



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA
AVANZADA UNIDAD LEGARIA**

**CARACTERIZACIÓN DE BIOPOLÍMEROS Y SU APLICACIÓN EN
LA MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS DE LIBERACIÓN
ESPECÍFICA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
***DOCTOR EN TECNOLOGÍA AVANZADA CON ESPECIALIDAD EN
ALIMENTOS***

PRESENTA:
M. EN C. NORMA LOURDES ESPINOZA HERRERA

DIRECTORES DE TESIS:

DR. EDUARDO SAN MARTIN MARTINEZ

DRA. RUTH PEDROZA ISLAS

México D.F. noviembre de 2008



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 13:00 horas del día 26 del mes de noviembre del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA- Legaria para examinar la tesis de titulada:

CARACTERIZACIÓN DE BIOPOLIMEROS Y SU APLICACIÓN EN LA MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIOTICOS DE LIBERACIÓN ESPECÍFICA.

Presentada por el alumno:

Espinoza
Apellido paterno

Herrera
Apellido materno

Norma Lourdes
Nombre(s)

Con registro:

A	0	5	0	1	6	9
---	---	---	---	---	---	---

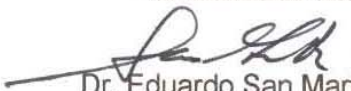
aspirante de:

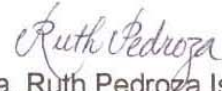
Doctorado en Tecnología Avanzada

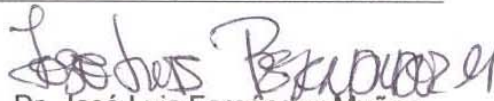
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

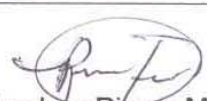
LA COMISIÓN REVISORA

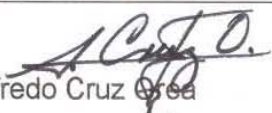
Directores de tesis


Dr. Eduardo San Martín Martínez


Dra. Ruth Pedroza Islas


Dr. José Luis Fernández Muñoz

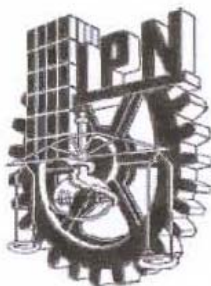

Dr. Teodoro Rivera Montalvo


Dr. Alfredo Cruz Grea

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. José Antonio Irán Díaz Góngora


CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
DEL IPN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de **México D. F.** el día 26 del mes de **Noviembre** del año **2008** el (la) que suscribe **Norma Lourdes Espinoza Herrera** alumno (a) del Programa de **Doctorado en Tecnología Avanzada** con número de registro **A050169** adscrito a **C.I.C.A.T.A-IPN** manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Eduardo San Martín Martínez y Dra. Ruth Pedroza Islas** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Caracterización de biopolímeros y su aplicación en la microencapsulación de probióticos de liberación específica”** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN. Legaria 649, Col. Irrigación, 11500 D. F. México. Teléfono 015557296300 ext 67769 Fax e-mail: nlespinozah@uaemex.mx, - esanmartin@ipn, ruth.pedroza@uia.mex.** Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Norma Lourdes Espinoza Herrera
Nombre y Firma

DEDICATORIA

**Dedico esta tesis a:
Andrea, Esteban y Eliseo
con todo mi amor.**

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Programa Institucional de Formación de Investigadores “P.I.F.I.” por el apoyo para la realización de mi programa doctoral.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

Al personal directivo del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada CICATA I.P.N: Especialmente a los Doctores: José Antonio Irán Díaz Góngora y José Antonio Calderón Arenas

A Dr. Eduardo San Martín Martínez, Ruth Pedroza Islas, por la dirección de la tesis y por su valioso apoyo y amistad.

A los miembros del jurado Dr. Alfredo Cruz Orea, Dr. José Luis Fernández Muñoz y Dr. Teodoro Rivera Montalvo por haber aceptado revisar el presente trabajo, así como a sus valiosas correcciones, comentarios y sugerencias que contribuyeron a la mejora de esta tesis.

A todo el personal Académico, Administrativo, Vigilancia y de Servicios del CICATA – Legaria por su valioso apoyo.

A la M. en C. Mayra Fabregat Vázquez y Ammal de Paul-Bulhosen por todas las facilidades y el apoyo que me brindaron para la realización de este proyecto en el laboratorio de Biopolímeros de la Universidad Iberoamericana.

Al Dr. Rubén Moreno Terrazas y M.en C. Mayela de la Rosa por permitirme trabajar en el laboratorio de microbiología de la Universidad Iberoamericana.

A Judith Rivera del departamento de Ingeniería en Alimentos de la Universidad Iberoamericana le agradezco su profesionalismo y ayuda que me brindó siempre.

Al Sr. Miguel Sánchez Rayas por su apoyo en el manejo del secador por aspersión de la planta piloto de la Universidad Iberoamericana.

Índice general

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XIV
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	4
1.1 Alimentos funcionales	4
1.2 Probióticos	8
1.2.1 Efectos benéficos de los probióticos en la salud	12
1.2.2 Nuevas fronteras en la investigación sobre probióticos	17
1.2.3 Bacterias ácido-lácticas	18
1.3 Aspectos tecnológicos en el uso de probióticos	20
1.4 Microencapsulación	25
1.4.1 Secado por aspersión	27
1.5 Cubiertas entéricas	29
1.5.1 Sistemas de liberación en el colon	30
1.5.1.1 Sistemas de liberación basados en la presencia de microbiota del colon	31
1.5.1.2 Sistemas de liberación en el colon basados en polisacáridos	32
1.5.1.3 Uso de cubiertas entéricas en la industria de alimentos	43
1.6 Justificación	46
1.7 Hipótesis	47
1.8 Objetivos	48
2. MATERIALES Y MÉTODOS	49
2.1 Materiales	49
2.2 Métodos	49
2.2.1 Difusividad térmica, microestructura y cristalinidad de películas de polisacáridos	49
2.2.2 Evaluación de la energía de activación	53

Contenido	Página
2.2.3 Evaluación de las propiedades mecánicas de las películas de biopolímeros	56
2.2.4 Evaluación de las propiedades de disolución de los biopolímeros	57
2.2.5 Evaluación del Índice de hinchamiento de las películas de biopolímeros	58
2.2.6 Diseño experimental símplex de centroide para mezclas de polisacáridos-proteína	59
2.2.7 Prueba de disolución e índice de hinchamiento de películas de mezclas	60
2.2.8 Microencapsulacion mediante secado por aspersión y evaluación de la supervivencia de <i>Lb. acidophilus</i>	60
2.2.9 Supervivencia de <i>Lb. acidophilus</i> microencapsulado en fluido gástrico simulado	63
2.2.10 Supervivencia de <i>Lb. acidophilus</i> microencapsulado en fluido intestinal simulado	64
2.2.11 Supervivencia de <i>Lb. acidophilus</i> microencapsulado en sales biliares	64
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
3.1 Capacidad de formar películas	66
3.2 Difusividad térmica (α)	68
3.3 Análisis estructural de la superficie de las películas	71
3.4 Energía de activación (E_a)	83
3.5 Propiedades mecánicas	87
3.6 Disolución de películas de biopolímeros	92
3.7 Índice de hinchamiento de películas de biopolímeros en FGS	95
3.8 Disolución e índice de hinchamiento de mezclas de mezclas de biopolímeros	96
3.8.1 Análisis estadístico de la mezcla CMC/P/G	97
3.8.2 Análisis estadístico de la mezcla CMC/P/PASL	106
3.9 Supervivencia de <i>Lactobacillus acidophilus</i> después del secado por aspersión	114
3.10 Evaluación <i>in Vitro</i> de la supervivencia de <i>Lactobacillus acidophilus</i> microencapsulado en condiciones del tracto digestivo	117
4 CONCLUSIONES	126
5 PERSPECTIVAS A FUTURO	129
6 GLOSARIO	131
7 TRABAJOS PRESENTADOS DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	135
8 REFERENCIAS	137

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1.1	Definiciones de términos de alimentos funcionales (Sanders, 1998a)	6
1.2	Lanzamientos a nivel mundial de productos que mencionan contener probióticos	10
1.3	Microorganismos considerados como probióticos	11
1.4	Criterios aplicados en la selección de bacterias probióticas para uso humano (Collins y col., 1998; Holtzapfel y Schillinger, 2002; Saarela y col., 2000; Olejnik y col., 2005)	19
1.5	Factores de estrés contra bacterias probióticas	22
1.6	Características de la gelatina tipo A y tipo B	39
2.1	Condiciones para preparar las dispersiones de polisacáridos	50
2.2	Condiciones de operación del TGA para alcanzar el secado isotérmico	54
2.3	Diseño experimental simplex de centroide para mezclas polisacáridos-proteína	59
2.4	Condiciones de secado para las mezclas seleccionadas	62
3.1	Espesor y coeficiente de difusividad térmica (α) de las películas de polisacáridos	68
3.2	Grado de cristalinidad y difusividad térmica de las películas de polisacáridos	70
3.3	Rugosidad promedio y altura media de las películas	74
3.4	Energía de activación de los polisacáridos	84
3.5	Disolución de las películas de biopolímeros en pH del estómago	93
3.6	Disolución de las películas de biopolímeros en pH del intestino	94
3.7	Índice de Hinchamiento de las películas de biopolímeros en FGS	95
3.8	Rendimiento de encapsulación de <i>Lb.acidophilus</i>	115

INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1.1	Tendencias en la nutrición	8
3.1	Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de pectina: parte central	72
3.2	Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de pectina: parte periférica	73
3.3	Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de MC	75
3.4	Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de CMC	75
3.5	Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de HPC	76
3.6	Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de HPMC	76
3.7	Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de almidón	77
3.8	Análisis de una sección transversal de la película de Almidón	78
3.9	Análisis de la sección transversal de una película de MC	79
3.10	Análisis de la sección transversal de una película de CMC	80
3.11	Análisis de la sección transversal de una película de HPC	81
3.12	Análisis de la sección transversal de una película de HPMC	82
3.13	Análisis de la sección transversal de una película de Pectina	83
3.14	Resistencia a la tensión de películas de biopolímeros	88
3.15	Elongación de películas de biopolímeros	88
3.16	Módulo de Young de películas de biopolímeros	89
3.17	Gráfica de contornos y superficie de respuesta de la disolución en pH 1.2 de las películas de la mezcla CMC/P/G	99
3.18	Gráfica de contornos y superficie de respuesta de la disolución en pH 7.0 de las películas de la mezcla CMC/P/G	101
3.19	Gráfica de contornos y superficie de respuesta del índice de hinchamiento en FGS de las películas de la mezcla CMC/P/G	103
3.20	Gráfica de contornos y superficie de respuesta del índice de hinchamiento en FIS de las películas de la mezcla CMC/P/G	105
3.21	Gráfica de contornos y superficie de respuesta de la disolución en pH 1.2 de las películas de la mezcla CMC/P/PASL	107
3.22	Gráfica de contornos y superficie de respuesta de la disolución en pH 7.0 de las películas de la mezcla CMC/P/PASL	108
3.23	Gráfica de contornos y superficie de respuesta del índice de hinchamiento en FGS de las películas de la mezcla CMC/P/PASL	110

3.24	Gráfica de contornos y superficie de respuesta del índice de hinchamiento en FIS de las películas de la mezcla CMC/P/PASL	111
3.25	Efecto del FGS en la supervivencia de <i>Lb.acidophilus</i>	118
3.26	Efecto de FIS en la supervivencia de <i>Lb.acidophilus</i>	119
3.27	Efecto de sales biliares en la supervivencia de <i>Lb. acidophilus</i>	120

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN DE BIOPOLÍMEROS Y SU APLICACIÓN EN LA MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS DE LIBERACIÓN ESPECÍFICA.

En este trabajo de investigación se planteó la importancia de una selección adecuada del material de pared para la encapsulación de *Lb. acidophilus* mediante secado por aspersión y la evaluación *in Vitro* de la función de esta pared como protector de la bacteria probiótica contra las condiciones adversas del tracto gastrointestinal.

Se seleccionaron los siguientes biopolímeros Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), Carboximetilcelulosa de sodio (CMC), Hidroxipropilcelulosa (HPC) Pectina Cítrica Rápida (P), Almidón modificado de maíz waxy (A) y Metil celulosa (MC), se prepararon mediante la técnica de vaciado en placa películas de estos materiales a las cuales se les evaluaron las siguientes propiedades fisicoquímicas: Difusividad térmica, Cristalinidad, Análisis estructural de la superficie de la película, Energía de activación, Propiedades mecánicas, Disolución en pH del estómago e intestino, e Índice de hinchamiento en fluido gástrico simulado (FGS).

Los resultados indican que existe una relación entre los valores de difusividad térmica y el grado de cristalinidad de las películas. El valor mayor de difusividad térmica ($16.321 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) y de cristalinidad (17.10 %) correspondió a la Pectina, en tanto que los materiales que presentaron valores menores de difusividad térmica y de cristalinidad fueron la MC y HPC. Con respecto al análisis de la estructura de las películas, el Almidón fue el que presentó la mayor rugosidad (88.6 nm) en contraste con la MC que fue la que presentó la menor rugosidad (7.91 nm). La Energía de activación (E_a), esta relacionada con la estructura de la microcápsula, el material

que obtuvo el valor más alto fue la HPC con 35.17 KJ/mol, seguido de la Pectina y la CMC con valores de 33.45 y 27.08 KJ/mol respectivamente, en cuanto a las propiedades mecánicas el material que presentó mayor resistencia a la tensión y el valor más alto de módulo de Young fue la CMC con valores de 69.1681 MPa y 1912.20 MPa respectivamente. El material que presentó una menor disolución en el pH 1.2 del estómago fue la Pectina con 73.59 % y en el pH 7 del intestino fue también la Pectina con 83.78 %. Finalmente los materiales que presentaron un mayor índice de hinchamiento en FGS fueron la CMC con 737.28 % y la Pectina 270.07 %.

A partir de los resultados anteriores se seleccionaron la CMC y la Pectina como los materiales con mayor potencial para usarse como cubiertas entéricas para encapsular *Lb. acidophilus* mediante secado por aspersión. En base a información bibliográfica y a resultados experimentales previos se decidió estudiar dos mezclas de 3 componentes: CMC/P/Gelatina (G) y CMC/P/Proteína Aislada de suero de leche (PASL), estos ingredientes se estudiaron mediante un diseño de mezclas de 3 componentes resultando un total de 11 tratamientos para cada mezcla. Para cada tratamiento se elaboraron películas a las cuales se les evaluó la disolución en pH del estómago y del intestino así como el índice de hinchamiento en fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado (FIS), de aquí se seleccionaron las dos mejores mezclas para encapsular mediante secado por aspersión bacterias probióticas de *Lb. acidophilus*. Para la mezcla CMC/P/G se obtuvo un rendimiento de encapsulación (RE) de 94.62% y para la mezcla CMC/P/PASL el valor de RE fue de 99.77 %.

Las bacterias encapsulas con la mezcla CMC/P/G cuando se sometieron *in vitro* a FGS presentaron una disminución de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos para el tiempo cero, aumentando ligeramente a las 2 hr del ensayo, en cambio para la

mezcla CMC/P/PASL la disminución fue de aproximadamente 1 ciclo logarítmico también para el tiempo cero tendiendo a disminuir la población bacteriana durante las dos horas siguientes. Para la sobrevivencia de *Lb. acidophilus* en fluido intestinal simulado, las dos mezclas presentaron una disminución de sólo un ciclo logarítmico. Las bacterias microencapsuladas con la mezcla CMC/P/G presentaron una disminución de 2 y 3 ciclos logarítmicos con la concentración de 1% y 2 % de sales biliares respectivamente, en tanto que las bacterias encapsuladas con la mezcla CMC/P/PASL sólo tuvieron una reducción de 1 ciclo logarítmico para ambas concentraciones de sales biliares.

Como resultado se puede concluir que la mezcla formada por CMC/P/PASL resultó un material adecuado para proteger a *Lb. acidophilus* de las condiciones de estrés a que se encuentra sometido durante el proceso de secado por aspersión y durante su paso a través de las condiciones adversas del tracto gastrointestinal, asegurando de esta manera que las bacterias probióticas sean liberadas en número suficiente y en condiciones de viabilidad en el colón para que ejerzan su efecto benéfico en la salud del huésped.

El presente estudio constituye una primera etapa en la evaluación de diferentes materiales y sus mezclas con potencial para usarse como materiales de pared para proteger y estabilizar la viabilidad de bacterias probióticas.

ABSTRACT

Characterization of biopolymer films for probiotic microencapsulation with specific release

Development of edible/biodegradable films/coatings for effective packaging of foodstuffs and probiotic coatings has generated considerable interest in recent years. Several types of natural and synthetic polymeric materials have been investigated for their use as enteric coatings. Since structural order plays an important role on film properties, the selected components must allow formation of uniform films. Addition of other components modifies the film features; therefore selection of components is made depending on the specific material to be coated. The main objectives of this study were to evaluate and to determinate the most appropriate wall material to microencapsulate *Lb. acidophilus* bacteria. The microencapsulation method used was spray-drying, and *in vitro* tests were conducted to evaluate the properties of the coating film as a protector of the probiotic bacteria from the severe conditions found in the gastrointestinal tract, particularly the acidic environment of the stomach, as well as from the exposition to bile salts.

The selected materials to evaluate were: hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC), carboxymethyl cellulose sodium (CMC), hydroxypropyl cellulose (HPC), Pectin citrus rapid set (P), Waxy corn starch (S) and Metil celulosa (MC). Isolated films were prepared by a process named "casting and evaporation" using circular teflon plates. The evaluated physicochemical properties were: thermal diffusivity, cristallinity, microstructural properties, activation energy, mechanical properties, film dissolution in simulated pH solution of stomach and small intestine and swelling index in simulated gastric fluid (SGF).

Results showed that exist a correlation between the thermal diffusivity values and the cristallinity measured in the biopolymer films. The highest values of thermal diffusivity ($16.321 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) and cristallinity (17.10 %) were for P, while the materials with the lowest values for these parameters corresponded to MC and HPC. Regarding the film structure analysis, starch showed the highest roughness value (88.6 nm) whereas HPMC resulted with the lowest value (7.67 nm). The activation energy has a correlation with the microcapsule structure, and it was found that the material exhibiting the highest value was HPC with 35.17 KJ/mol, followed by P and CMC with values of 33.45 and 27.08 KJ/mol respectively. For mechanical properties, it was found that the highest value of tensile strenght and Young's Modulus corresponded to CMC with values of 69.1681 Mpa and 1912.20 Mpa respectively. The material having the lowest dissolution value in stomach (pH 1.2) was P with a value of 73.59%, also P showed the lowest dissolution of 83.78% in small intestine (pH 7). Finally, the materials with the highest swelling index in SGF were CMC (737.28%) and P (270.07%).

From the above results, CMC and P were selected as the most appropriate polysaccharides to be used as a coating or film forming material to microencapsulate *Lb. acidophilus* by spray-drying. Based on similar studies and from previous experimental results, it was decided to evaluate two mixtures: CMC/P/Gelatin (G) and CMC/P/Whey Protein Isolate (WPI). The ingredients were statistically evaluated by

using a three-component mixture design. A total of eleven experiments were conducted for each mixture and the resulting films were evaluated *in vitro* to find the dissolution values in stomach/intestine pH as well as the swelling index in SGF and SIF. Two mixtures were selected as the best film-forming materials to microencapsulate the probiotic *Lb. acidophilus*. After the microencapsulation by spray drying, the survival rate value was of 94.62% for CMC/P/G mixture and 99.77% for CMC/P/WPI mixture.

When CMC/P/G mixture was used, the SGF *in vitro* test showed that the population of the bacteria was reduced by two logarithmic cycles at zero time and then it showed a moderate increasing after 2 hours. When the CMC/P/WPI mixture was used the population was reduced by one logarithmic cycle at zero time and then little variability was observed during the next two hours. Regarding the bacteria survival rate in SIF, both mixtures exhibited a reduction by only one logarithmic cycle. To evaluate the survival of microencapsulated *Lb. acidophilus* in bile salts, 1.0 and 2.0% concentrations of bile salts were prepared, the population of bacteria microencapsulated in CMC/P/WPI mixture was reduced by two and three logarithmic cycles at 1% and 2% concentrations of bile salts respectively, whereas the population in CMC/P/G mixture presented a reduction by only one logarithmic cycle for both concentrations of bile salts.

