cada concentración, mientras que se observan variaciones al comparar las concentraciones de 1 %, 2 % y 3 %.

Los resultados obtenidos en las repeticiones de cada concentración de alginato, muestran las mismas características físicas, pero si se muestra variaciones al comparar las concentraciones de alginato de 1 %, 2% y 3% de alginato de sodio.

3.1.1. Concentración de alginato al 1 %

Las cápsulas presentaron forma esférica y consistencia blanda. La mezcla mostró baja viscosidad y alta fluidez, favoreciendo la formación de cápsulas blandas.

3.1.2. Concentración de alginato al 2 %

Las cápsulas conservaron la forma esférica y presentaron una consistencia más firme. La mezcla tuvo viscosidad y fluidez moderadas, lo que permitió obtener cápsulas uniformes.

3.1.3. Concentración de alginato al 3 %

Las cápsulas presentaron formas irregulares (pleomórficas, elípticas y en lágrima) y mayor dureza. La mezcla mostró alta viscosidad, baja fluidez y presencia de grumos, dificultando la homogeneización y la formación de cápsulas esféricas.

No se encontró referencia bibliográfica que describan específicamente las características físicas evaluadas en el presente estudio como la forma y consistencia de la capsula a diferentes concentraciones de alginato de sodio (1%, 2%, 3%), utilizando una aguja de 25G, con el cual se pueda discutir esta fase preliminar. Sin embargo, existen reportes que describen procedimientos similares utilizando calibre de aguja diferentes. Por ejemplo Lee & Heo (2000), utilizaron una aguja de 20 G y concentraciones de alginato de 2 al 4 %, obtuvieron cápsulas esféricas, sin embargo, al usar concentración por debajo de 2% , no lograron obtener cápsulas de forma esféricas. Parthiban et al.(2006), emplearon una aguja de 21 G y 3 % de alginato

mediante el método de encapsulación por extrusión, obtuvieron cápsulas esféricas y regulares. Rosas-Ledesma et al.(2012), al emplear una aguja de 16 G y concentraciones de alginato de 1% a 4%, reportaron que en las concentraciones de 3% y 4 % permitieron obtener cápsulas más esféricas a comparación a 2 %, asimismo, al observar las cápsulas al microscopio óptico determinaron que la concentración inferior a 2 % no producen cápsulas esféricas.

En el presente estudio la concentración de alginato de sodio al 2 % elaboradas con una aguja de 25 G, proporcionó una adecuada fluides y viscosidad permitiendo obtener cápsulas esféricas, en consecuencia, fue elegida para el encapsulado de *Lactobacillus delbrueckii*. A diferencia de los estudios mencionados, todos ellos obtuvieron cápsulas esféricas a concentraciones de alginato igual o superiores a 3%, esta diferencia podría atribuirse al uso de agujas de mayor calibre, lo que facilita el paso de la solución incluso cuando la viscosidad de la misma sea alta. Del mismo modo, en la concentración de alginato al 1% se obtuvieron cápsulas visualmente esféricas, resultado que no concuerda con lo reportado por Lee & Heo (2000) y Rosas-Ledesma et al. (2012).

3.2. Cantidad de cápsulas por mL y evaluación de diámetro y peso durante almacenamiento.

Tabla 2

Cantidad de cápsulas obtenidas por mL.

Repeticición	Cap./mL	Cap./mL	Cap./mL	Cap./mL	Cap./mL	Promedio
M1	78	82	83	79	78	80
M2	83	81	79	78	79	80
M3	79	83	77	81	80	80
M4	82	80	76	84	78	80
M5	85	77	79	81	78	80