The present study is the first step in the evaluation of different materials and mixtures to be used as a wall material to protect the viability of *Lb. acidophilus* and to assure the specific release of probiotic to the colon in order to exert a beneficial impact on the host.

INTRODUCCIÓN

En los años recientes, el interés del consumidor por su salud se ha venido incrementando y su expectativa es que los alimentos que consuma, contribuyan a ella y más aún, que sean capaces de prevenir enfermedades, sobre todo porque factores tales como el estilo de vida, la exposición constante a factores de estrés, los cambios en los patrones dietéticos y hábitos alimenticios, así como el consumo de fármacos en particular antibióticos, afectan negativamente la salud (Markowitz y Bengmark, 2002).

Algunos de estos efectos negativos, pueden tener su origen en el desbalance de la población bacteriana intestinal o microbiota (Fooks y Gibson, 2002), lo que puede traer como consecuencia, desórdenes en la salud tales como, infecciones intestinales, gastritis, úlcera, hipersensibilidad a los alimentos, alergias, intolerancia a la lactosa, enfermedades crónicas como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, entre otras (Scherezenmeir y Vrese, 2001; Shah, 2001).

La microbiota intestinal está integrada por alrededor de cien trillones de bacterias de entre 50 y 100 variedades diferentes, que habitan el intestino del hombre. Ellas pueden producir sustancias útiles (bacterias probióticas) o dañinas (bacterias patógenas) dependiendo del tipo de bacteria y a su vez, su efecto sobre el huésped, estará en función del balance entre ellas (Mitsuoka, 1997). De aquí surge la creciente atención para la aplicación preventiva o terapéutica de los microorganismos probióticos (Jonkers y Stockbrügger, 2007).

En este sentido, el concepto de probiótico, ha ganado popularidad rápidamente en todo el mundo y son algunas de las bacterias ácido-lácticas (BAL), miembros del

género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* las de mayor reconocimiento como bacterias probióticas, con efectos demostrados benéficos a la salud. Éstas pueden ser consumidas a partir de los productos lácteos fermentados, sin embargo, el análisis de estos productos en varios países, ha confirmado que las cepas probióticas exhiben una baja sobrevivencia (Shah, 2000).

Su aplicación en productos no lácteos representa un gran reto, ya que la viabilidad de los probióticos en la matriz del alimento depende de factores tales como pH, temperatura de almacenamiento, presencia de organismos competitivos y la presencia de sustancias inhibidoras. Otros factores, como la presencia de oxígeno, es considerado un factor crítico para la sobrevivencia de los probióticos (Shah, 2000; Talwalkar y Kailasapathy, 2003; Talwalkar y Kailasapathy, 2004).

Como consecuencia algunos de los temas tecnológicos relacionados al desarrollo de alimentos que contengan estas bacterias, en número suficiente para que tengan una acción benéfica a la salud del huésped, está enfocado totalmente a que la vida de anaquel se prolongue, así como a la manera de estabilizarlos después de la ingestión, como es la exposición a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal humano (Ross y col., 2005).

Muchos estudios han demostrado que estos cultivos pueden protegerse significativamente mediante la encapsulación en una variedad de materiales (Ross y col., 2005; Crittenden y col., 2001; Moser y Savage, 2001; Mosilhey, 2003).

Se han utilizado diferentes procesos de encapsulación tales como extrusión, emulsificación (Krasaekoopt y col., 2003) y secado por aspersion (O'Riordan y col., 2001). Este último es el más utilizado en la industria de los alimentos y permite manejar materiales termo-lábiles.

El proceso de encapsulación y el material encapsulante influyen de manera determinante en la viabilidad de las bacterias probióticas bajo diferentes condiciones cuando se compara con bacterias que no han sido encapsuladas.

Con respecto a la utilidad de la microencapsulación existen pocos trabajos que abordan la microencapsulación de bacterias probióticas desde la base de la selección de los materiales encapsulantes tomando como criterio de selección diversas propiedades fisicoquímicas de los mismos así como la alternativa de desarrollar mezclas de polisacáridos y proteínas, con el objeto de obtener una cubierta entérica que libere a los probióticos específicamente en el colon.

En el presente trabajo de investigación se evaluaron algunas propiedades fisicoquímicas de varios biopolímeros con el objeto de seleccionar los más adecuados para encapsular *Lactobacillus acidophilus* mediante secado por aspersión. Se utilizó un diseño de mezclas de tres componentes para la evaluación *in Vitro* del efecto de la interacción polisacáridos-proteína en la disolución de la película, en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, así como el índice de hinchamiento en fluido gástrico e intestinal simulado, con el objeto de desarrollar un sistema de liberación específica en el colon. Finalmente con las mejores mezclas seleccionadas se encapsuló *Lb. acidophilus* evaluando el efecto de la cubierta, en la protección de la bacterias de los efectos del secado por aspersión, así como la protección y la sobrevivencia de la bacteria probiótica en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

1 ANTECEDENTES

1.1 Alimentos funcionales

Existe una clara relación entre los alimentos que se consumen y la salud. Tal dependencia es clara en enfermedades tales como la diabetes no insulino-dependiente, la osteoporosis, la hipertensión, el cáncer del tubo digestivo o de mama, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, etc., y cabe mencionar que éstas, constituyen las mayores causas de mortalidad en Europa. Existe por tanto la posibilidad de mejorar la salud a través de una alimentación adecuada (Rowland, 2002).

Esta situación no ha pasado desapercibida por la población en general. Por ejemplo, los europeos tienen una creencia arraigada, de que lo que se come influye en la salud. Así, en un reciente estudio que relaciona actitudes hacia los alimentos y la salud, se demostró que el 62 % de la gente realiza esfuerzos para seguir una dieta sana, como lo es la llamada dieta Mediterránea (Kierney y col., 2001). Un estudio dirigido por el European Institute for Food Studies (Gibney, 1997), que incluía más de 14 000 europeos de quince países, reveló que el 32% de los consumidores tiene en consideración la salud al elegir su comida. Una concientización similar existe en los Estados Unidos, donde el 52% de los consumidores creen que la comida puede sustituir a los medicamentos; más del 60% ven una relación entre el estado de ánimo y la comida; más del 75 % observan una relación entre la dieta, la longevidad y el aspecto físico; un 70% conoce que algunos ingredientes alimentarios previenen el cáncer, y un 52% considera que existe una conexión entre la soya y la reducción de colesterol (Hudges, 2007).

Lo anterior, ha favorecido el actual aumento en la demanda de alimentos que mejoran el estado de salud, llamados también “alimentos funcionales”. De acuerdo al Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine de Estados Unidos, un alimento funcional es “un ingrediente o suplemento alimenticio que aporta un beneficio funcional adicional específico (fisiológico o psicológico) a su valor nutricional básico” (Wildman, 2001).

Estrictamente hablando, todos los alimentos podrían ser considerados como funcionales, en tanto que proporcionan la energía y los nutrientes necesarios para la supervivencia. Pero el término alimento funcional en uso hoy día, expresa los beneficios a la salud que se extienden más allá de la mera supervivencia. La ciencia de los alimentos y la nutrición han modificado, a partir de identificar y corregir deficiencias nutricionales, los criterios para diseñar alimentos buscando promover una salud óptima y reducir el riesgo de enfermedades (Clydesdale, 2004).

En contraste con los suplementos dietéticos, los alimentos funcionales son componentes de la dieta usual que pueden tener atributos especiales en la prevención de enfermedades. Los suplementos dietéticos pueden proclamar solamente beneficios generales a la salud, mientras que los alimentos funcionales, pueden proclamar beneficios específicos a la salud, debido a que son considerados parte de la dieta (Ross, 2000).

El campo de los alimentos funcionales ha evolucionado rápidamente y como respuesta han surgido muchos términos nuevos. Aunque en muchos casos estos términos carecen de una definición legal, sus definiciones usadas de manera común se muestran en el cuadro 1.1. Un asunto que es importante recalcar, es que los alimentos funcionales promueven la salud, no curan las enfermedades (Sanders, 1998a).

Cuadro 1.1 Definiciones de términos de alimentos funcionales
(Sanders, 1998a)

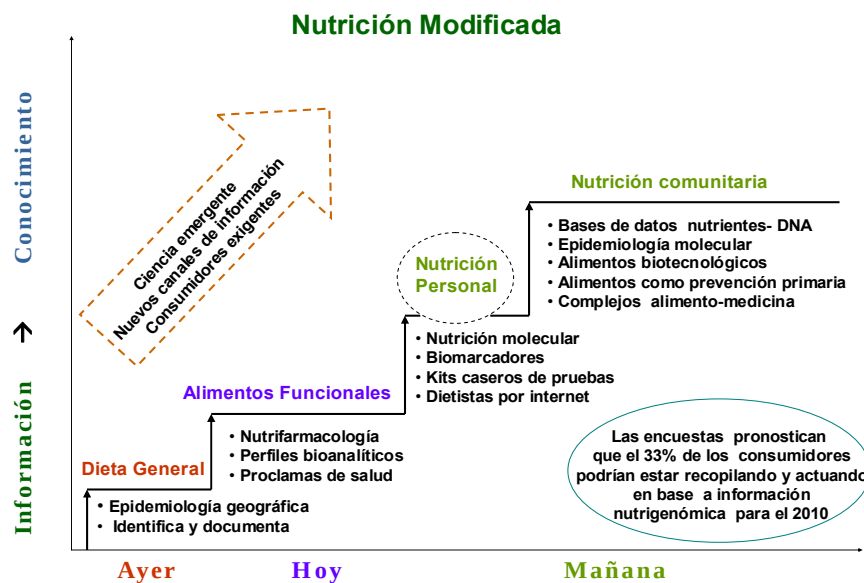
Término	Definición
Alimento Funcional	Un alimento modificado o ingrediente alimenticio que proporciona un beneficio a la salud más allá de satisfacer los requerimientos tradicionales de nutrientes.
Alimentos para uso específico en la salud (FOSHU)	El gobierno Japonés define FOSHU como “alimentos los cuales se espera que tengan ciertos beneficios a la salud, y han sido autorizados para indicar en su etiqueta que el consumidor que los use para un beneficio específico en la salud puede esperar obtener la salud a través de su consumo” Hasta Junio de 1998, 80 alimentos y 67 ingredientes han sido registrados oficialmente como FOSHU.
Nutracéutico	Un nutraceutico es un alimento o parte de un alimento que ofrece beneficios médicos o de salud incluyendo la prevención o tratamiento de enfermedades.
Alimento Colónico	Alimento no digerible el cual alcanza el colon, generalmente en la forma de un carbohidrato no digerible.
Prebiótico	Un alimento colónico que favorece el crecimiento de bacterias intestinales benéficas (ejemplo, Lactobacilos y Bifidobacterias)
Probiótico	Un cultivo de un sólo microorganismo o mezcla de microorganismos los cuales, cuando se administran a animales o humanos tienen un efecto benéfico en el huésped.
Alimento Médico	Una clasificación especial de alimento que de acuerdo a las leyes de Alimentos de Estados Unidos especifica : • Debe usarse bajo supervisión médica • Debe ser para una enfermedad con características nutrientes específicas y bien definidas. • Basada en principios científicos bien definidos. • Debe proveer evaluación médica

Algunos ejemplos comunes de ingredientes funcionales son las vitaminas, los minerales, los fitoquímicos (sustancias químicas provenientes de plantas que pueden influir en la salud pero que no son nutrientes esenciales, como la fibra), los carotenoides, los compuestos organosulfurados, los compuestos fenólicos y los fitoesteroles (Hudghes, 2007).

Los alimentos funcionales son parte de la industria de la salud y del bienestar, se estima que en la actualidad sus ventas alcanzan 68 billones de USD, según cifras del Natural Marketing Institute de Estados Unidos (Prepared Food. January 2007), incluyendo productos tales como bebidas, alimentos orgánicos, suplementos dietéticos y productos para el cuidado personal.

En el pasado, los alimentos fueron considerados en términos de su valor dietético natural. Ahora, los alimentos van más allá de su valor dietético y se valoran más por cómo contribuyen a nuestra salud. En el futuro, se estima que la relación con nuestra dieta evolucionará hacia un tipo de nutrición personalizada, caracterizada por una mejor comprensión de la nutrición molecular. Se tendrá un mejor entendimiento de cómo los nutrientes afectan el DNA, cómo los alimentos afectan a la población y se estará más consciente de la dieta como una prevención primaria de enfermedades, como se muestra en la figura 1.1.

Los probióticos son, tal vez, el ejemplo mejor caracterizado y más estudiado de los alimentos funcionales y junto con los prebióticos representan el segmento más grande de los alimentos funcionales en el mercado de Europa, Japón y Australia.



Fuente: Gilles, PJ, J Am Diet Assoc. 2003; 103:S50-S55

Figura 1.1 Tendencias en la nutrición.

El mercado de esta categoría de alimentos continúa expandiéndose en paralelo con el creciente interés de los consumidores sobre el papel de la dieta en la conservación y mantenimiento de la salud (Stanton y col., 2001) y representa una gran oportunidad de mercado para la industria Láctea y de los Alimentos.

1.2 Probióticos

El término probiótico, deriva del Griego y significa “por la vida”; fue usado por primera vez por Lylli y Stillwell (1965) para describir “substancias secretadas por un microorganismo las cuales estimulan el crecimiento de otro” contrastando así con el término antibiótico. En 1971 Sperti aplicó el término a extractos de tejido que estimulan el crecimiento microbiano. Parker (1974) fue el primero en usar el término probiótico en el sentido en que se usa actualmente. El definió a los probióticos como “organismos y sustancias los cuales contribuyen al balance microbiano intestinal”.

Schrezenmeir y de Vrese (2001) propusieron la siguiente definición: “Una preparación de y/o un producto conteniendo microorganismos específicos, viables y en número suficiente, los cuales alteran la microflora (mediante implantación o colonización) en una sección del huésped, ejerciendo efectos benéficos en la salud del mismo.

La FAO define a los probióticos como “organismos vivos los cuales, cuando se administran en número adecuado, confieren un beneficio en la salud del huésped” (FAO/WHO, 2001).

El interés en los alimentos funcionales particularmente el uso de probióticos por el público en general, así como la prevención de ciertas enfermedades crónicas (cáncer, diabetes y alergias), ha ganado importancia durante la década pasada. El incremento en los costos de tratamientos médicos, por el número de pacientes que sufren las llamadas “enfermedades de Occidente”, tales como alergias, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias y problemas relacionados con el intestino, así como también el aumento de la población de mayor edad y el incremento en general del interés de la población por su salud, son todos factores claves en el interés creciente que se muestra por los probióticos para mejorar la salud (Rutherford-Markwick y Gill, 2004).

Desde el punto de vista global, entre 2001 y 2006, Europa aumentó en un 70 % la introducción en el mercado de alimentos y bebidas probióticas, seguida por Asia del Pacífico con 20 %, Latinoamérica con 5 % y África con 4 %. En el cuadro 1.2 se muestran los datos de la evolución que ha tenido el mercado de los alimentos probióticos a nivel mundial.

Cuadro 1.2. Lanzamientos a nivel mundial de productos que mencionan contener probióticos

Región	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
África	0	6	10	7	8	11	42
Norteamérica	1	6	7	18	13	31	76
Latinoamérica	4	7	5	11	20	15	62
Asia Pacífico	23	31	30	64	84	106	338
Europa	113	113	130	232	254	214	1056

Mintel's Global New Products Database

A pesar de que el hombre ha consumido productos fermentados durante miles de años y hay evidencia, a través de anécdotas, que sugiere sus propiedades en la promoción de la salud, es sólo hasta la actualidad que existe la suficiente certidumbre que avala determinados beneficios en la salud, después del consumo de cepas bacterianas específicas.

Desde luego que lo que hasta aquí se ha escrito, no significa que el consumo de probióticos represente el combate contra todas las enfermedades que afectan a nuestra sociedad. Sin embargo, existe una clara evidencia de su eficacia en ciertas áreas y suficiente apoyo experimental en otras, para justificar estudios posteriores más detallados sobre sus mecanismos de acción que faciliten el desarrollo de organismos más resistentes, y para definir también los límites de su efectividad.

Los probióticos más extensamente estudiados y ampliamente usados, como ya se mencionó antes, son BAL particularmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* spp., las cuales se encuentran en gran número en el tracto gastrointestinal de animales sanos. La FDA (Food and Drug Administration de los EUA) las reconoce como seguras (GRAS por sus siglas en inglés) y son las que comúnmente se emplean en alimentos para consumo humano (Stanton y col., 2003a).

En el Cuadro 1.3 se muestran algunos de los organismos usados comúnmente como probióticos (Senok y col., 2005).

Cuadro 1.3 Microorganismos considerados como probióticos

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp	Otras
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>Lb. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces boulardi</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> Subs. <i>bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Enterococcus faecium</i> ^b
<i>Lb. Fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>Lb. gasseri</i>	<i>B. adolescentis</i>	
<i>Lb. johnsonii</i>		
<i>Lb. paracasei</i>		
<i>Lb. Plantarum</i>		
<i>Lb. reuteri</i>		
<i>Lb. rhamnosus</i>		

^b Su seguridad queda todavía pendiente debido a su patogenicidad potencial y resistencia a la vancomicina.

Es importante recordar al considerar su efectividad o actividad biológica, que los probióticos se comportan como ingredientes alimenticios y no como productos farmacéuticos. Por lo tanto, sus efectos son principalmente de naturaleza profiláctica más que terapéutica, es decir de carácter más preventivo que curativo. Este hecho tiene importantes implicaciones en la valoración de su eficacia, ya que resulta más sencillo demostrar que un compuesto puede curar una enfermedad o atenuar un síntoma, sin embargo la demostración concluyente sobre la prevención de una enfermedad es una tarea mucho más difícil, ya que requiere una gran número de personas sobre las cuales experimentar y bastante tiempo, a la espera de que un grupo de esos individuos aparentemente sanos, padezca la enfermedad que se está estudiando.

1.2.1 Efectos benéficos de los probióticos en la salud

Existe una gran variedad de efectos benéficos en la salud que se han atribuido a los probióticos, sin embargo ha habido relativamente poca evidencia científica a partir de estudios clínicos reportados en la literatura científica (Marteau y col., 2000). Los síntomas clínicos que han sido tratados o tienen el potencial de ser tratados mediante el uso de probióticos incluyen: gastroenteritis, diarrea, síndrome de intestino irritable, enfermedades inflamatorias del intestino (enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa) cáncer, función inmune deprimida, digestión inadecuada de la lactosa, alergias infantiles, infecciones con *Helicobacter pylori* y otras (Parvez y col., 2006).

Además de estudiar los grupos de bacterias existentes en el organismo humano la microbiota debe ser considerada como una entidad altamente metabólica. Realizan importantes funciones en el huésped tales como la conversión de sustancias (pro)carcinogénicas, la producción de vitaminas, degradación de ácidos biliares, forman una barrera contra los patógenos por el mecanismo de colonización, favorecen la digestión de nutrientes (Jonkers y Stockbrügger, 2007).

Los posibles mecanismos mediante los cuales actúan los probióticos son mediante la modulación de la microbiota intestinal y la modulación del sistema inmune (Ouwehand y col. 2002).

Atenuación de la intolerancia a la lactosa.

Hay suficientes evidencias de que el yogurt, y más específicamente los organismos presentes en el yogurt, atenúan los síntomas de la intolerancia a la lactosa en individuos deficientes en lactasa. El mecanismo de acción de las BAL y de los productos lácteos fermentados incluye los siguientes: presencia de concentraciones

bajas de lactosa en los productos fermentados, y un incremento en la actividad enzimática de la lactasa en el intestino delgado por las bacterias que sobrevivieron a las condiciones gástricas y la presencia de las sales biliares (Salminen y col., 2004).

Efectos preventivos y terapéuticos contra la diarrea.

Esta área es tal vez la más avalada por estudios en humanos. Existe una mayor evidencia de los efectos beneficiosos de los probióticos, en niños con diarrea producida por rotavirus; así, diferentes estudios han demostrado que la duración de los síntomas de la enfermedad se reduce cuando se consumen ciertos *Lactobacillus* (Isolauri y col., 1991). Junto a estos efectos sobre la diarrea, se observa un incremento en el nivel de inmunoglobulinas específicas a rotavirus, creando un mecanismo de defensa inmune que acompaña al efecto antidiarreico (Kaila y col., 1992). Se demostró también, una reducción significativa en la duración de la diarrea y una salida más rápida del hospital usando *Lb. rhamnosus* (Sullivan y Nord, 2005). Se afirma que existe suficiente evidencia para recomendar el uso de *Lb. rhamnosus* GG en leche o en forma de cápsulas como un adjunto en la terapia de rehidratación oral para el tratamiento de diarrea por rotavirus (Allen y col., 2004). En adultos se ha observado la reducción de la diarrea asociada a tratamientos con antibióticos (a menudo por colonización del intestino con *Clostridium difficile*), después del consumo de probióticos, aunque la evidencia es mayor con algunas combinaciones antibióticos-probióticos que con otras. Se mostró especialmente efectivo el uso de *Saccharomyces boulardii*, contra la diarrea por antibióticos (Surawicz, 1989).

Inmunidad.

Una de las proclamas más comunes usadas por la mercadotecnia de los productos probióticos es que ayudan a mejorar el sistema inmune. Aunque estudios *in Vivo* e *in Vitro* sugieren que los probióticos pueden modelar la respuesta inmune, los mecanismos precisos de esta acción son poco conocidos y estudios realizados con preparaciones de probióticos en diferentes laboratorios han generado resultados poco claros. Sin embargo existen estudios que han mostrado que las bacterias probióticas pueden modificar varios parámetros inmunológicos, incluyendo el humoral, celular y el no específico (Cross y col., 2002). Los mecanismos de modulación del sistema inmune que han sido demostrados con los probióticos incluyen la producción de moco, activación de los macrófagos, estimulación de la secreción de IgA y de neutrófilos, inhibición de la liberación de citoquinas inflamatorias y estimulación de inmunoglobulinas periféricas (Mack y Lebel, 2004).

Control del colesterol plasmático.

Se considera que niveles elevados de colesterol total en sangre y otros lípidos, son factores de riesgo para desarrollar enfermedades del corazón.

Las BAL, han sido evaluadas para conocer su efecto sobre los niveles de colesterol en sangre, sin embargo, los estudios clínicos en humanos no han sido concluyentes. Algunos estudios han reportado que se redujo la concentración de colesterol en suero después del consumo de yogurt enriquecido con una cepa de *Lb. acidophilus* en combinación con fructooligosacáridos (FOS) (Schaafsma y col., 1998; Sanders y Klaenhammer, 2001).

Enfermedad intestinal inflamatoria

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son enfermedades inflamatorias crónicas del intestino delgado y grueso, difíciles de tratar con éxito con medicamentos, siendo comunes las recaídas.

Hay evidencias que demuestran que los probióticos mejoran la condición de dichas enfermedades. En un estudio clínico, con placebo, en pacientes con problemas de enfermedades intestinales inflamatorias, a quienes se les suministró un compuesto de probióticos (cuatro tipos de lactobacilos, tres de bifidobacterias y un estreptococo) se encontró que 20/20 de los pacientes con placebo recayeron en un plazo de ocho meses desde el inicio de los ensayos, mientras que en el mismo período, sólo 3/20 de los pacientes a los que se les suministraron los probióticos, recayeron (Famularo y col., 2000). Asimismo se observó un incremento en los niveles de citosina IL-10 antiinflamatoria en las biopsias de las mucosas de los pacientes tratados con probióticos.

Prevención del cáncer

En general el cáncer es causado por la mutación o activación de genes anormales que controlan el crecimiento y la división de las células.

Se han realizado estudios sobre el efecto de los probióticos en la microecología intestinal y el cáncer. *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* cepa Shirota y *Lb. GG* han mostrado tener propiedades inhibitorias sobre las sustancias químicas que inducen tumores en animales (Ross, 2000; McFarland y Cummings, 2002). Otros estudios indican que cepas específicas de bacterias probióticas pueden ser capaces de regular la actividad enzimática microbiana del intestino. Este fenómeno puede por tanto disminuir la actividad cancerígena de las enzimas microbianas lo cual tiene un efecto

benéfico en el colon, tracto urinario y vejiga. Sin embargo son necesarios más estudios especialmente en humanos.

Los reportes más convincentes que han sido publicados son relacionados con *Lb. casei* Shirota. Recientemente, se ha realizado un gran estudio en Japón sobre el consumo habitual de BAL y la reducción del riesgo de cáncer de vejiga. Este estudio sugiere que el consumo habitual de leche fermentada con la cepa mencionada, reduce el riesgo de cáncer de vejiga en la población japonesa.

Alergias

La prevalencia de enfermedades alérgicas se ha incrementado en los últimos 35-40 años, particularmente en las sociedades Occidentales. Aunque la investigación es preliminar sobre cómo los probióticos podrían modular la reacción alérgica, se cree que podrían ejercer un efecto benéfico mejorando la función de barrera de la mucosa y mediante la estimulación del sistema inmune (MacFarlane y Cummings, 2002). Se ha sugerido que los probióticos pueden fortalecer los mecanismos de barrera endógenos del tracto gastrointestinal y así aliviar la inflamación intestinal, proporcionando una herramienta útil para tratar las alergias por alimentos (MacFarlane, 2000; Kalliomaki e Isolauri, 2004).

1.2.2 Nuevas fronteras en la investigación sobre probióticos

A pesar del potencial de los probióticos en una variedad de escenarios clínicos existen problemas significativos respecto a su funcionalidad. En primer lugar las cepas de probióticos más efectivas clínicamente son frecuentemente las que son fisiológicamente más frágiles, disminuyendo drásticamente en número y por tanto en su eficacia; de igual manera mueren en cada etapa de producción del alimento (o de

la tableta) y durante el almacenamiento del mismo (Sleator y Hill, 2008). En segundo lugar, el mecanismo exacto de acción profiláctica o terapéutica esta frecuentemente poco entendida, (Sleator y Hill, 2006), de ahí que los más recientes avances en el campo de la investigación de los probióticos hayan sido enfocados en mejorar la liberación, especificidad y eficacia.

Los métodos actuales para mejorar la supervivencia de los probióticos involucran la inducción de una respuesta de tolerancia al estrés la cual se logra mediante la pre-exposición de las células a estrés subletal. Tales como sales, calor, bilis y pH bajo (Gilliland y Rich, 1990; Desmond y col., 2002). Schmidt and Zink (2000) demostraron que la exposición de *Bifidobacterium adolescentis* a 47 °C por 15 minutos previo al proceso de choque térmico letal incremento la tolerancia al calentamiento de la cepa 128 veces.

Otras estrategias, tales como la tecnología de células inmobilizadas (Doleyres y col., 2004) y la microencapsulación (Sun y Griffiths, 2000) han también demostrado que protegen y aumentan la tolerancia a diversos factores de estrés (pH, altas temperaturas, bilis, enzimas) de ciertas cepas de probióticos.

Sin embargo todavía se requiere mayor investigación para que se puedan alcanzar los estándares y expectativas del sector industrial (Doleyres y Lacroix, 2005).

Una manera alterna para mejorar la eficacia de los probióticos es mejorar la capacidad de las cepas para sobrellevar el estrés a nivel genético, usando los genes de adaptación al estrés aislados de cepas patógenas (Sleator y Hill, 2006, 2007 a). Este enfoque ha sido empleado exitosamente para incrementar la tolerancia al estrés de dos cepas de probióticos *L. salivarius* UCC118 y *Bifidobacterium breve* UCC2003 (Sheehan y col., 2007).

Clonando el gen transportador de betaína (BetL) proveniente de *Listeria monocytogenes* en la cepa de *L. salivarius* UCC118 se obtuvo un incremento significativo en la tolerancia a la sal, con el crecimiento de la cepa transformada en una concentración de sal de 7 %, además de aumentar la osmotolerancia, la introducción de este gen mejoró la resistencia al frío y la congelación y al secado por aspersión (Sheehan y col., 2006).

1.2.3 Bacterias ácido-lácticas

La mayoría de los probióticos se hallan dentro del grupo de los organismos conocidos como bacterias productoras de ácido láctico, y se consumen normalmente en forma de yogurt o leches fermentadas, aunque también encontramos en el mercado preparados o cápsulas de organismos liofilizados (Rowland, 2002).

Los criterios aplicados en la selección de bacterias probióticas para uso en humanos se presentan en el Cuadro 1.4.

Cuadro 1.4. Criterios aplicados en la selección de bacterias probióticas para uso humano (Collins y col., 1998; Holtzapfel y Schillinger, 2002; Saarela y col., 2000; Olejnik y col., 2005)

Propiedades	Criterio
Seguridad	Origen humano, provenir de personas sanas No patógeno. Generalmente reconocido con estatus de seguro No tener conexión con bacterias que producen diarrea No tener habilidad para transferir genes con resistencia a antibióticos Estabilidad genética
Funcionalidad	Estabilidad en ácidos y bilis Resistencia a enzimas digestivas Sobrevivencia en el intestino humano y habilidad para adherirse a la superficie del intestino No invasivo Actividad antagonista contra patógenos humanos Producción de metabolitos anti-microbianos, especialmente contra patógenos gram-negativos Actividad anticarcinogénica y antimutagénica Reducción de la respuesta inmune en caso de alergia

	Mejora de la biodisponibilidad de compuestos alimenticios y producción de vitaminas y enzimas. Inmunoestimulación pero no causante de efectos inflamatorios
Tecnológico	Buenas propiedades sensoriales Actividad fermentativa Buena sobrevivencia durante el proceso de liofilización y secado por aspersión Buen crecimiento y viabilidad en productos alimenticios Resistencia a fagos Alta estabilidad durante tiempos largos de almacenamiento.

También se han realizado estudios muy profundos sobre la toxicidad de los probióticos, usando los mismos procedimientos utilizados para estudios de toxicidad química ocasionada por sustancias químicas para varias cepas de probióticos (Donohue y col., 1993; Donohue y Salminen, 1996a; Donohue y col., 1998). Los resultados mostraron que no existe toxicidad relacionada con ninguna cepa.

Si la cepa que esta bajo evaluación para ser aceptada como probiótica pertenece a una especie que se sabe que es productora de toxinas en mamíferos, debe someterse a una evaluación de producción de toxinas. Un posible esquema para evaluar la producción de toxinas ha sido recomendada por el Comité Científico de Nutrición Animal de Estados Unidos (SCAN, 2000).

Lactobacillus acidophilus

Lb. acidophilus, es un bacilo gram-positivo con puntas redondeadas que se presenta como células simples, en pares o en cadenas cortas. Es un bacilo no flagelado, no forma esporas y no presenta motilidad. Su tamaño varía de 0.6-0.9 µm de longitud (Nahaisi, 1986; Kunz, 1994).

El crecimiento de *Lb. acidophilus* puede ocurrir hasta a 45 °C, pero su crecimiento óptimo ocurre entre 35-40 °C con un pH óptimo de 5.5-6.0 (Gomes y Malcata, 1999).

El género *Lactobacilli* tiene requerimientos complejos para su crecimiento. Requieren baja tensión de oxígeno ya que son micro-aerófilos, así que el crecimiento en la superficie de los medios de cultivo sólidos se favorece por anaerobiosis o reduciendo la presión de oxígeno y con 5-10 % de CO₂.

1.3. Aspectos tecnológicos en el uso de probióticos

Mientras es indudable que las evidencias clínicas soportan la actividad promotora de la salud que aportan los probióticos, es probablemente menos valorado que el desarrollo de la tecnología adecuada y práctica para estas cepas es un factor crítico para su explotación comercial.

Con respecto a esto no es sorprendente que muchas cepas aisladas del intestino humano sean anaerobias estrictas y su crecimiento sea muy pobre fuera de su hábitat natural, el intestino humano. Consecuentemente, el cultivo en gran escala y subsecuente almacenamiento de estos probióticos, frecuentemente representa un obstáculo para su explotación comercial. Por esta razón, recientemente la investigación se ha enfocado en la protección de la viabilidad de los cultivos probióticos, durante la manufactura del producto, su almacenamiento y durante su tránsito por el tracto gastrointestinal.

Los productos que contienen probióticos ya sea bebidas lácteas, yogurts, tabletas o botanas saludables, presentan retos únicos para los fabricantes, en realidad muchos cultivos activos en leche mueren o ven considerablemente reducido su número, antes de que el consumidor los ingiera (durante la manufactura, almacenamiento y transporte del producto terminado). Específicamente debe mencionarse que los probióticos son extremadamente susceptibles al medio ambiente.

Varios factores afectan la supervivencia de *Lb. acidophilus* y *Bifidobacterium* spp. en los alimentos y en específico en el yogurt. Éstos incluyen, el tipo de cepa, el pH, la presencia de peróxido de hidrógeno, la atmósfera de almacenamiento, la concentración de metabolitos tales como el ácido láctico y el ácido acético, el oxígeno disuelto y la presencia de amortiguadores tales como las proteínas de suero de leche (Rybka y Kailasapathy, 1995; Dave y Shah, 1997a; Kailasapathy y Rybka, 1997).

Las bacterias probióticas se desempeñan mejor cuando se encuentran en un ambiente con condiciones adecuadas y cuando se protegen contra factores de estrés a los que pueden estar expuestos durante la producción a nivel industrial o en el sistema gastrointestinal.

El Cuadro 1.5 muestra los factores de estrés que pueden afectar a las bacterias probióticas.

Cuadro 1.5 Factores de estrés contra bacterias prebióticas

Durante su producción	Referencia
Grandes concentraciones de productos de la fermentación (ácido láctico en el medio de cultivo) Cosecha (centrifugación y ultrafiltración) Congelación Secado Exposición al oxígeno Presión osmótica (presencia de sales) Tolerancia al calor Habilidad para crecer en leche	Kulisaar y col., (2002) Desmond y col., (2001) Klaver y col., (1993)
En el tracto gastrointestinal	
Rehidratación en un medio ácido Largo tiempo de exposición a la acidez del estómago Ácidos biliares Exposición al oxígeno Habilidad para metabolizar prebióticos	Shah (2000) Shah (2000) Charteris y col., (1998) Kulisaar y col., (2002) Ziemer y Gibson (1998)

Entre estos factores, la exposición al oxígeno disuelto durante la manufactura y almacenamiento se considera de gran significancia. Ambas bacterias, *Lb. acidophilus* y *Bifidobacterium* spp son organismos del tracto gastrointestinal y son microaerófilos y anaerobios respectivamente.

Aunque la toxicidad del oxígeno se considera muy importante en la sobrevivencia de los probióticos en el yogurt, existe poca investigación disponible sobre la interacción del oxígeno con *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp. Más aún, la mayoría de las investigaciones disponibles están enfocadas a bifidobacterias (Talwalkar y Kailasapathy, 2004)

Para beneficiar la salud humana, los probióticos deben sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal superior y llegar vivos al sitio específico, el cual será colonizado por estos microorganismos.

Durante el paso a través del tracto intestinal superior, los microorganismos están sujetos a varios agentes de estrés. En el estómago el pH es muy bajo encontrándose en el rango de 1.5-3.0, factor que resulta muy estresante para las bacterias probióticas.

Entonces, la extrema acidez del estómago puede considerarse como un factor clave en la selección de la BAL específica, así como del material de pared que será empleado en la protección del microorganismo.

Lee y Wong (1998) demostraron que el valor de pH en leches fermentadas disminuyó el número de células viables de *Lb. casei* en 2 ciclos logarítmicos, en un lapso de 13 días, cuando el pH fue de 4.0; en cambio cuando el pH fue de 6.5 se observó el mismo descenso, pero en un lapso mayor (30 días). Los mismos parámetros de sobrevivencia para *Lb. acidophilus* CH5 fueron de 3 días a un pH de 4.0 y más de 30 días a un pH de 6.6. También *B. bifidum* es muy sensible a pH bajos

y la disminución de células viables en 2 ciclos logarítmicos se observó después de 4 días a pH 4.3 y en más de 15 días a un pH de 6.6.

Un segundo factor presente en el estómago y que influye sobre la bacteria es la pepsina. Esta enzima proteolítica, puede hidrolizar las proteínas de la capa exterior de la célula bacteriana.

Otro factor adverso es la bilis, la cual actúa como emulsificante de las grasas. Como resultado, la acción combinada de todos estos factores puede reducir significativamente la viabilidad y las propiedades adhesivas de las BAL durante su paso a través del tracto gastrointestinal (Olejnik y col., 2005).

Para una aplicación exitosa en alimentos, los probióticos deben sobrevivir el procesamiento del alimento, el almacenamiento durante la maduración del producto y la vida de anaquel (Stanton y col., 2003a).

Se recomienda que el cultivo probiótico debe estar presente, en el producto, en un número mínimo de 10^7 unidades formadoras de colonia (ufc/mL) y algunos autores han sugerido cantidades mayores (Ishibashi y Shimamura, 1993; Lee y Salminen, 1995). Otros autores han sugerido que para obtener los efectos terapéuticos deseados de los probióticos, en el yogurt deben encontrarse al menos 10^8 unidades formadoras de colonias (ufc/mL). Se indican estos altos números para compensar la pérdida durante su paso por el estómago e intestino, de ahí que se busque una cuenta mínima de bacterias probióticas de 10^6 ufc/g en el producto, en la fecha de su caducidad (Kurmán y Rasic, 1991).

Por otra parte, los productos alimenticios con probióticos deben consumirse regularmente en cantidad suficiente para liberar la dosis requerida de bacterias vivas en el tracto gastrointestinal, teniendo en cuenta la pérdida que típicamente sucede durante el paso por el tracto gástrico. Como consecuencia algunos de los temas

tecnológicos relacionados al desarrollo de alimentos que contengan estas bacterias, en número suficiente, está enfocado totalmente a que la vida de anaquel se prolongue, así como a la manera de estabilizarlos después de la ingestión (Ross y col., 2005).

Muchos estudios han demostrado que estos cultivos pueden protegerse significativamente mediante la encapsulación (Ross y col., 2005)

En muchos casos, los productos resultantes no sólo mejoran la viabilidad de los probióticos sino que también pueden ser considerados como “simbióticos” por la presencia de probióticos y prebióticos (Roberfroid, 1998).

La encapsulación como un medio de proteger células vivas del calor y humedad extremas, tales como las experimentadas durante el procesamiento y almacenamiento, es una técnica cuyo uso se ha incrementado en la industria alimenticia (O’Riordan y col., 2001). La retención física de las células en la matriz de encapsulación, facilita su aislamiento de la exposición directa a factores adversos. Esta separación ocurre hasta que se desea la liberación del ingrediente activo.

Se han reportado varios métodos de encapsulación de probióticos, entre los cuales se encuentran el secado por aspersión, la extrusión, la emulsión y la separación de fases (Siuta-Cruce y Goulet, 2001; Kailasapathy, 2002).

1.4. Microencapsulación

Un aspecto importante relacionado con el uso de probióticos como ingrediente en alimentos funcionales es la dosis, o la concentración de células vivas que serán liberadas. Dado que se han reportado velocidades de mortalidad tan altas como 90-99 % cuando los probióticos no protegidos son expuestos a las condiciones ácidas del estómago, así como a las sales biliares, es una práctica común en el campo de

los suplementos alimenticios recomendar la ingesta de 1-10 billones de células vivas para asegurar al menos 100 millones (10^8) de células vivas por dosis en el tracto gastrointestinal.

Los productos con probióticos encapsulados podrían superar las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y ofrecer mejores resultados que los probióticos no protegidos (Siuta y Goulet, 2001).

Los cultivos probióticos para aplicación en alimentos se suministran frecuentemente en forma congelada, en forma de polvo seco, como polvo liofilizado y concentrados congelados, en tanto que se ha puesto menos atención al secado por aspersión como un medio para la preparación de cultivos de probióticos.