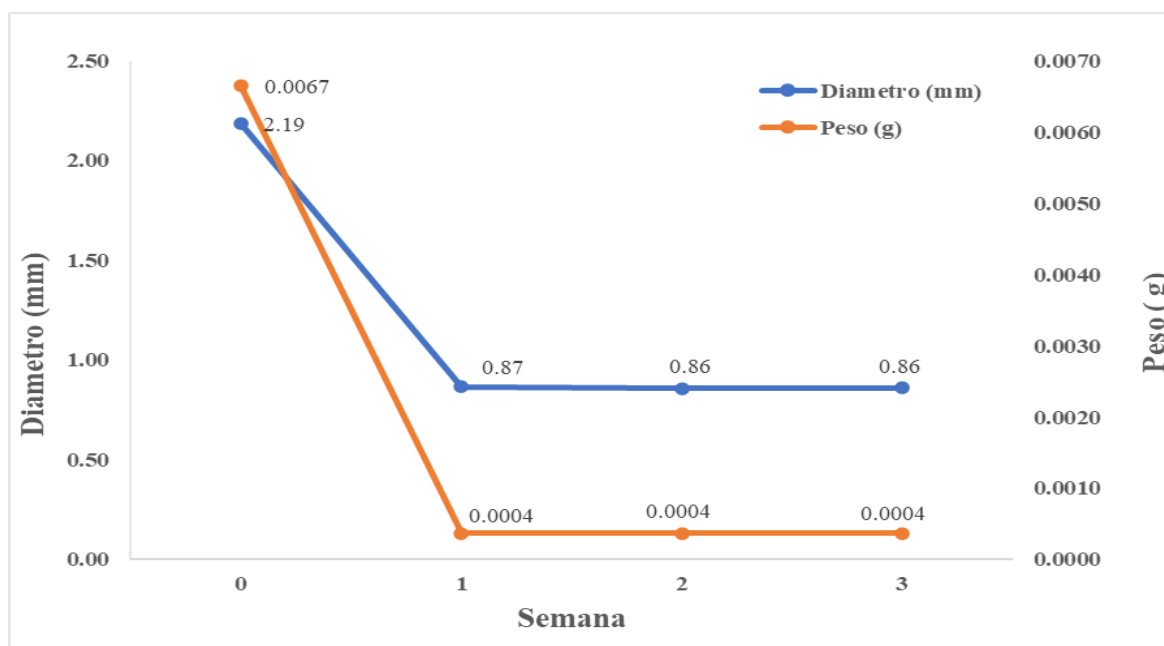
Nota: M1-M5 representan las repeticiones del proceso de encapsulación. Cap./mL. Indica la cantidad de cápsulas obtenidas por mililitro de mezcla de alginato y bacterias.

Los resultados de la tabla 2, muestran la cantidad de cápsulas por mL obtenidas a partir de la mezcla de alginato y *Lactobacillus delbrueckii*. Para cada repetición se realizaron cinco conteos independientes, extrayendo 1 mL de la mezcla mediante una jeringa y se utilizando una aguja de 25 G para la formación de las cápsulas. Se observan pequeñas variaciones entre conteos y repeticiones, probablemente debido a la diferencia en la presión ejercida sobre el embolo de la jeringa durante la extrusión. Sin embargo, la media de cápsulas por mL fue

consistente en todas las repeticiones, con un valor promedio de 80 cápsulas/mL. No se encontraron referencias bibliográficas que reporten la cantidad de cápsulas obtenidas por mL bajo condiciones similares, por lo que no fue posible realizar una comparación directa.

Figura 2

Evaluación del diámetro (mm) y peso (g) de las cápsulas durante el almacenamiento al ambiente.



Nota. La figura muestra los cambios en diámetro (mm) y peso (g) de las cápsulas durante las 3 semanas. Cada valor representa la media de las 5 repeticiones.

En la semana 0, las cápsulas recién obtenidas mediante el método de extrusión presentaron un diámetro promedio de 2.19 mm y peso promedio de 0.0067 g. Para la semana 1 se observa una disminución en ambas variables donde el diámetro se redujo hasta una media de 0.87 mm y peso media de 0.0004 g. Este cambio inicial se atribuye a la pérdida de agua contenida en las cápsulas recién formadas.

En comparación con la literatura, Lee & Heo (2000) reportaron cápsulas con diámetro promedio de 1.03 mm al emplear una aguja de 20 G, concentración de alginato de 2 % y solución de CaCl_2 0.1 M. Parthiban et al. (2006), utilizando 3 % de alginato, aguja de 21 G y CaCl_2 0.5 M, obtuvieron cápsulas de 2.37 mm, mientras que Sancho (2019), con condiciones similares al presente estudio pero aguja de 21 G, registró un diámetro de 2.49 mm. Finalmente

Azam et al. (2020), empleando aguja de 25 G, 2 % de alginato y CaCl₂ 0.4 M, reportó cápsulas de 1.8 mm..