Estudios recientes han demostrado el potencial de esta propuesta para algunas cepas incluyendo cultivos de *Lb. acidophilus* (Espina y Packard, 1979; Prajapati y col., 1987), *Lb. paracasei* (Gardiner y col., 2000; Desmond y col., 2001, 2002), *Lb. bulgaricus* (Texeira y col., 1995), *Lb. helveticus* (Johnson y Etzel, 1995), *Lb. rhamnosus* GG (Corcoran y col., 2004) y otros probióticos incluyendo *Bifidobacterium* spp (O'Riordan y col., 2001; Lian y col., 2002; Simpson y col., 2005).

La microencapsulación es definida como una tecnología de empaquetar sólidos, líquidos o materiales gaseosos en miniatura. Se obtienen cápsulas selladas que pueden liberar su contenido a velocidades controladas bajo condiciones específicas (Shahidi y Han, 1993). Los empaques en miniatura llamados "microcápsulas" pueden estar en el intervalo de tamaño de 0.2 y 5000 μm teniendo una variedad de formas diferentes, dependiendo de los materiales y métodos usados para prepararlos.

La industria de alimentos y farmacéutica, aplica la microencapsulación por un gran número de razones (Shahidi y Han, 1993), entre las que se citan:

- Reducir la reactividad del núcleo en relación con el ambiente exterior (luz, oxígeno, agua, solventes)
- Disminuir la evaporación o velocidad de transferencia del material del núcleo hacia el ambiente.
- Promover un manejo más fácil del material del núcleo como prevenir apelmazamientos y convertir un líquido en una forma sólida.
- Controlar la liberación del material del núcleo.
- Alterar las propiedades de superficie del material
- Enmascarar o preservar sabores y aromas.

El contenido de las microcápsulas puede liberarse por diversos mecanismos (Karel y Langer, 1988; Jackson y Lee, 1991; Reineccius, 1995a): mecánicos, por ejemplo mediante la masticación (liberación física), por solubilización, por cambios en el pH, por acción enzimática y por liberación térmica, todo ello en función del tipo de agente encapsulante y el sistema en el que va a utilizarse el producto microencapsulado.

1.4.1 Secado por aspersión

El secado por aspersión se utiliza en una amplia gama de aplicaciones, desde productos farmacéuticos hasta alimentos y detergentes. Los materiales de la alimentación se encuentran por lo general en forma de una solución acuosa, capaz de ser dispersada en forma de rocío. El fluido es atomizado o dispersado como gotitas finas que se ponen en contacto inmediato con un flujo de aire caliente. Estas gotitas proporcionan una extensa área superficial para la transferencia de calor y de masa. Por lo tanto, el enfriamiento por evaporación y el tiempo de residencia corto,

mantienen una temperatura relativamente baja en el producto. Esto hace al secado por aspersión ideal para secar sustancias termo-lábiles como enzimas, plasma sanguíneo y proteínas de la leche (Sharma y col., 2003).

La microencapsulación mediante secado por aspersión es el sistema más común usado en la industria de alimentos. El proceso es económico y flexible además produce partículas de buena calidad.

Su principio es la producción de un polvo seco por medio de la atomización de una emulsión o una dispersión, en una corriente de aire caliente en una cámara de secado. El agua se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente en la emulsión quede atrapado dentro de una película de material encapsulante (Dziezak, 1988; Heath, 1985).

El paso inicial y crítico en la encapsulación de una sustancia por este método, es seleccionar el material encapsulante adecuado, el cual debe tener las siguientes características:

- Buenas propiedades reológicas a alta concentración y facilidad de manipulación durante el proceso de encapsulación.
- Capacidad de formar películas
- Habilidad para dispersar o emulsificar el material activo y estabilizar la emulsión producida
- No reaccionar con el material que será encapsulado, tanto durante el proceso, como en el almacenamiento.
- Liberación completa del solvente u otros materiales que serán utilizados durante el proceso de encapsulación.
- Capacidad para proporcionar máxima protección al material activo contra condiciones ambientales

- Disponibilidad y suministro estable

La utilización de materiales biopoliméricos ha surgido como una alternativa para el desarrollo de nuevas formas de recubrimiento para una gran variedad de sustratos, entre ellos los probióticos.

1.5. Cubiertas entéricas

Durante la última década en la industria farmacéutica ha habido un interés creciente en desarrollar formulaciones que realicen la liberación del principio activo en sitios específicos del colon (Bussemer y col., 2001).

Liberar diversas sustancias en el colon, constituye una ventaja y una necesidad ya que proporciona una mayor efectividad en el tratamiento de enfermedades relacionadas con éste, tales como síndrome de colon irritable, cáncer de colon (Ciftci, 1996), enfermedades inflamatorias del intestino, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, las cuales son tratadas con glucocorticoides y sulfalasina (Watts e Illum, 1997).

Sistemas de absorción sistémica en la región del colon, ofrecen posibilidades interesantes para el tratamiento de enfermedades susceptibles al ritmo diurno tales como asma y la artritis (Yang y col., 2002).

El colon, como un sitio para la liberación de principios activos, ofrece ventajas tales como: un pH cercano al neutro, un tiempo de tránsito mucho más largo, relativamente baja actividad enzimática proteolítica, y capacidad de absorción mucho más grande (Kosaraju, 2005).

1.5.1. Sistemas de liberación en el colon

Entre los sistemas que se han desarrollado para la liberación específica de fármacos, proteínas y péptidos en el colon, se encuentran los polímeros sensibles al pH, los sistemas de liberación dependientes del tiempo, y los sistemas de liberación con base en la degradación microbiológica. La mayoría de estos sistemas se han basado en mecanismos dependientes del pH y del tiempo y con una limitada evaluación *in Vivo*.

Los polímeros descritos como pH-dependientes, son insolubles a pH bajos, pero su solubilidad se incrementa conforme el pH aumenta, sin embargo existen varios problemas en este sistema ya que el pH del tracto gastrointestinal varía entre los individuos y aún en la misma persona (Kinet y col., 1998).

El pH del tracto gastrointestinal se ve afectado por la dieta y por la presencia de enfermedades. Por ejemplo, durante estados agudos de una enfermedad inflamatoria, se ha encontrado que el pH es significativamente más bajo que el normal (Leopold y Eikener, 2000).

Aunque un polímero pH dependiente, puede proteger una formulación en el estómago y en el intestino delgado proximal, puede empezarse a disolver en la parte última del intestino delgado, por lo que la especificidad de la formulación ya no se cumple y el efecto terapéutico se reduce.

Los sistemas de liberación dependientes del tiempo, se basan en la estrategia de evitar la liberación de la droga hasta que entra en el colon. El principio consiste en que el material de cobertura resista el pH del estómago y después liberar el principio activo o el fármaco, cuando ha transcurrido cierto tiempo después del vaciado gástrico (Fukui y col., 2001). El inconveniente de estos sistemas, es que existe una amplia variación en los tiempos de retención gástrica, además de que el tiempo de

tránsito a través del colon, es menor en pacientes que padecen enfermedades del colon que en pacientes normales (Watts e Illum, 1997).

1.5.1.1. Sistemas de liberación basados en la presencia de la microbiota del colon

El tracto gastrointestinal humano es la mayor puerta de entrada para medicamentos en el humano, consiste de un complejo ecosistema con microorganismos aerobios y anaerobios. El número de microorganismos se va incrementando gradualmente, conforme se va descendiendo a lo largo del intestino delgado, encontrando su concentración máxima en la válvula ileocecal (Chourasia y Jain, 2004).

El ambiente en el colon es anaerobio por naturaleza. Los requerimientos de energía de la flora bacterial colónica para mantener su función celular, se deriva de la fermentación de varios sustratos que no son digeridos en el intestino delgado. Estos sustratos incluyen di- y tri-sacáridos y residuos de polisacáridos parcialmente digeridos, tales como almidón y polisacáridos provenientes de fuentes endógenas, como los mucopolisacáridos (Cummings y Englyst, 1987). Además de estos mucopolisacáridos, otros sustratos para la fermentación, son las fibras dietéticas que incluyen a la celulosa, la hemicelulosa y las pectinas (Rubinstein, 1990).

Los sistemas de liberación en el colon que se basan en el uso de polisacáridos, ofrecen superioridad sobre otros sistemas. Los polisacáridos conservan su integridad y evitan la liberación de la droga durante su paso a través del tracto gastrointestinal, pero cuando entran en contacto con el fluido del colon sufren la acción fermentadora de los microorganismos y como consecuencia, la droga es liberada (Swift, 1992; Hergenrother y col., 1992; Park y col., 1993).

Aunque aun no se encuentra completamente comercializado, parece hoy en día, que la degradación o rompimiento de polímeros biodegradables por la flora bacteriana del colon, es una manera bastante atractiva de liberación en el colón que es independiente del tiempo de tránsito gastrointestinal (Yang y col., 2002; Rubinstein, 2000).

1.5.1.2. Sistemas de liberación en el colon basados en polisacáridos

Los polisacáridos que han sido estudiados para utilizarse en sistemas de liberación en el colon, se encuentran de manera natural en las plantas (pectina, goma guar, inulina, etc.), en los animales (quitosano, sulfato de condroitina), en las algas (alginato), o pueden ser productos de origen microbiano (dextranos). Los polisacáridos son descompuestos por la microbiota colónica, a sacáridos. La mayoría de los sistemas basados en polisacáridos, protegen el material bioactivo de las condiciones adversas del tracto gastrointestinal superior.

Las principales especies sacarolíticas que intervienen en la biodegradación de los polisacáridos, son Bifidobacterias, Bacteroides y Lactobacilos.

Entre los polisacáridos que más se han aplicado en sistemas de liberación en el colon se encuentran los siguientes:

Pectina

La pectina es un complejo grupo de polisacáridos estructurales que se encuentra ampliamente en las plantas. La mayor fuente comercial de pectina es la cáscara de

los cítricos y la cáscara de manzana. Está compuesta principalmente de polímeros de ácido D-galacturónico.

Un aspecto que diferencia a las sustancias pécticas, es el grado de esterificación (DE), el cual tiene gran influencia en su solubilidad y sus propiedades de gelificación.

En experimentos *in Vitro*, se demostró que la pectina de alto metoxilo, cuando se aplica como una cobertura por compresión, protege el núcleo de la tableta en condiciones que simulan el ambiente gastrointestinal y también, que fue susceptible al ataque enzimático *in Vivo*. Las tabletas cubiertas con pectina, se desintegraron en el colon, indicando la especificidad por el sitio y el potencial de la pectina para utilizarse como un sistema de liberación en el colon (Ashford y col., 1993).

El pectinato de calcio que es una sal insoluble de pectina fue utilizada para liberación en el colon de indometacin, por Rubinstein y col., (1993). Las tabletas de pectina se analizaron mediante su degradación en presencia de Pectinex 3XL una mezcla de enzimas pectinolíticas y en presencia de la bacteria colónica *Bacteroids ovatus*. La liberación del indometacin se incrementó significativamente en presencia de las enzimas y el microorganismo, mostrando que el pectinato de calcio, al igual que la pectina, puede ser degradado por las enzimas pectinolíticas que se encuentran en el colon y permanece intacto durante el tracto gastrointestinal superior.

Turkoglu y Ugurlu (2002) prepararon tabletas comprimidas, cubiertas con pectina y HPMC (hidroxi propil metil celulosa). Realizaron estudio de la disolución, erosión y degradación de las tabletas a pH 1.2 y 6.8, usando una enzima pectinolítica. Encontraron que la pectina por sí sola, no fue suficiente para proteger el núcleo de las tabletas y se requirió de la adición de HPMC para controlar la solubilidad de la

pectina. La concentración óptima de HPMC fue de 20%. Después, bajo la influencia de la pectinasa el sistema se degradó y liberó el compuesto activo, en el colon.

La combinación de pectina con etil-celulosa (EC), quitosano o HPMC, se ha utilizado exitosamente para lograr la liberación en el colon. La combinación de pectina y EC se ha utilizado para estudiar la liberación de paracetamol en el colon (Wakerly, y col., 1997; Macleod y col., 1997). El mecanismo de liberación del paracetamol a través de la cubierta, fue complejo y dependió de la naturaleza y características de la película de mezcla así como de la composición del medio de disolución. El perfil de liberación de la droga fue compatible con un mecanismo que envuelve la formación de canales en la película causado por la disolución de la pectina. La formación de canales se vio acelerado en la mayoría de los casos, por la presencia de enzimas pectinolíticas, mostrando que la pectina es susceptible al ataque enzimático.

Derivados de celulosa

La celulosa está compuesta de unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos β -1,4. La celulosa nativa es insoluble en agua, sin embargo, la solubilidad en agua se puede incrementar tratando la celulosa con álcalis para hinchar la estructura, seguida por una reacción con ácido cloroacético, cloruro de metilo u óxido de propileno para producir carboximetilcelulosa (CMC), metilcelulosa (MC), hidroxipropil metil celulosa (HPMC) o hidroxipropil celulosa (HPC). Estos derivados de celulosa son buenos formadores de películas, flexibles, resistentes y transparentes. Las películas son solubles en agua y resistentes a grasas y aceites. La MC, HPC y HPMC se venden comercialmente en forma de polvo o en forma

granular variando en peso molecular y en el grado de sustitución. Son solubles en agua fría pero no en agua caliente.

Siendo la MC la menos hidrofílica de los derivados de celulosa, produce películas que tienen relativamente una permeabilidad baja al vapor de agua. La HPC muestra la propiedad única de ser una resina termo-plástica, de ahí su propiedad de poder ser extrudida o moldeada por inyección. Además, por las buenas características de sus películas, ha sido utilizada para retardar la absorción de humedad y el desarrollo de rancidez oxidativa en nueces, y para retardar la contaminación y la absorción de humedad en dulces.

Las características de formar películas de la MC y HPMC durante el calentamiento, proporciona una película efectiva que puede reducir la absorción de aceite en productos alimenticios durante el freído.

Películas bi-capa compuestas de HPMC y lípidos sólidos, tales como cera de abeja, parafina, aceite de palma hidrogenado o ácido esteárico, presentaron permeabilidades al vapor de agua más bajas que el polietileno de baja densidad (Myrna y Nisperos-Carriedo, 2002).

En la CMC, para que sea soluble, se requiere de un grado de sustitución mínimo de 0.4. El grado de sustitución más comúnmente utilizado en alimentos es de 0.7.

Álvarez y col., (2004) elaboraron tabletas mediante compresión mezclando hidroxietil celulosa (HEC), con etil celulosa (EC) o con celulosa microcristalina (MCC); se usó además, Eudagrit S100, un polímero de ácido metacrílico soluble en pH 7. Las formulaciones con el contenido más alto de HEC mostraron una liberación más rápida de la droga que aquellas con un contenido más alto del polímero inerte (EC) y las combinaciones MCC-HEC fueron más efectivas que las combinaciones de EC-HEC.

En otro estudio, la HPMC se mezcló con pectina para formar tabletas conteniendo senósidos. Se estudió la disolución de la droga y la erosión de las tabletas a pH 1.2 y 7.4, usando una enzima pectinolítica. Se encontró que la pectina sola, como en un caso ya descrito antes, no fue suficiente para proteger el núcleo de las tabletas. Los ensayos de liberación *in Vitro* mostraron que la formulación conteniendo pectina: HPMC en proporción 80:20 fue óptima para una liberación de la droga en el colon (Momin y Pundarikakshudu, 2007).

Los polímeros entéricos generalmente usados en la industria farmacéutica, incluyen derivados de celulosa, derivados vinílicos y acrílicos; estos polímeros muestran resistencia en el fluido gástrico, siendo solubles o permeables a los fluidos intestinales. Dentro de estos grupos los materiales más ampliamente utilizados son la celulosa acetato ftalato (CAP), polivinil acetato ftalato (PVAP), varios derivados de la HPMC, hidroxipropil metilcelulosa ftalato (HPMCP) y hidroxipropil metilcelulosa acetato succinato (HPMCAS).

Se utilizan también derivados de copolímeros de metil metacrilato y etil acrilato los cuales se encuentran disponibles en forma comercial con los nombres de Eudagrit®, Eudagrit L 30 D-55, Eudagrit FS 30D y Acryl-Eze®.

Almidón.

El almidón de maíz nativo consiste de aproximadamente 25 % de amilosa y 75 % de amilopectina. La amilosa es una cadena lineal de residuos de D-glucosa unidos a través de enlaces α -1,4 glucosídicos, la amilopectina es una molécula ramificada que consiste de unidades de glucosa conectadas por enlaces α -1,4 y α -1,6.

Se producen variedades mutantes de maíz, las cuales contienen arriba de 85 % de amilosa; estos almidones con alto contenido de amilosa forman películas fuertes, resistentes y más flexibles, el problema es que este almidón es difícil de dispersar en agua y retrograda o puede gelificar muy rápidamente, una vez que comienza el enfriamiento de la pasta.

Estos almidones que se encuentran presentes de manera natural en la dieta, tienen la ventaja de ser seguros, no tóxicos y de fácil disponibilidad.

El almidón se ha evaluado como sistema de liberación en el colon en cápsulas con cubierta entérica y se ha demostrado que existen varias formas de almidón que resisten el paso a través del estómago y del intestino delgado (Englyst y Cummings 1985, 1986; Englyst, 1987).

La amilosa se ha utilizado en la elaboración de películas que son biodegradadas por las bacterias del colon cuando se mezcla con EC y con un tratamiento térmico adicional, la amilosa forma una cubierta que es resistente a los ácidos gástricos y a las enzimas pancreáticas, pero la droga es liberada cuando se simulan condiciones del colon y se incorporan bacterias intestinales (Milojevic y col., 1996b).

Siew y col., (2000) evaluaron mezclas de amilosa con EC para la liberación de drogas en el colon; la velocidad de liberación de la droga a partir de las cubiertas, fue gobernada por la concentración de amilosa y EC. La velocidad de liberación de la droga fue inversamente proporcional al espesor de la cubierta. También se demostró, que estas películas fueron degradadas por las enzimas bacterianas en condiciones simuladas del colon.

Se han elaborado cubiertas a partir de mezclas de pectina con almidón de maíz de alta amilosa (HACS); se evaluó *in Vitro* la estabilidad de las películas para la disolución en condiciones de pH del estómago e intestino y en condiciones de

digestión enzimática. Se encontró que la disolución de las cubiertas disminuyó conforme se aumentó la concentración de HACS en ambas condiciones del estómago y del intestino. Las cubiertas de HACS mostraron también una alta resistencia a la amilólisis, con una degradación < 35 % después de 3 h de incubación en solución de pancreatina, quedando demostrado el potencial de estas cubiertas para sistemas de liberación en el colon (Dimantov y col., 2004).

Gelatina.

La gelatina se obtiene de la hidrólisis parcial del colágeno contenido en la piel, tejido conectivo y huesos de los animales. El colágeno es una proteína fibrosa que se encuentra en todo el reino animal. En términos de cantidad, es el compuesto más importante del tejido conectivo. Por lo tanto es la proteína más extendida en el reino animal y el mayor elemento estructural de los organismos multicelulares.

En la actualidad la gelatina se usa con múltiples propósitos: en la industria de alimentos (confitería, productos lácteos, etc.), en la industria farmacéutica (cápsulas) y en varios procesos industriales (fotografía, etc.). Comercialmente, la gelatina puede dividirse en dos grupos: Gelatina tipo A que se obtiene a partir de un pretratamiento ácido y la gelatina B obtenida mediante un pretratamiento básico (Poppe, 1997). Las principales diferencias entre estos dos tipos de gelatina se muestran en el Cuadro 1.6

Cuadro 1.6 Características de la gelatina tipo A y tipo B

Tipo	A	B
Materia prima	Piel de cerdo, huesos	Huesos, piel
Pre-tratamiento	Ácido	Básico
Punto isoeléctrico	7-9.4	4.5-5.3

La gelatina consiste de varias cadenas de polipéptidos, las cuales se encuentran libres o unidas una a la otra. Es una macromolécula polidispersa cuya masa molecular se encuentra entre 10^4 y 10^6 Da.

La distribución molecular determinada por HPLC, depende de la materia prima y del proceso de extracción usado; es posible identificar monómeros (cadenas α , con masa molecular de aproximadamente 100 000 Da), dímeros (cadenas β) y trímeros (cadenas δ).

La gelatina se caracteriza por su pH y punto isoeléctrico y la viscosidad de la gelatina es fuertemente dependiente de estos valores.

La solubilidad de la gelatina en agua es alta, especialmente en concentraciones menores del 10 %, absorbiendo entre 5 y 10 veces su volumen en agua. Cuando se calienta entre 50-60 °C la gelatina se hincha disolviéndose para dar un “sol” el cual se convierte en un gel cuando se enfría.

A diferencia de la mayoría de los hidrocoloides polisacáridos, la gelificación de esta proteína es independiente del pH y no requiere la presencia de otros reactivos (cationes, carbohidratos, etc.).

Similar a otros agentes gelificantes, el mecanismo de gelificación de la gelatina puede explicarse mediante la formación de una red tridimensional. Las uniones entre macromoléculas son principalmente debidas a interacciones electrostáticas o mediante enlaces de hidrógeno. Sus geles poseen propiedades mecánicas sobresalientes.

En la industria farmacéutica, se utiliza para la fabricación de cápsulas de gelatina suave, y generalmente contienen el medicamento disuelto o dispersado en un aceite o en un líquido hidrofílico. La flexibilidad de las cápsulas se debe a la presencia de

plastificantes y a la humedad residual de la cápsula, lo que hace a estas cápsulas, un sistema más dinámico que las cápsulas convencionales.

Existen sin embargo, algunos inconvenientes como que la humedad atmosférica puede permear al interior, la droga o el líquido de relleno puede migrar hacia la pared de la cápsula, mientras que el plastificante o el agua residual en la pared de gelatina, puede potencialmente migrar hacia el interior de la cápsula. Para mejorar las características de las cubiertas de gelatina se ha propuesto recubrir la cápsula con polímeros sintéticos como lo reportan Felton y col., (1995) quienes evaluaron el efecto de dos tipos de plastificantes, trietil citrato (TEC) y tributil citrato (TBC), sobre las propiedades físicas y entéricas de cápsulas de gelatina cubiertas con Eudagrit L 30 D-55; encontraron que la combinación de TEC y TBC proporcionó un efecto plastificante adecuado para la cubierta acrílica sin importar el líquido de relleno de la cápsula de gelatina.

Aislado de proteína de suero de leche (PASL)

Las proteínas de suero de leche han recibido un interés creciente, principalmente con el objeto de explotar sus atributos funcionales y nutricionales (Banerjee y Chen, 1995; Fang y col., 2002; Pérez-Gago y Krochta, 2002).

El suero de leche es el mayor subproducto de la industria de manufactura de quesos con un valor estimado de 200 000 toneladas métricas producido en todo el mundo en 1999 (USDA 1999). Grandes volúmenes de este fluido son desechados anualmente, creando problemas ambientales si no son manejados adecuadamente (Kinsella y Whitehead, 1989; Banerjee y Chen, 1995). La elaboración de productos con valor

agregado tales como películas comestibles y coberturas a base de suero de leche, son una alternativa a este problema.

La proteína de suero de leche da películas transparentes, insípidas y flexibles, con muy buena resistencia a la transferencia del oxígeno, a los aromas y lípidos, a bajas humedades (Miller y Krochta, 1997).

Las proteínas nativas de suero lácteo, son proteínas globulares que contienen la mayoría de sus grupos hidrofóbicos y sulfihidrido en el interior de la molécula. La formación de películas de proteína de suero de leche involucra principalmente la desnaturalización térmica de las proteínas en soluciones acuosas. Esta condición favorece la formación de películas con estructura consistente, y por estudios de difracción de rayos X se sabe que estas proteínas se desnaturalizan irreversiblemente (Lent y col., 1998).

Soluciones con baja concentración de proteína aislada de suero lácteo (menores a 5 % de WPI (w/w)) mostraron capacidad para formar buenas películas (Pérez-Gago y col., 1999).

La elaboración de películas a base de proteína aislada de suero de leche en combinación con algunos polisacáridos (MC, alginato, pectina o carragenina), permite obtener una permeabilidad al vapor de agua más baja y mejores propiedades mecánicas tales como fuerza de tensión (TS) y elongación (E) (Parris y col., 1995; Coughlan y col., 2004; Erdohan y Turhan, 2005), comparadas con las películas preparadas a partir sólo de polisacáridos o sólo proteína de suero lácteo (Debeaufort y col., 1993; Pérez-Gago y Krochta, 2002).

1.5.1.3 Uso de cubiertas entéricas en la industria de alimentos

La liberación en el colon, de ingredientes bioactivos sensibles, es una práctica común en la industria farmacéutica. El interés por este enfoque, está creciendo en la industria de los Alimentos.

La realización de formulaciones confiables de cubiertas entéricas grado alimenticio, que posean estabilidad en el ambiente del estómago e intestino, con la capacidad de liberar el ingrediente activo en el colon, constituye en la actualidad, un reto para la industria Alimentaria.

En los últimos años el mercado de los alimentos funcionales ha tenido un incremento de 15-20 % por año (Shah, 2001), éstos incluyen la adición en los alimentos, de compuestos fitoquímicos, péptidos bioactivos, fibra dietética, ácidos grasos poliinsaturados, probióticos y prebióticos, muchos de los cuales requieren protegerse de diversos factores durante su procesamiento y almacenamiento y después de ser ingeridos, deben resistir las condiciones adversas del tracto gastrointestinal para liberarse específicamente en el colon.

Las bacterias probióticas que son el objeto de estudio de este trabajo de investigación, se han protegido por encapsulación, mediante varias técnicas como ya se ha mencionado. Chen y col., (2006) encapsularon *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *B. longum* y *B. bifidum* mediante el proceso de extrusión utilizando diferentes proporciones de alginato, péptidos, FOS e isomaltooligosacáridos (IMO). Encontraron que la combinación óptima para la encapsulación de probióticos, fue la que contenía 3 % de alginato mezclado con 1 % de péptidos, y 3 % de FOS, sin la adición de IMO.

Se investigaron las características de liberación de *Lb. casei* Shirota (LCS) en cápsulas hechas por extrusión de alginato-almidón recubiertas con quitosano, en diferentes regiones del contenido gastrointestinal (GI) porcino *ex Vivo*. Los resultados mostraron casi una liberación completa de LCS provenientes de las cápsulas, después de 8 h de incubación en el contenido del íleon, en tanto que se necesitaron cerca de 12 h para la liberación en el colon, de las bacterias encapsuladas. Hubo una liberación parcial de LCS encapsulados, cuando se incubó en el contenido duodenal y del yeyuno, en tanto que no hubo una liberación significativa de la bacteria cuando se mantuvo en el contenido gástrico aun después de 24 h de incubación (Iyer y col., 2005).

Con respecto a la técnica de encapsulación mediante secado por aspersion se ha reportado la encapsulación de *Lb. paracasei* NFBC 338 utilizando goma acacia, obteniéndose que la sobrevivencia de la bacterias encapsuladas expuestas a condiciones de almacenamiento de 4-30 °C durante 4 semanas, fue notablemente mayor que la de las bacterias libres. Además, la sobrevivencia del probiótico encapsulado con goma arábica fue 100 veces más alta cuando se expuso al jugo gástrico porcino durante 120 minutos, en comparación con las bacterias no encapsuladas (Desmond y col., 2002). Otros investigadores encapsularon también mediante secado por aspersion varias cepas de bifidobacterias utilizando gelatina, goma arábica y almidón soluble, reportando que la sobrevivencia de las bifidobacterias varía en relación con la cepa utilizada y con gran dependencia del material de pared utilizado. Dentro de los organismos evaluados *B. longum* B6 presentó la menor sensibilidad al secado por aspersion y mostró la más alta sobrevivencia 82.6 %, en tanto que los materiales de pared que promovieron una mayor sobrevivencia, fueron la goma arábica y la gelatina al 10 % (Lian y col., 2002).

Fávaro-Trindade y Grosso (2002), encapsularon *Lb. acidophilus* (La-05) mediante secado por aspersión, utilizando celulosa acetato ftalato como material encapsulante. Informaron que las bacterias microencapsuladas resistieron pH de 1 y 2 durante 2 horas en tanto que en las bacterias libres fueron totalmente destruidas después de 1 h de incubación en esas condiciones.

Por todo lo anteriormente expuesto, es claro que existe un campo muy amplio para la investigación de materiales biopoliméricos que puedan funcionar como cubiertas entéricas para la liberación específica de probióticos en el colon o para la encapsulación de ingredientes funcionales para su aplicación en alimentos.

La mayoría de los trabajos revisados en esta investigación se centran en la utilización de pectina, almidón, alginato, goma arábica y en algunos derivados de celulosa principalmente EC, HPMC, MC y celulosa microcristalina o en combinaciones de éstos con polímeros sintéticos, pocos reportes existen sobre el uso de CMC como cubierta entérica o sobre combinaciones de proteínas y polisacáridos para este mismo propósito.

1.6 Justificación

El reclamo de la incorporación de bacterias tales como *Lb. acidophilus* y *Bifidobacterium* spp. en la dieta del ser humano, ha ido cada vez en aumento debido a sus variados efectos benéficos en la salud del consumidor.

Los alimentos que son adicionados con probióticos, deben contener cepas específicas y mantener un nivel mínimo de células viables durante la vida de anaquel del producto. La viabilidad y la estabilidad de los probióticos representa para los fabricantes, diversos retos tecnológicos por lo cual en la actualidad se están desarrollando e investigando nuevos procesos de manufactura y tecnologías en la formulación y elaboración de los alimentos, y en la selección de las cepas probióticas.

Los probióticos también deben de sobrevivir a los factores de estrés del tracto gastrointestinal y mantener su funcionalidad en el huésped.

Investigaciones recientes sobre formulaciones novedosas y tecnologías de microencapsulación aprovechan a los biopolímeros como materiales de barrera y sistemas de liberación entéricas.

El secado por aspersión proporciona una alta velocidad de producción y bajos costos de operación, sin embargo los microorganismos y sustancias están sujetas a daños por calentamiento y deshidratación durante este proceso.

Por lo anterior resulta interesante el planteamiento de caracterizar diversos biopolímeros para seleccionar los que presenten mejores perspectivas para usarse como material encapsulante y además protejan al probiótico del proceso de secado y durante su paso por el tracto gastrointestinal, y aumentar así la probabilidad de que la bacteria sea liberada en cantidad suficiente y viable en el sitio específico que se requiere.

1.7 Hipótesis

La selección adecuada de los materiales encapsulantes proporcionará altos rendimientos de encapsulación mediante secado por aspersión, y mantendrá viable a *Lb. acidophilus* y en número suficiente después de someter las microcápsulas a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

1.8 Objetivos

Objetivo general

Seleccionar las mezclas polisacáridos/proteína, con mayor potencial de cubierta entérica que mantengan la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* durante el secado por aspersión, y después de someter las microcápsulas a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

Objetivos particulares

- Evaluar algunas propiedades fisicoquímicas de varios biopolímeros con potencial para ser usados como cubiertas entéricas.
- Seleccionar los materiales con mejores propiedades para ser usados como materiales de pared de las microcápsulas.
- Evaluar el efecto de la combinación entre proteínas y polisacáridos, sobre la resistencia en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI) y el Índice de Hinchamiento.
- Seleccionar las mejores mezclas tomando en consideración sus características en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.
- Encapsular *Lb. acidophilus* con las mezclas seleccionadas mediante secado por aspersión.
- Evaluar el rendimiento de encapsulación, así como la supervivencia de las bacterias probióticas, en condiciones simuladas del TGI.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Los materiales utilizados en este trabajo fueron: Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), (Pharmacoat 606G 2910, 6 cps, USP/NF. Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. Tokyo, Japón, distribuido por Nutrer S.A. de C.V., México); Carboximetilcelulosa sódica (CMC), (CMC-7LF PH Aqualon®Cellulose gum, distribuido por Hércules de México S.A. de C.V. México); Hidroxipropilcelulosa (HPC) (Klucel-LS®Hydroxypropylcellulose, Hércules de México S.A. de C.V. México); Pectina Cítrica Rápida (P) (Central de Drogas S.A. de C.V., México); Almidón modificado de maíz waxy (A) Thermoflo Aranal; Metil celulosa (MC) (Methocel A15, Colorcon de México S. de R.L. de C.V) ; Proteína aislada de suero de leche Grado A (Proteínas 95-97.7 %) (BiPro, Davisco Foods International Inc. México); Gelatina de cerdo tipo A (Gelita de México, S.A. de C.V. México). Cultivo puro de bacteria probiótica *Lactobacillus acidophilus* Florafit NCFM (DANISCO).

2.2. Métodos

2.2.1. Difusividad térmica, microestructura y cristalinidad de películas de polisacáridos

Formación de las películas

Se prepararon dispersiones acuosas al 3% (p/v) de los diferentes materiales biopoliméricos, utilizando un mezclador caframo (IKA Labortechnik RW 20.nS1, IKA

Works, Malasia) a 3,000 rpm de acuerdo con el cuadro 2.1. Las dispersiones se desgasificaron con vacío, cuidando de no disminuir la temperatura, sobre todo en el caso de las dispersiones de almidón y de pectina.

Para formar las películas, en todos los casos se vació la misma cantidad de dispersión (20 mL) en una placa de 15 cm x 15 cm, cubierta con una película hidrofóbica de teflón de 3.0 mm de espesor (Anker, 2002) y un aro de policloruro de vinilo de 11 cm de diámetro interno.

Se dejó secar a temperatura ambiente, aproximadamente 24 h, en una superficie nivelada. Una vez formadas, las películas se separaron de la placa y se almacenaron en bolsas de polietileno.

Cuadro 2.1. Condiciones para preparar las dispersiones de polisacáridos

Material	Temperatura de disolución (°C)	Tiempo de calentamiento (min)
A	83	50
MC	50	35
HPC	38	20
HPMC	Temperatura Ambiente	0
CMC	50	10
P	50	10

A= almidón, P=pectina, MC= Metil celulosa, CMC= Carboximetilcelulosa sódica, HPC= Hidroxipropilcelulosa, HPMC= Hidroxipropilmetilcelulosa

Determinación del espesor de las películas

Se midió el espesor de las películas con un micrómetro digital Mitutoyo Digimatic Indicator (Tokio, Japón) en cinco posiciones aleatorias en toda la película.

Evaluación de la difusividad térmica

La difusividad térmica de las películas se determinó mediante el método de celda fotoacústica abierta (CFA). Este método consiste en colocar la muestra en forma de membrana previamente opaca, lo cual se logra adhiriendo una lámina de aluminio en una de las caras de la película con un poco de pasta térmica. La película así dispuesta se coloca frontalmente a la entrada de un micrófono de electreto, con el objeto de formar una celda fotoacústica. Se usa un rayo de luz intermitente, de longitud de onda apropiada, para excitar la muestra.

La absorción de la luz por la muestra produce un calentamiento periódico en el interior de la celda, generando fluctuaciones de presión en el aire contenido entre la muestra y la membrana de electreto. Dichas fluctuaciones son detectadas por el micrófono de electreto y amplificadas con ayuda de un amplificador lock-in. Los resultados obtenidos dependen fuertemente de las propiedades térmicas (conductividad térmica y difusividad térmica) de la muestra (Marquezini, 1991).

Cabe señalar que cuando se llevan a cabo procesos de des-excitación no radiativa, pueden observarse diferentes mecanismos de generación de calor, tales como la difusión térmica, la flexión termo-elástica o la expansión térmica. Dependiendo de la frecuencia de modulación del haz de luz incidente, del espesor de la muestra y de las propiedades termomecánicas de la misma, uno o más de esos mecanismos pueden contribuir a la señal foto-acústica (Tomás y col, 2004).

Análisis estructural de la superficie de las películas mediante microscopia de fuerza atómica (MFA)

Se tomó una sección de la parte central y de la orilla de cada película y se fijó por medio de una cinta adhesiva de doble cara al portamuestras del microscopio.

Se usó un microscopio de fuerza atómica marca Digital, modelo CPR, en modo de contacto, con punta de nitruro de silicio, de longitud de 11 μm y un radio de curvatura de 5 nm. La frecuencia de barrido fue de 1 Hz. La fuerza aplicada entre la muestra y la punta fue de 10 nN. El cantilever usado tuvo una constante de resorte de 0.06 N/m.

Los datos resultantes de cada muestra se transformaron en una imagen en 3D y en una escala de color en forma de plano.

Las mediciones se tomaron a partir de varias áreas en la superficie de la película (20 μm X 20 μm) usando el modo de contacto y de tapping.

Mediante el software del equipo se determinaron los siguientes parámetros: rugosidad promedio (Rms) y la altura media (Hm).

Evaluación de la cristalinidad de las películas

Difracción de rayos X

Se utilizaron muestras en polvo de las películas deshidratadas a temperatura ambiente. Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron usando un equipo Siemens D5000 operando a 35 KV con una línea de radiación de Cu $K\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) y una densidad de corriente de 25 mA. Las muestras se registraron entre 5 y 40 grados (2θ). con una velocidad de 2.0 $^\circ/\text{min}$. La cristalinidad de las muestras se determinó dividiendo el área bajo la curva de los picos del difractograma entre el área total del difractograma (Martínez-Bustos y col., 2007).

2.2.2 Evaluación de la energía de activación

Dispersiones de biopolímeros y mezclas

Los biopolímeros HPC, A, HPMC, P, CMC y MC se dispersaron en agua en una concentración de 3% p/p; a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$), utilizando un peso total de solución de 10 g. Las dispersiones se almacenaron a 4°C durante 24 horas antes de ser utilizadas para minimizar el crecimiento de bacterias (Rodd y col., 2000) y al mismo tiempo tener una mejor hidratación del material.

Densidad de los biopolímeros

La densidad inicial de cada dispersión de biopolímero se determinó por triplicado con un densímetro digital Anton Paar modelo DMA 35 N (Antón Paar K.G., Graz, Austria) a $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Secado isotérmico de los biopolímeros y mezclas

Se utilizó un analizador Termogravimétrico de TA Instruments modelo TGA 2950 (New Castle, DE, EUA) para obtener las curvas de secado. De 10 a 25 mg de cada dispersión de biopolímero se colocó en el horno del equipo y se secaron las dispersiones a 50°C , 60°C , 70°C y 80°C hasta alcanzar la humedad en el equilibrio, usando aire como gas de purga, con una humedad relativa de 0.008 kg H_2O /kg aire seco, y una velocidad de flujo de $100\text{ cm}^3/\text{min}$ (Pérez-Alonso, 2004.)

Las tasas de precalentamiento para llevar las muestras de temperatura ambiente a la temperatura de operación, se variaron para minimizar la inercia térmica. De esta manera se logra llegar a la temperatura isotérmica en el menor tiempo posible minimizando la pérdida de masa al establecer las condiciones iniciales del experimento, para dar seguimiento al proceso de secado. Estas condiciones de operación se muestran en el cuadro 2.2.

Cuadro 2.2 Condiciones de operación del TGA para alcanzar el secado isotérmico.

Temperatura (°C)	Condición de prueba
50	Rampa 35°C/min-40°C Rampa 5°C/min-50°C Isoterma 50°C por 30 min
60	Rampa 40°C/min-50°C Rampa 5°C/min-60°C Isoterma 60°C por 30 min
70	Rampa 47°C/min-60°C Rampa 5°C/min-70°C Isoterma 70°C por 30 min
80	Rampa 54°C/min-70°C Rampa 5°C/min-80°C Isoterma 80°C por 30 min

Difusividad efectiva

Los coeficientes de difusividad efectiva (D_{eff}) fueron determinados mediante la resolución analítica de la ecuación de la segunda ley de Fick para coordenadas esféricas (Crank, 1975).

$$M = \frac{X - X_e}{X_o - X_e} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left[-n^2 \pi^2 D_{eff} \frac{t}{r_s^2} \right] \quad (2.1)$$

Donde M es la relación de humedad [adimensional], X el contenido de humedad al tiempo t [kg H₂O/kg sólido seco], X_o y X_e son el contenido de humedad inicial y en el equilibrio [kg H₂O/kg sólido seco], respectivamente, y r_s es el radio de la gota del biopolímero.