Los resultados obtenidos en el presente estudio, se obtuvieron cápsulas con un mayor diámetro en comparación con los resultados reportados por Azam et al. (2020), a pesar de emplear el mismo calibre de aguja, mientras que, en comparación con los demás autores, los resultados obtenidos son inferiores. Estas variaciones con respecto a diámetro de las capsulas se podrían atribuirse al uso de diferentes calibres de aguja, variación en la concentración alginato de sodio y concentración de gluconato de calcio utilizada en el proceso de encapsulación. Además de la velocidad de flujo durante la extrusión, la distancia de caída de las gotas hacia la solución de cloruro de calcio, el tiempo de permanencia de las cápsulas en los agentes gelificante (cloruro o gluconato de calcio) y la velocidad de agitación del agente gelificante durante el proceso de formación de la cápsulas (Rosas-Ledesma et al., 2012).

A partir de la semana 1 hasta la semana 3, el diámetro y el peso de las cápsulas permanecieron prácticamente constantes con valores promedio de 0.87-0.86 mm y 0.0004 g respectivamente, lo que se evidencia una estabilización estructural de las cápsulas tras la pérdida inicial de agua.

El contenido de humedad de las cápsulas obtenidas con una concentración de alginato al 2 % en el presente estudio fue de 94.5% , resultado que se asemeja a los reportes hechos por Sancho (2019), quien registro una humedad de 94.92% utilizando una concentración de alginato similar, sin embargo, utilizó una aguja de 21G para el proceso de encapsulación. No se encontró referencias que describan el comportamiento del peso de las cápsulas luego de la deshidratación con el cual se pueda realizar una comparación directa con los resultados obtenidas en este estudio.

3.3. Supervivencia de *Lactobacillus delbrueckii* encapsulados en alginato de sodio al 2% a 0, 1, 2, 3 semanas.

Tabla 3

Eficiencia del proceso de encapsulación por método de extrusión

Repetición	Antes de encapsulación (Log UFC/g)	Después de encapsulación (Log UFC/g)	Eficiencia de encapsulación (EE %)
R1	8.01	6.31	78.85
R2	8.11	6.37	78.58

R3	8.05	6.35	78.86
R4	8.27	6.65	80.46
R5	8.28	6.68	80.71
Media $\pm$ DE	8.14 $\pm$ 0.12	6.47 $\pm$ 0.18	79.49 $\pm$ 1.01

Nota: Cada repetición representa la media de cultivos realizados por duplicado.