Energía de Activación

La energía de activación (E_a) para el proceso difusivo del proceso de secado isotérmico de biopolímeros se determina a partir de los D_{eff} para cada tratamiento de biopolímero, el cual es dependiente de la temperatura y sigue una relación tipo Arrhenius (Pérez-Alonso y col., 2003).

El procedimiento para determinar E_a se resume en los siguientes apartados:

1. Usar la siguiente relación tipo Arrhenius:

$$D_{eff} = D_o \exp \left[-\frac{E_a}{RT} \right] \quad (2.2)$$

2. Linealizando la ecuación 2.2:

$$\ln D_{eff} = \ln D_o - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (2.3)$$

Graficando el $\ln(D_{eff})$ versus $1/T$, se forma una línea recta con pendiente $-E_a/R$, donde (D_{eff}) está en $[m^2/s]$, D_o es el factor de Arrhenius $[m^2/s]$, E_a está en $[kJ/mol]$, R es la constante universal de los gases (8.314×10^{-3} KJ/mol K), y T es la temperatura en la escala absoluta (K).

Conociendo la pendiente (E_a/R) se puede evaluar la energía de activación del proceso de secado isotérmico donde se empleó cada material biopolimérico en el intervalo de temperaturas estudiado (50 a 80 °C).

2.2.3. Evaluación de las propiedades mecánicas de las películas de biopolímeros

Para esta prueba se utilizó un Analizador de textura Modelo TA.TX2i Plus Stable Micro Systems, Godalming, U.K. de acuerdo al método ASTM D882-97 (1997).

Para la determinación de la fuerza de tensión y del porcentaje de elongación se usaron 10 réplicas de cada tipo de película y la medición se realizó uniaxialmente estirando la muestra a una velocidad de 5 mm/min hasta el punto de ruptura. Las dimensiones de cada película fueron 60 mm x 20 mm. El modulo de Young se calculó a partir de los datos obtenidos.

Las muestras de películas se seleccionaron libres de defectos y fueron acondicionadas a 53 % HR mediante una solución saturada de nitrato de magnesio durante 36 h a temperatura ambiente antes de la realización de la prueba (Fang y col., 2002)

2.2.4 Evaluación de las propiedades de disolución de los biopolímeros

Preparación de las películas

Se prepararon soluciones al 3 % (p/v) de los materiales de cobertura como se indica en el Cuadro 2.1. Las películas se prepararon depositando 0.3 g de cada dispersión en un portaobjeto (26x76 mm) puesto previamente a peso constante, las películas se sometieron a deshidratación a 40 °C durante toda la noche (15 h aproximadamente); los portaobjetos se conservaron en desecadores hasta su evaluación (Dimantov y col., 2004).

Disolución de las películas

El porcentaje de disolución de las películas, se determinó incubando los portaobjetos con la película de cada biopolímero en soluciones simulando el pH del estómago y del intestino. Los portaobjetos con la película se pesaron y se pusieron en recipientes de vidrio que contenían ácido clorhídrico 0.1 N (pH 1.2) o buffer de

fosfatos (pH 7.0) y se sometieron a incubación a 37 °C durante 120 y 180 minutos respectivamente. Los portaobjetos con la película se sacaron de las soluciones de ácido y buffer, se secaron a 40 °C durante toda la noche y posteriormente se pesaron. La disolución (D) se calculó como el porcentaje de pérdida de peso de la película de cada material. Los experimentos se realizaron por triplicado (Dimantov y col., 2004).

2.2.5 Evaluación del índice de hinchamiento de las películas de biopolímeros

Elaboración de películas. Se prepararon dispersiones de cada biopolímero al 3% de acuerdo al cuadro 2.1. y las películas de acuerdo a la sección 2.2.1.

Fluido gástrico simulado (FGS). Se preparó de acuerdo a la Farmacopea de Estados Unidos.

Fluido intestinal simulado (FIS). Se preparó de acuerdo con la Farmacopea de Estados Unidos.

Prueba de índice de hinchamiento

Las películas correspondientes a cada biopolímero se cortaron en piezas de aproximadamente 1 cm² y se pusieron en una estufa de convección a 70 °C durante aproximadamente 15 h para su completa deshidratación. Las muestras a peso constante se guardaron en recipientes cerrados y se conservaron en desecadores hasta su utilización.

Las piezas individuales de película puestas a peso constante, se pesaron y se sumergieron en fluido gástrico simulado (FGS); durante los primeros 10 min las películas fueron retiradas cada 2 min, después cada 10 minutos, hasta completar 60

minutos. Una vez retirada la película del FGS, se secó con una hoja de papel filtro para eliminar el exceso de líquido y se pesó (Albuquerque, 2002).

El índice de Hinchamiento (Ih) de las películas se cuantificó usando la ecuación sugerida por Blanchon y col., (1991).

$$Ih = (Ms - Mi)/Mi \times 100 \quad (2.4)$$

Donde Ih es el índice de hinchamiento, Ms es el peso de la película después de cierto período de hinchamiento, y Mi es el peso de la película seca.

2.2.6 Diseño experimental simplex de centroide para mezclas de polisacáridos-proteína

Una vez seleccionada la Pectina y la CMC como los materiales idóneos, se realizaron dos diseños de mezclas simplex de centroide de tres componentes como se indica en el Cuadro 2.3. El primero conteniendo gelatina (G) y el segundo, proteína aislada de suero de leche (PASL).

Los resultados se analizaron estadísticamente usando Design Expert Versión 5.0.4.

Cuadro 2.3. Diseño experimental simplex de centroide para mezclas polisacáridos-proteínas

Tratamiento	Factor A Pectina	Factor B CMC	Factor C G / PASL
1	0.67	0.17	0.17
2	0.50	0.00	0.50
3	0.00	0.50	0.50
4	1.00	0.00	0.00
5	0.50	0.50	0.00
6	0.17	0.67	0.17
7	0.00	0.00	1.00

8	0.33	0.33	0.33
9	0.00	1.00	0.00
10	0.17	0.17	0.67
11	0.33	0.33	0.33

2.2.7 Prueba de disolución e índice de hinchamiento de películas de mezclas

Preparación de las películas

Se prepararon las soluciones de los materiales de acuerdo al diseño mostrado en el cuadro 2.3. La eliminación de las burbujas de aire se realizó aplicando ultrasonido durante 30 minutos.

Disolución de las películas (D)

La disolución de las películas (D) se calculó como se indicó para los biopolímeros solos (apartado 2.2.4).

Índice de hinchamiento (Ih)

Esta prueba, con las mezclas de biopolímeros, se realizó en la misma forma como se describió en el apartado 2.2.5.

2.2.8 Microencapsulación mediante secado por aspersión y evaluación de la supervivencia de *Lb. acidophilus*

Condiciones de crecimiento de la bacteria probiótica y preparación de la suspensión de células

La cepa de *Lb. acidophilus* se rehidrató en caldo MRS con 10% de leche descremada a 32-35 °C en condiciones anaerobias durante 24 horas. Las células posteriormente se cultivaron en las mismas condiciones por tres veces sucesivas para asegurar que estuvieran adecuadamente activadas y pudieran servir como inóculo.

Para preparar la suspensión de células para encapsular, se sembraron las bacterias reactivadas en medio MRS sólido, incubando en anaerobiosis a 32 °C durante 24 h, tiempo en el cual la bacteria está en la fase estacionaria de crecimiento. Las células fueron cosechadas mediante un asa estéril y dispersadas en frascos de dilución que contenían agua peptonada. Utilizando un espectrofotómetro y una longitud de onda de 560 nm, se midió la absorbancia de esta dispersión de células hasta llegar a un valor de 1.0. De forma simultánea se tomó una alícuota de esta dispersión (inóculo) y se procedió a realizar diluciones en agua peptonada y a sembrar en medio sólido MRS para corroborar el número de células presentes (ufc/mL) en el inóculo.

Microencapsulación mediante secado por aspersión

De cada diseño de mezclas mostrado en el cuadro 2.3 se seleccionó la que mostró un mejor comportamiento en la prueba de disolución y en la de índice de hinchamiento. La mejor mezcla seleccionada se preparó dispersando los biopolímeros en agua destilada y añadiendo la dispersión de probióticos realizada previamente.

Las microcápsulas fueron preparadas asépticamente utilizando un secador Mobile Minor Niro-Atomiser (Copenhagen, Denmark) bajo las condiciones indicadas en el cuadro 2.4. Las condiciones indicadas se seleccionaron en base a revisión de artículos donde indicaban las temperaturas de entrada del aire de secado así como

la temperatura de salida del aire del secador por aspersión. Los artículos indicaban para la temperatura de entrada un rango desde 190-100 °C y una temperatura del aire de salida que variaba de 120-50 °C. La mayoría de los autores de estos artículos señalaban un mayor daño a las bacterias probióticas y por lo tanto una reducción notable en el número de células viables, cuando la temperatura de salida del secador es más elevada (Desmond y col., 2002; Lian y col., 2002; Fávaro-Trindade y Grosso, 2002; Espina y Packard, 1979; Moshiley, 2003; Gardiner y col., 2000).

Cuadro 2.4. Condiciones de secado para las mezclas seleccionadas.

Parámetro	Mezcla CMC/P/G	Mezcla CMC/P/PASL
Temperatura de entrada	140 °C	141 °C
Temperatura de salida	70 °C	65 °C

Se determinó mediante siembra en agar MRS el número de unidades formadoras de colonias (ufc/mL) en la mezcla de biopolímeros antes del secado por aspersión e inmediatamente después del secado por aspersión.

Determinación de cuenta total de *Lb. acidophilus* en la suspensión para encapsular (inóculo)

En un frasco de dilución con agua peptonada (0.1%) se dispersó la suspensión de células probióticas en una concentración del 10%, se continuó haciendo diluciones seriadas hasta 10^{-8} , se tomó 0.1 mL de cada dilución y se sembró mediante la técnica de dispersión en placa en agar MRS, se incubó en anaerobiosis a 32 °C. Se contaron las ufc/mL a las 36-48 h de incubación. Para cada muestra se realizó el análisis por duplicado, así como cada dilución.

Determinación de la viabilidad de *Lb. acidophilus* en el polvo del secado por aspersión

Se determinó la viabilidad de *Lb. acidophilus* antes de secar y después del secado por aspersión, vaciando la dispersión o el polvo en agua peptonada (0.1%) en una proporción del 10 %, se procedió a hacer diluciones seriadas y posteriormente se sembró 0.1 mL de cada dilución en placas de agar MRS mediante la técnica de dispersión en placa. Se incubó a 32 °C durante 36- 48 h y se procedió a contar el número de unidades formadoras de colonias. Para cada muestra la prueba se realizó por duplicado al igual que cada dilución.

2.2.9 Supervivencia de *Lb. acidophilus* microencapsulado en fluido gástrico simulado

En un matraz estéril conteniendo el fluido gástrico simulado en cantidad adecuada, se puso 10 % de *Lb. acidophilus* microencapsulado en polvo, se agitó hasta dispersar perfectamente el polvo. Se realizaron diluciones procediendo a sembrar cada dilución en placas de agar MRS a 37 °C correspondiendo éste, al tiempo T = 0. El resto de la dispersión conteniendo el fluido gástrico simulado con el probiótico encapsulado se incubó a 37 °C durante 2 h. Cada hora se procedió a realizar nuevamente diluciones y siembra en agar MRS y después de 36-48 h de incubación, se procedió a evaluar las UFC presentes al Tiempo = 1 hora y Tiempo = 2 horas. Las pruebas se hicieron por duplicado.

2.2.10. Supervivencia de *Lb. acidophilus* microencapsulado en fluido intestinal simulado

Se preparó fluido intestinal simulado de acuerdo a la farmacopea de Estados Unidos, el pH aproximado de esta solución fue de 7.5. La solución se almacenó en refrigeración hasta ser utilizada.

En un matraz estéril conteniendo el fluido intestinal simulado en cantidad adecuada, se colocó 10% de *Lb. acidophilus* microencapsulado en polvo, se agitó hasta dispersar perfectamente el polvo. Se realizaron diluciones seriadas, procediendo a sembrar cada dilución en placas de agar MRS a 37 °C correspondiendo éste, al Tiempo = 0. El resto de la dispersión conteniendo el fluido intestinal simulado con el probiótico encapsulado se incubó a 37 °C durante 3 h. Cada hora se procedió a realizar nuevamente diluciones y siembra en agar MRS y después de 36-48 h de incubación se procedió a evaluar las UFC presentes al Tiempo = 1 h y Tiempo = 2 h y Tiempo = 3 h. Las pruebas se hicieron por duplicado.

2.2.11 Supervivencia de *Lb. acidophilus* microencapsulado en sales biliares

Se prepararon soluciones de sales biliares al 1% y 2 % en agua destilada. La solución se almacenó en refrigeración hasta ser utilizada.

En un matraz estéril conteniendo las sales biliares en cantidad adecuada se puso 10% de *Lb. acidophilus* microencapsulado en polvo, se agitó hasta dispersar perfectamente el polvo. Se realizaron diluciones seriadas procediendo a sembrar cada dilución en placas de agar MRS a 37 °C correspondiendo éste, al Tiempo = 0. El resto de la dispersión conteniendo la solución de sales biliares con el probiótico

encapsulado se incubó a 37 °C durante 3 h. Cada hora se procedió a realizar nuevamente diluciones y siembra en agar MRS y después de 36-48 h de incubación se procedió a evaluar las UFC presentes al Tiempo = 1 hora y Tiempo = 2 horas y Tiempo = 3 horas. Las pruebas se hicieron por duplicado para cada concentración de sales biliares.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Capacidad de formar películas.

La propiedad de formar películas de los biopolímeros es un factor muy importante, ya que si el polímero es capaz de formar una estructura compacta, homogénea y flexible, podrá servir como barrera a diversos agentes tales como al aire, agua y aceite. En general todos los materiales usados formaron películas aunque cada una con ciertas características propias.

El almidón waxy fue capaz de formar películas. Es importante destacar que durante la preparación de la misma, el empleo de alta temperatura ($>80^{\circ}\text{C}$) y mantenerla al menos durante 20 min, fue una condición indispensable para la formación de la película. Se ha señalado que la temperatura de gelatinización del almidón waxy está en un intervalo de 63°C a 72°C (Murphy, 2000); sin embargo, si se utilizaban temperaturas menores a 80°C , al vaciar la dispersión sobre la superficie del teflón, ocurría una separación de fases, debida probablemente a una gelatinización incompleta, ya que aparentemente quedaban partículas no hidratadas. El tiempo de tratamiento térmico también fue un factor a controlar, ya que mayores tiempos de exposición al calor, si bien favorecían la formación de un gel, incrementaban sustancialmente la viscosidad lo cual impedía una desgasificación eficiente.

Las películas elaboradas con derivados de celulosa presentaron buenas características. En estas películas, el agua juega un papel primordial, ya que al hidratar a las fibras celulósicas, permite una mayor deformabilidad en la estructura,

debido a un decremento de los puentes de hidrógeno intermoleculares en los biopolímeros (Debeaufort y Voilley, 1997).

Las películas de MC, HPC, HPMC y CMC, tienen en común, ser derivados de éter de celulosa, son flexibles, transparentes, solubles en agua (Zecher y Gerrish, 1997).

De los éteres de celulosa, la MC es la menos hidrofílica. También se ha informado sobre sus buenas propiedades de barrera al oxígeno (Debeaufort y Voilley, 1997), su resistencia puede estar relacionada con la temperatura de preparación de la película, como lo señalan Debeaufort y Voilley, (1997), quienes evaluaron el comportamiento térmico de este biopolímero y encontraron que en un intervalo de temperatura de 45°C a 65°C puede ocurrir una reorganización de la red de gelificación. Hoyos y Urrego, (1997) también menciona que 50°C es una temperatura crítica para formar geles relativamente fuertes.

Con respecto a la HPC se tiene que es un excelente formador de películas las cuales son flexibles y transparentes. Durante la preparación de la película de HPC, también el control de la temperatura fue un factor a considerar, ya que temperaturas mayores a 40-45°C provocan la precipitación del polímero (Zecher y Gerrish 1997). La pectina por su capacidad de gelificar, propiedad determinada por factores intrínsecos como su peso molecular y su grado de esterificación, fue otro de los mejores materiales formadores de películas. Sus películas fueron transparentes pero de ligero tono amarillento. Se sabe que la pectina de alto grado de metoxilo requiere la adición de sólidos que compitan por el agua para favorecer las interacciones polisacárido – polisacárido. Sin embargo, en este caso, no se adicionaron sólidos pero se realizó un proceso de deshidratación que favoreció la interacción entre las cadenas de pectina permitiendo la formación de una estructura tridimensional estable.

3.2. Difusividad térmica (α)

Determinar la difusividad térmica de los materiales biopoliméricos se consideró un factor muy importante ya que la microencapsulación de las bacterias probióticas fue mediante secado por aspersión donde se utilizan temperaturas relativamente altas, las cuales se sabe que afectan la supervivencia de *Lb. acidophilus*, por lo tanto una opción sería seleccionar al material o materiales que presentaran menor difusividad térmica; ya que éste parámetro indica la rapidez con que una sustancia se calienta o enfría durante un tratamiento térmico.

Los resultados obtenidos para la difusividad térmica de las películas de los diversos materiales se muestran en el cuadro 3.1, incluyéndose también el espesor.

Cuadro 3.1. Espesor y coeficiente de difusividad térmica (α) de las películas de polisacáridos

Material	Espesor (μm)	α ($\times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
A ^c	65.80	11.224 ± 0.423
MC ^{b,c}	63.90	5.932 ± 1.41
HPC ^{b,c}	65.25	6.732 ± 1.2
HPMC ^{a,c}	70.50	14.457 ± 2.4
CMC ^{a,c}	65.80	14.728 ± 2.19
P ^{a,c}	65.40	16.321 ± 0.09

De acuerdo a los resultados podemos observar que el espesor de las películas fue similar, mientras que el coeficiente de difusividad térmica mostró variaciones dependiendo del tipo de material, esto se justifica plenamente debido a que este parámetro físico es único para cada material, reflejando una fuerte dependencia de las características de composición y de estructura del material (Ziegler y Hasselman,

1981), de la porosidad y de la densidad que es una medida del grado de ordenamiento estructural (cristalinidad) del material (Avaria y col., 2002).

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) obteniéndose un valor de $p=0.002$ y una $R^2=0.930$ por lo cual se concluyó que si existe diferencia significativa entre algunas medias.

Mediante el análisis de comparación de medias de Tukey se obtuvieron los resultados mostrados en el Cuadro 3.1, en la que exponentes iguales indican que los materiales no son significativamente diferentes. El valor más alto de difusividad térmica correspondió a la pectina con $16.321 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ sin embargo estadísticamente no existe diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre el valor de difusividad de la pectina y los valores obtenidos para la CMC y la HPMC, los valores más bajos de difusividad los presentaron la MC y la HPC con $5.932 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y $6.732 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ respectivamente aunque estadísticamente tampoco existe diferencia significativa entre estos valores ($\alpha=0.05$), finalmente el almidón presentó un valor de $11.224 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ que se podría considerar intermedio entre los valores extremos mencionados anteriormente, lo cual se ve reflejado en el análisis estadístico realizado.

Es importante mencionar que los valores obtenidos para todos los materiales estudiados en este trabajo se encuentran en el mismo orden de magnitud que los reportados por Tomás y col., (2004) también para películas comestibles, los autores encontraron valores de $19.7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para la goma de mezquite GM) y de $4.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para la carragenina (C) y cuando realizaron mezclas de éstos polisacáridos con alginato (A) y proteína concentrada de suero de leche (WPC), obtuvieron valores de $52 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para la mezcla WPC/A/GM y de $1.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para la mezcla WPC/A/C.

Se observa que la HPMC, CMC y P tienen mayor difusividad térmica, debido probablemente a un mayor ordenamiento estructural de las películas formadas por estos biopolímeros lo cual da lugar a la formación de estructuras cristalinas. En contraste la MC y HPC que tienen menor valor de α .

Como se mencionó anteriormente la difusividad térmica de los materiales está determinada por diversos factores siendo uno de ellos la cristalinidad. En el cuadro 3.2 se muestran los resultados de cristalinidad y difusividad térmica para cada uno de los biopolímeros obtenidos mediante difracción de rayos X.

Cuadro 3.2. Grado de cristalinidad y difusividad térmica de las películas de polisacáridos

Material	Cristalinidad (%)	α ($\times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
A	6.11	11.224 ± 0.423
MC	4.19	5.932 ± 1.41
HPC	2.93	6.732 ± 1.2
HPMC	6.74	14.457 ± 2.4
CMC	13.64	14.728 ± 2.19
P	17.10	16.321 ± 0.09

Se puede observar que existe una relación entre los valores de difusividad térmica obtenidos y el grado de cristalinidad presentado por las películas de biopolímeros. El mayor valor de difusividad térmica y de cristalinidad correspondió a la pectina, en tanto que los materiales que presentaron valores menores de difusividad térmica y de cristalinidad fueron la MC y HPC.

Es de resaltar el valor de α alcanzado por las películas de CMC y de HPMC en relación con los demás derivados de celulosa, lo cual, en concordancia con lo mencionado antes, puede atribuirse al tipo de sustituyentes de estos polímeros y al mecanismo de gelación involucrado. Al respecto, se ha propuesto que el proceso de formación de un gel de HPMC, implica un mecanismo de dos pasos: el primero,

llamado régimen de pre gel donde tienen lugar interacciones hidrofóbicas produciendo la agregación de la mayoría de los dominios hidrofóbicos que llevan a la formación de racimos o grupos (clusters) y el segundo paso o de régimen de gel en que tiene lugar la formación del gel mediante una red , donde se involucran asociaciones hidrofóbicas de dominios de menor hidrofobicidad como di y mono-metilglucosas. Ello hace que los clusters aumenten de tamaño, creando cristales, cuya presencia ha sido corroborada por estudios de difracción de rayos X y por calorimetría (Pérez y col, 2006). Como puede observarse en la Cuadro 3.2, el porcentaje de cristalinidad en esta película, es el segundo mayor valor de entre los derivados de celulosa estudiados y su difusividad térmica encontrada, entre las más altas.

3.3. Análisis estructural de la superficie de las películas

Topografía y microestructura de las películas

El objetivo de obtener imágenes de las películas de biopolímeros mediante un microscopio de fuerza atómica fue poder apreciar el ordenamiento de las moléculas de biopolímero en la matriz de la película durante el proceso de secado.

En cuanto a la topografía de las películas, obtenida por MFA, fue posible corroborar una estructuración diferenciada en las mismas, al mostrar características desiguales si la muestra se tomaba en el centro o en la periferia. Esto fue más notorio en las películas de pectina (figuras 3.1 y 3.2).

El ordenamiento de las cadenas de polímero, así como la estructura química va a definir su estructura interna y de la superficie desempeñando esto un papel muy importante en las propiedades de la película.

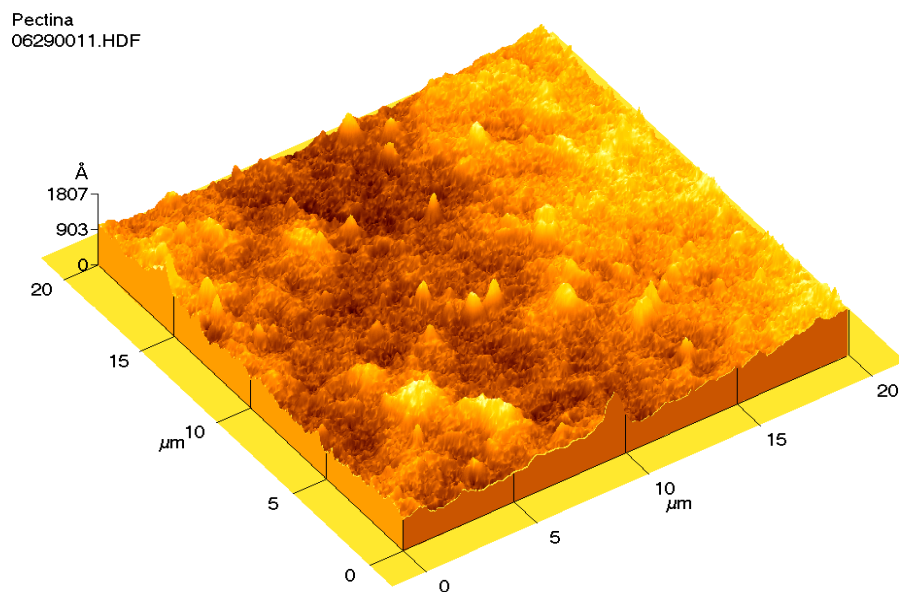


Figura 3.1 Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de pectina: parte central

Pectinab
06290015.HDF

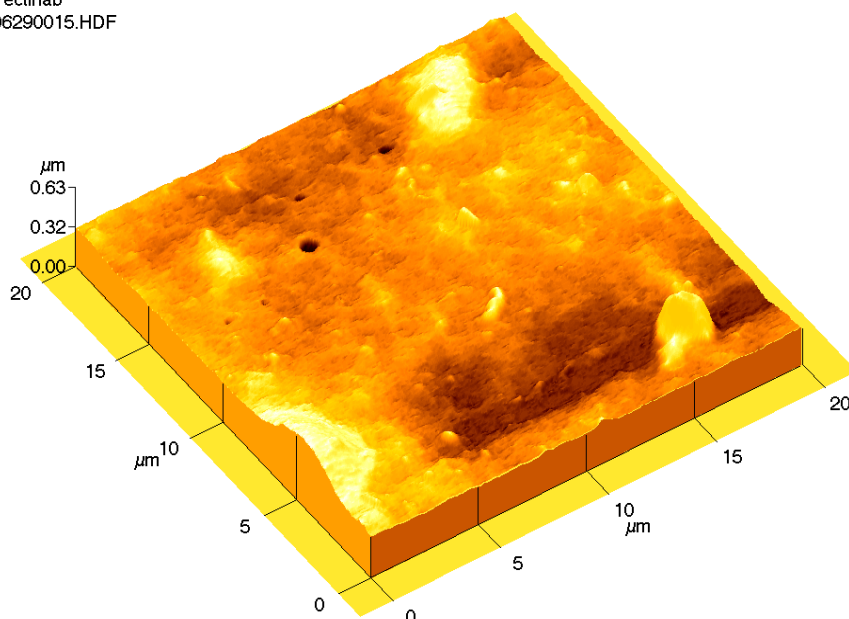


Figura 3.2 Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de pectina: parte periférica

Para las películas restantes, se mostrarán sólo las imágenes de la parte central. Los parámetros generales de rugosidad y altura media determinados a partir de las imágenes obtenidas por MFA, se presentan en el cuadro 3.3, donde se consideran tanto las imágenes de la parte central como las de la parte periférica. Es de notarse que en general, mayores valores de altura media, corresponden a mayor rugosidad, independientemente del tipo de biopolímero. De acuerdo con Dimantov y col., (2004), una mayor rugosidad corresponde a estructuras no homogéneas.

En las películas de derivados de celulosa, la rugosidad de la película y la altura promedio parecen estar también en función del tipo de sustituyente, esto es, las películas de MC son las de menor rugosidad y menor altura promedio y las de HPC, las que generaron valores más altos para estos parámetros.

Cuadro 3.3 Rugosidad promedio y altura media de las películas

MATERIAL	PARTE CENTRAL		PARTE PERIFERICA	
	Rugosidad promedio (nm)	Altura media (nm)	Rugosidad promedio (nm)	Altura media (nm)
A	88.6	278	48.3	429
CMC	52.1	207	47.2	233
HPC	62.9	230	43.7	216
MC	7.91	30.7	5.48	46.4
HPMC	7.67	17.2	5.14	17.1
P	13.5	38.4	19.9	122

También es de resaltar que los valores de las alturas medias son en general mayores en la parte periférica de la película, con respecto a los de la parte central, mientras que la rugosidad fue en general, menor.

Lo anterior se explica considerando que se forman diferentes estructuras en el centro, las orillas, en la superficie superior y en la superficie inferior de la película. Se forma una estructura más porosa en el centro lo cual probablemente se debe a una transferencia de masa más baja del agua y consecuentemente una velocidad de secado más baja. La matriz de polisacárido tiene tiempo para formar una estructura más agregada lo cual conduce a la formación de poros más grandes, mostrando las películas una rugosidad más grande en la parte central (Anker y col., 2002)

Considerando las diversas estructuras mostradas en las películas de derivados de celulosa, es evidente que el tipo de sustituyente tiene gran influencia en la estructura de las películas, tal como se puede observar en las figuras 3.3, 3.4, 3.5. y 3.6

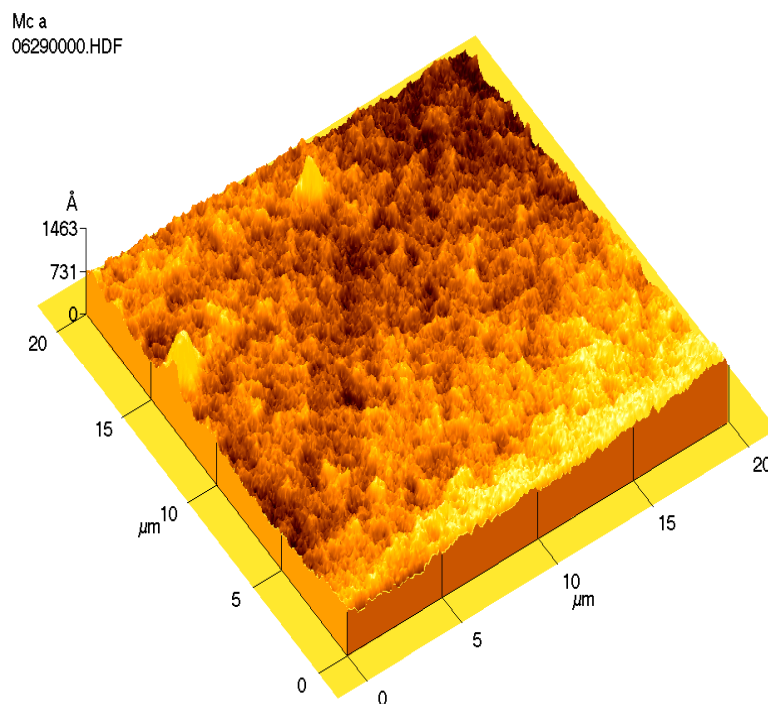


Figura 3.3 Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de MC.

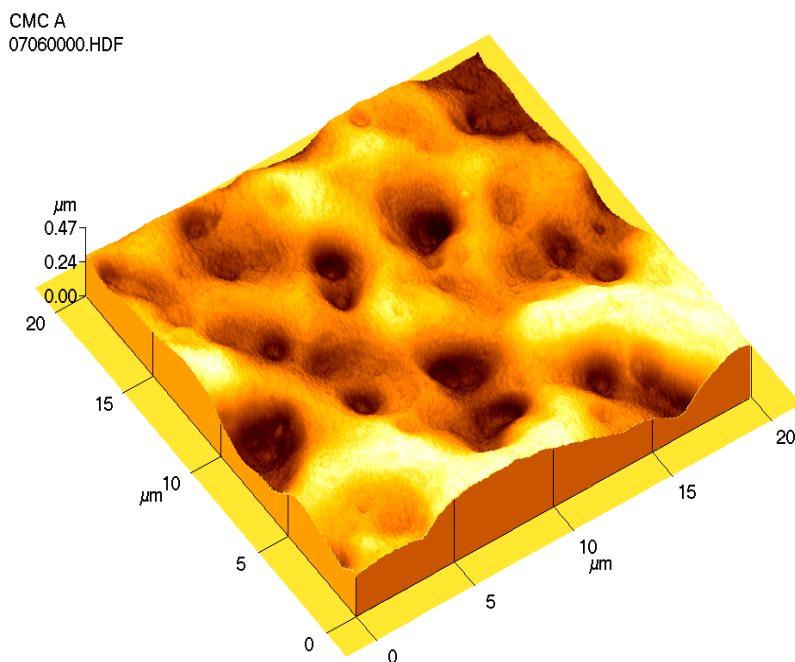


Figura 3.4 Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de CMC.

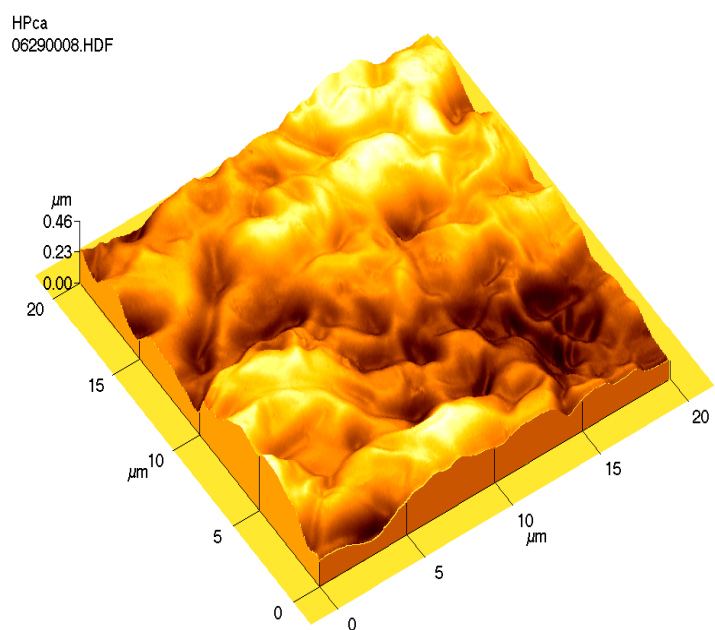


Figura 3.5 Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de HPC.

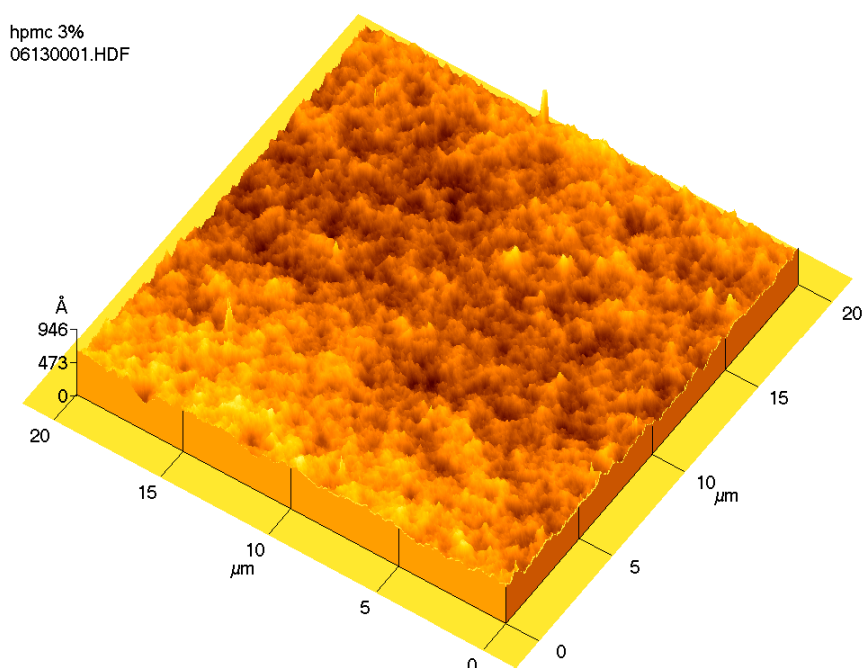


Figura 3.6 Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de HPMC.

En la figura 3.7 se presenta una imagen 3-D representativa de las películas de almidón. Las zonas más oscuras representan profundidades en la superficie.

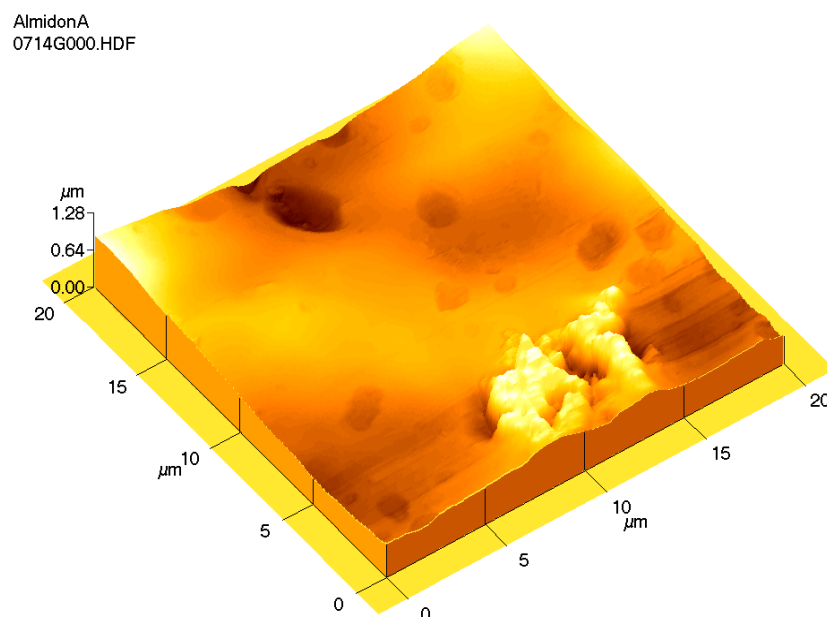


Figura 3.7 Imagen en 3-D de una sección de 20x20 μm de la superficie de la película de almidón.

La caracterización microestructural de las películas de biopolímeros es un importante elemento para entender propiedades físicas como el brillo y transparencia así como propiedades mecánicas y de barrera de las películas. Ward y Nussinovitch (1996b) encontraron que altas rugosidades en la superficie de las películas se correlacionan con valores bajos de brillo, de tal manera que para los resultados obtenidos en esta tesis la MC, HPMC y P por presentar los valores más bajos de rugosidad tendrían un mayor brillo, en tanto que las películas de A, CMC y HPC tendrían menor brillo por ser las más rugosas.

Ward y Nussinovitch (1997) estudiaron las propiedades de brillo de varias películas de hidrocoloides como una función de la concentración del coloide en la dispersión que formará las películas. Encontraron que los valores del brillo se incrementaban linealmente conforme aumentaba la concentración del polímero en la mayoría de los polisacáridos estudiados, y que esto coincidía también con el valor de rugosidad de las películas.

Villalobos y col., (2005) evaluaron el brillo y la rugosidad a películas de HPMC conteniendo surfactantes, encontraron que el brillo de las películas aumentaba conforme la proporción de HPMC en relación con el surfactante era mayor, por otro lado las películas con menores valores de rugosidad eran aquellas que presentaban mayor brillo.

Para analizar la superficie de las películas, se efectuó un análisis de sección transversal, para dimensionar los rasgos característicos (features) de la superficie de las películas. En la figura 3.8 se presenta una imagen 2-D de la película de almidón, el perfil de alturas de una sección determinada y el histograma de frecuencia de alturas encontrado en la sección de 20x20 μm .