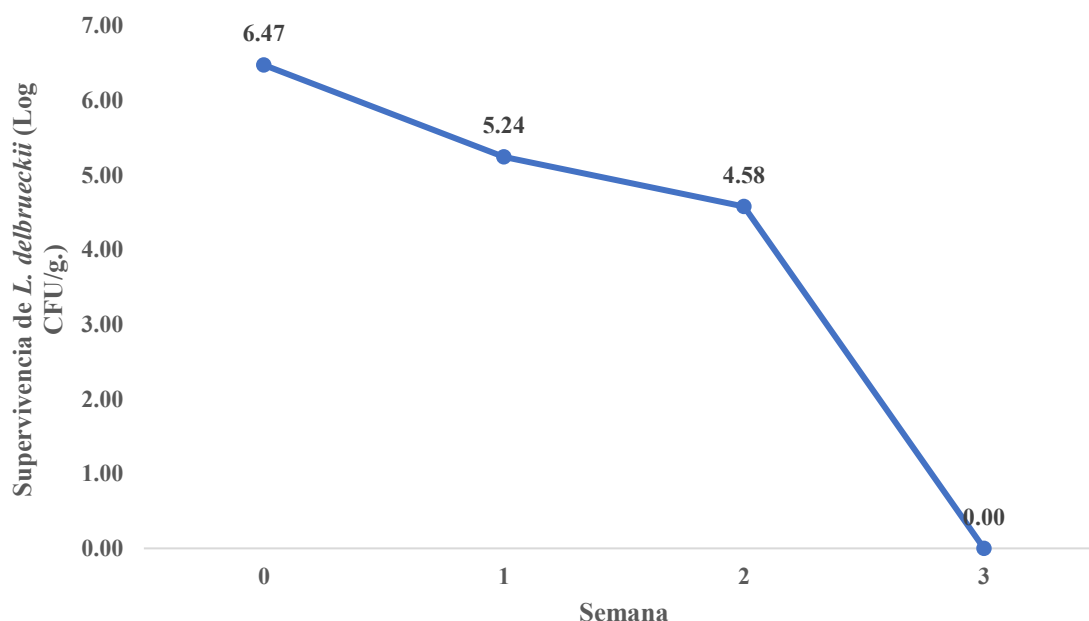
Los resultados de la tabla 3 muestra que la concentración bacteriana antes de la encapsulación fue de una media de 8.14 ± 0.12 Log UFC/g, mientras que después de la encapsulación disminuyó a una media de 6.47 ± 0.18 Log UFC/g. Asimismo, la eficiencia de encapsulación obtenida fue de una media de $79.49 \% \pm 1.01$, lo que indica que, durante el presente trabajo de investigación, la encapsulación de la *Lactobacillus delbrueckii* permitió retener cerca del 80 % de las bacterias viables iniciales mediante el método de extrusión.

Los resultados obtenidos en el presente estudio se asemejan a los repostes realizados por Défas & Moreira (2017), reportaron una eficiencia de $76 \% \pm 0.69$ utilizando 2 % de alginato y aguja de 22 G. Sancho (2019), con 2 % de alginato y aguja de 21 G, obtuvo una EE de 89.8 %, mientras que, Azam et al. (2020), reportaron una eficiencia de $84 \% \pm 1$. Estas comparaciones sugieren que la eficiencia obtenida, se encuentran dentro de los valores reportados por estudios similares, a pesar de haberse utilizado una aguja de menor calibre durante el proceso de encapsulación en el presente trabajo de investigación.

Además, Sancho (2019), al evaluar la eficiencia de encapsulación con diferente concentración de alginato de sodio, reportó una eficiencia a 100 % con una contracción de 6%. Este resultado podría ser atribuirse a que a mayor concentración de alginato generan cápsulas con menor porosidad, permitiendo obtener mayor concentración bacterias viables dentro de las capsulas, además evitaría que las bacterias probióticas se dispersen hacia el medio externo durante el proceso de reticulación, es decir, cuando el alginato se solidifique o se forme las cápsulas al entrar en contacto con la solución de gluconato de calcio.

Figura 3

Supervivencia de Lactobacillus delbrueckii encapsulados durante 0, 1, 2, 3 semanas



Nota: Los valores representan la media de cinco repeticiones de supervivencia de *Lactobacillus delbrueckii* en Log UFC/g, durante 3 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente.

En la semana 0, la supervivencia de *Lactobacillus delbrueckii* luego de proceso de encapsulación fue de una media de 6.47 Log UFC/g. A la semana 1, disminuyó a 5.24 Log UFC/g, para la semana 2, la supervivencia disminuyó a 4.58 Log UFC/g. Finalmente, en la semana 3, no se evidenció bacterias de *Lactobacillus delbrueckii* viables 0.00 Log UFC/g.

Los resultados obtenidos demuestran que, durante las dos primeras semanas, las bacterias permanecieron viables dentro de las cápsulas. Sin embargo, la concentración de alginato de sodio al 2 % como agente encapsulante, no resultó suficiente para mantener la viabilidad durante periodos prolongados de almacenamiento a temperatura ambiente. La caída abrupta en la semana 3, podría atribuirse a diversos factores, entre ellos la limitada o agotamiento de nutrientes dentro de la cápsula, deshidratación de las cápsulas, o la poca capacidad protectora del agente encapsulante frente a las condiciones ambientales.

La literatura indica que la supervivencia de probióticos encapsulados puede mejorar al aumentar la concentración de alginato y el diámetro de las cápsulas, reduciendo el tamaño y número de poros y mejorando la retención de las bacterias (Lee & Heo, 2000). Esto sugiere que ajustar estos parámetros podría prolongar la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* en condiciones ambientales similares a las evaluadas en este estudio.

CONCLUSIONES

1. La concentración de alginato al 2 % permitió obtener cápsulas físicamente estables, con forma esférica y consistencia adecuada para el encapsulado de *Lactobacillus delbrueckii*.
2. La cantidad promedio de cápsulas obtenidas por mililitro de la mezcla de alginato y *Lactobacillus delbrueckii* fue de 80 cápsulas/mL, asegurando uniformidad en el proceso de encapsulación.
3. El método de encapsulación por extrusión presentó una eficiencia de $79.49 \% \pm 1.01$ en la retención de *Lactobacillus delbrueckii*, manteniendo su viabilidad durante las dos primeras semanas de almacenamiento, con disminución total a la semana 3.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18(5), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>
- Azam, M., Saeed, M., Pasha, I., & Shahid, M. (2020). A prebiotic-based biopolymeric encapsulation system for improved survival of *Lactobacillus rhamnosus* prebiotic based encapsulation of *L. rhamnosus* for improved survival. *Food Bioscience*. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100679>
- Brunelle, S., LaBudde, R., Nelson, M., & Wehling, P. (2012). Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. *AOAC INTERNATIONAL*, 1–46. http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/AOAC_Vali_dation_Guidelines_for_Food_Microbiology-Prepub_version.pdf
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>
- Défas, A., & Moreira, J. (2017). *Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de Lactobacillus plantarum en yogur sin sabor*. Trabajo para optar título de Ingenieron en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in*

Food. London, Ont. Canada., 11.

Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 251–260.

<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.005>

Jarvis, B. (2016). *Statistical aspects of the microbiological examination of foods* (3rd ed.). Academic Press is an imprint of Elsevier.

https://books.google.com/books/about/Statistical_Aspects_of_the_Microbiologic.html?hl=es&id=FQNKCGAAQBAJ

Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *Lwt*, 39, 1221–1227.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.013>

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13.

[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)

Lee, K., & Heo, T. (2000). Survival of Bifidobacterium longum Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution Survival of Bifidobacterium longum Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. *Applied Environ. Microbiol*, 66(2), 869–873.

<https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.869-873.2000.Updated>

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (M. Martín-Romo (ed.); 14th ed.).

Mirzamani, S. S., Bassiri, A. R., Tavakolipour, H., Azizi, M. H., & Kargozari, M. (2021). Survival of fluidized bed encapsulated Lactobacillus acidophilus under simulated gastrointestinal conditions and heat treatment during bread baking. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(6), 5477–5484. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01108-0>

Parthiban, M., Allan-Wojtas, P., & Holley., R. A. (2006). Stability of Lactobacillus reuteri in Different Types of Microcapsules. *Food Microbiology and Safety*, 71(1), 20–24.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb12395.x>

Ramírez-Baca, P., García-Cansino, B., Moreno-Hernández, E., Ríos-Carmona, J. M., odríguez- Cisneros, C., Vásquez-ArroyO, J., Rodríguez-Martínez, R., Esparza-González, S., & Nevárez-Morrillón, G. V. (2009). Morfología y diferenciación de Colonias de Tres Tipos de Bacterias Lácticas. *Revista Agraria - Nueva Epoca*, 6(1), 14–18.

- Rosas-Ledesma, P., León-Rubio, J. M., Alarcón, F. J., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2012). Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: Assessment of optimal conditions for encapsulation. *Aquaculture Research*, 43(1), 106–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02809.x>
- Sancho, J. (2019). *Evaluación de la supervivencia de Lactobacillus acidophilus encapsulado con diferentes concentraciones de alginato*. Trabajo para Obtención Grado en Ciencia y tecnología de los Alimentos, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández De Elche, Valenciana, España.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Yeung, T. W., Arroyo-Maya, I. J., McClements, D. J., & Sela, D. A. (2016). Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: Enhancing: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LM0230 viability using calcium alginate beads. *Food and Function*, 1–8. <https://doi.org/10.1039/c5fo00801h>