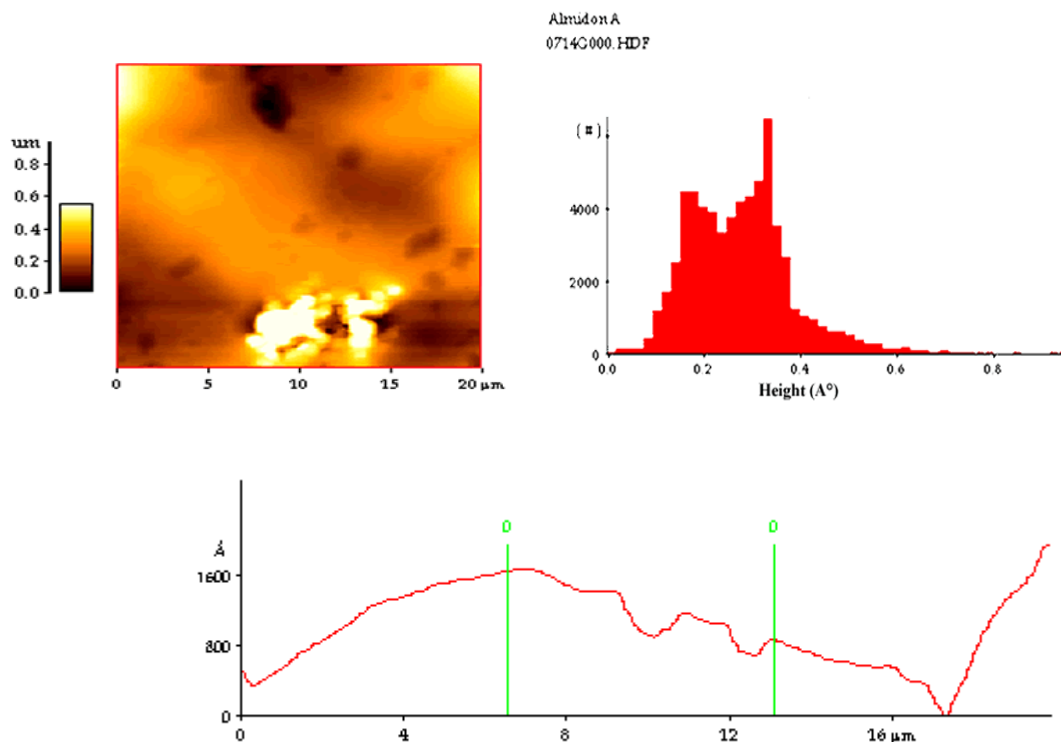


Figura 3.8 Análisis de una sección transversal de la película de almidón.

Las películas de almidón muestran una distribución de frecuencias del tipo bimodal en las alturas superficiales, lo cual es evidente en el histograma ya que se observan

dos valores máximos. Por otra parte, las longitudes de los rasgos característicos son muy variables, tal como se observa en el perfil topográfico.

Para las películas de derivados de celulosa, los perfiles de altura son muy diversos, lo cual se muestra en las figuras 3.9 - 3.12. La caracterización del perfil de las películas, revela también diferente topografía.

Se observa que el perfil de distribución de alturas en la película de MC (figura 3.9) sigue un comportamiento de distribución leptocúrtica, mostrando una repetición de los rasgos característicos.

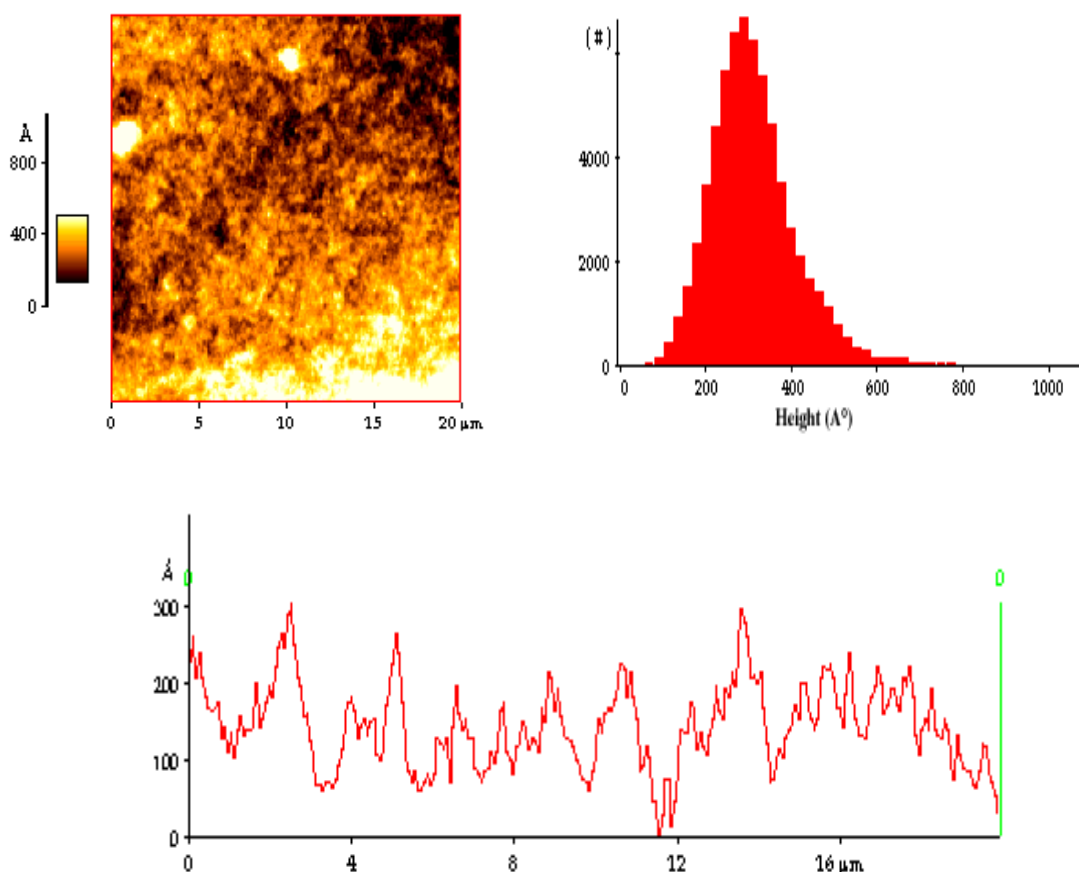


Figura 3.9 Análisis de la sección transversal de una película de MC

Cuando la película fue de CMC, se modifican, tanto las longitudes de los rasgos característicos, como la distribución de alturas, aunque también con una tendencia

leptocúrtica y simetría en la distribución (figura 3.10). Hay una homogeneidad aparente en los tamaños de los rasgos característicos como puede observarse en el perfil topográfico.

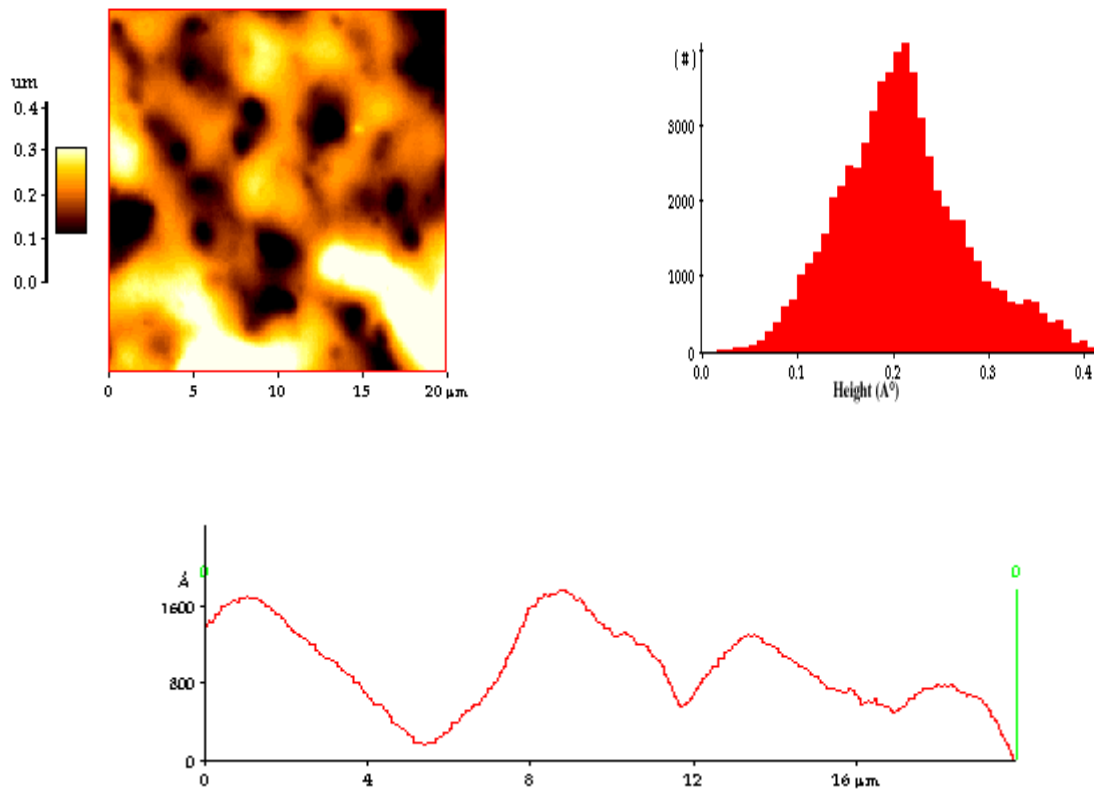


Figura 3.10 Análisis de la sección transversal de una película de CMC.

En el perfil topográfico de la película de HPC (figura 3.11) se observa que la longitud de los rasgos característicos es menor que en el caso de la película de CMC, aunque en el tamaño de estos rasgos característicos también hay homogeneidad, la distribución de alturas se acerca más a una distribución normal. Se aprecia también una tendencia a formar aglomerados, lo que podría relacionarse con el ligero aumento en la rugosidad en relación con la película de CMC.

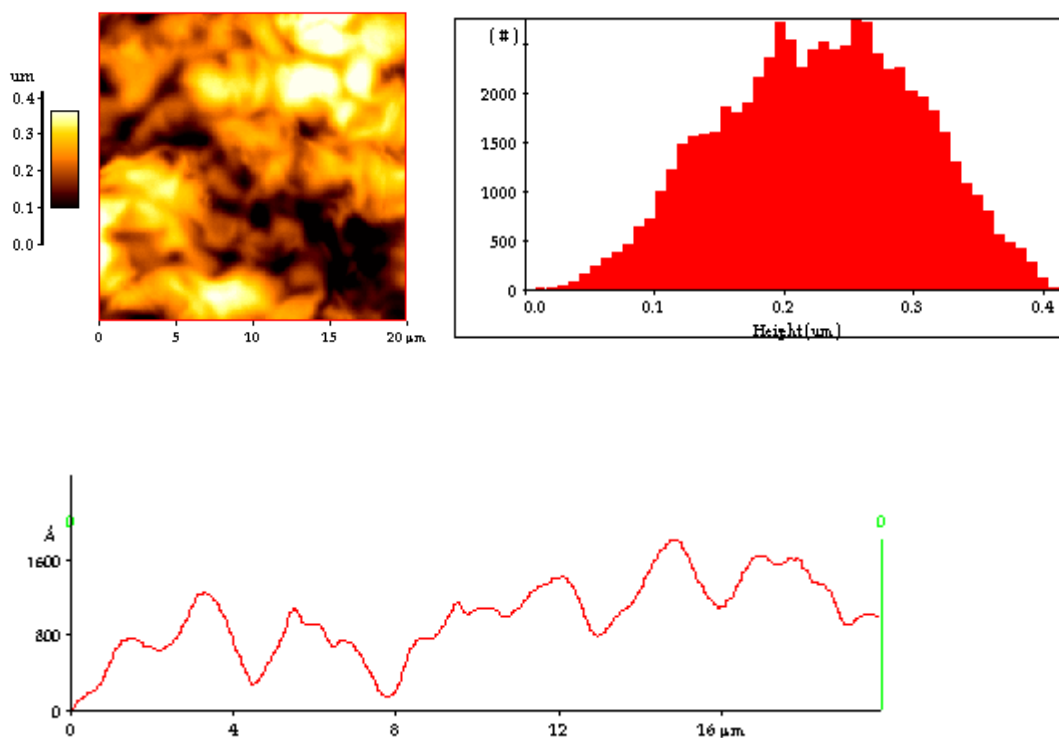


Figura 3.11 Análisis de la sección transversal de una película de HPC

Por último para el caso de la película de HPMC (figura 3.12) se observa que la distribución de alturas se acerca a una distribución normal con asimetría negativa, resulta importante de destacar que las alturas presentadas por la película de HPMC son aproximadamente 10 veces menores que las alturas presentadas por la HPC.

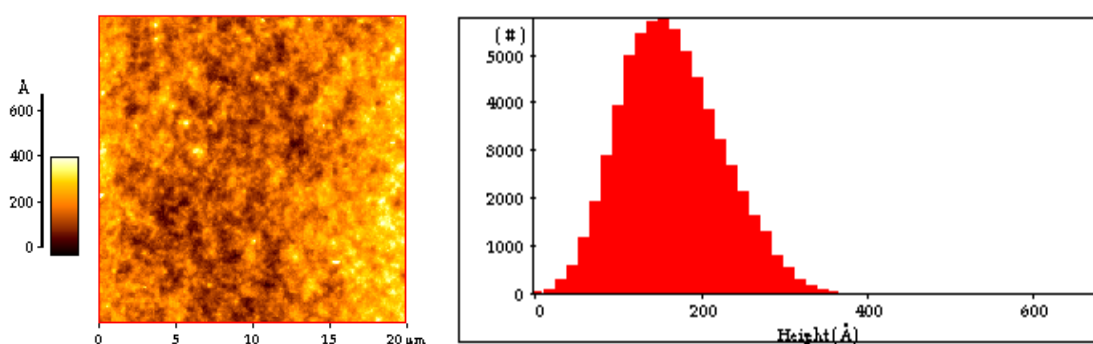


Figura 3.12 Análisis de la sección transversal de una película de HPMC

En el análisis de la topografía de las películas de derivados de celulosa, fue también evidente el efecto del tipo de sustituyente en las características de rugosidad, el tamaño y distribución de los rasgos característicos y en las alturas medias.

El perfil de alturas de la película de pectina (figura 3.13) es de una curva con asimetría negativa, con rasgos característicos de longitud pequeña y repetida, de menor altura en comparación con las películas de CMC, HPC y A. Los datos sugieren que existe una relación entre un tamaño pequeño de los rasgos característicos y la rugosidad, ya que las películas de MC y P, mostraron perfiles topográficos similares con los rasgos característicos de menor longitud y los valores más pequeños de rugosidad entre las películas estudiadas.

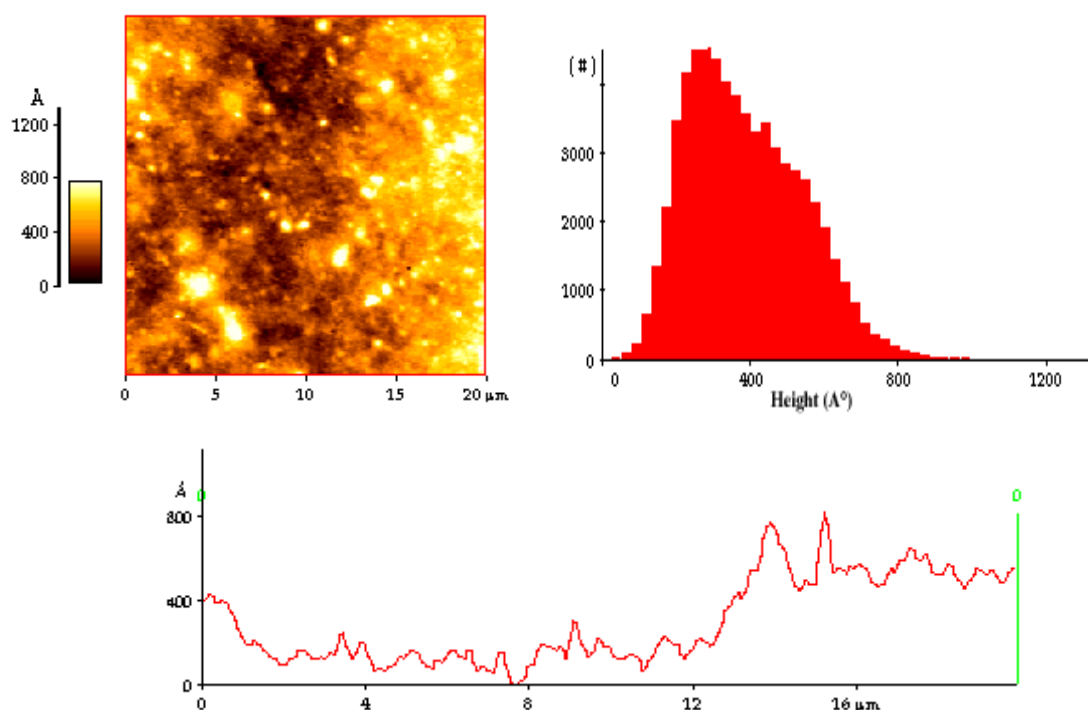


Figura 3.13 Análisis de la sección transversal de una película de Pectina

Se puede concluir después de analizar los resultados que el tipo de sustituyente en el biopolímero de celulosa es determinante en las propiedades de difusividad térmica, cristalinidad y de topografía.

3.4. Energía de Activación (Ea)

La determinación de la energía de activación del proceso de secado isotérmico de biopolímeros sirve como criterio de selección *a priori* de materiales de barrera en la microencapsulación de cualquier principio activo o células, debido a que este parámetro se encuentra relacionado con la estructura de la pared de la microcápsula. La energía de activación para el propósito de este trabajo significa la cantidad de energía que se requiere para evaporar un mol de agua del material disperso en agua y sometido a secado isotérmico (Pérez-Alonso, 2003).

En el cuadro 3.4 se indican los resultados de energía de activación obtenidos para los biopolímeros sólo.

Cuadro 3.4. Energía de activación de biopolímeros

Material	Ea (KJ/mol)
HPC	35.17
P	33.45
CMC	27.08
HPMC	25.28
MC	24.64
A	7.88

Para los materiales estudiados se obtuvo que la HPC tuvo el valor de energía de activación (Ea) más alto correspondiendo a 35.17 KJ/mol, mientras que el almidón waxy presentó el valor más bajo con 7.88 KJ/mol. El resto de los materiales todos

derivados de la celulosa presentaron valores que podrían considerarse también altos y que se encuentran en el rango de los reportados por Pérez-Alonso (2003) para la goma arábica (18.1 KJ/mol), Maltodextrina (30.2 KJ/mol), y goma de mezquite (24.5 KJ/mol). Pérez-Alonso encontró que todas las mezclas de estos biopolímeros en diferentes proporciones mostraron un aumento en la energía de activación con respecto a los biopolímeros solos, por lo que se podría inferir que mezclas de los polímeros que se estudiaron en este trabajo proporcionarían materiales de pared que tuvieran una energía de activación mayor lo cual sugeriría que el biopolímero forma una estructura mejor organizada y compacta que protegería a los probióticos de efectos adversos tales como el oxígeno y otros gases.

El valor de este parámetro va a estar relacionado con la capacidad que tenga el biopolímero para absorber agua, con la intensidad de los enlaces e interacciones polímero-agua, polímero-polímero y agua-agua, así como de la capacidad del polímero para formar una cubierta o estructura compacta y homogénea alrededor de la gota de dispersión del polímero durante el proceso de secado.

Se sabe que el grupo hidroxipropil de la HPC es más hidrofílico que otros grupos sustituyentes usados en la celulosa esta es la razón por la que son mejores o más hábiles para retener el agua de hidratación cuando se someten al calor (Alistair, 1995).

También ha sido documentado que la HPC muestra una mayor solubilidad que la MC o la HPMC en solventes polares orgánicos.

Por otra parte el grupo sustituyente hidroxipropilo es un grupo relativamente grande comparándolo con los sustituyentes de las otras celulosas que se analizaron; esto hace que la molécula lineal de celulosa presente protuberancias a lo largo de toda su longitud que evitan la asociación intermolecular característica de la celulosa

(Fennema, 1996), por lo tanto el grado de sustitución también ejerce un papel importante en la capacidad de hidratación de la HPC.

Dado que la asociación entre cadenas debida a los grupos hidroxilo adyacentes es el factor más importante que determina la solubilidad de la CMC, el grado de sustitución (DS) tiene un profundo efecto sobre las propiedades de este polímero (Coofey y Bell, 1995). Conforme aumenta el grado de sustitución se tiene una CMC más soluble de tal manera que a valores de DS cercanos a 0.7 las regiones cristalinas se han destruido en una cantidad suficiente produciendo un material bastante soluble en agua. En el caso de este trabajo se utilizó una CMC de sodio con un grado de sustitución situado entre 0.65 y 0.90, de tal manera que se encuentra plenamente justificado su buena solubilidad en agua y el valor de E_a obtenido.

Por lo que respecta a las celulosas restantes HPMC y MC las propiedades de estos hidrocoloides son muy similares.

Ambos polímeros son solubles en agua fría y caliente debido a que el eter metil e hidroxipropil forman protuberancias a lo largo de la cadena que evitan la asociación intermolecular propia de la celulosa (Whistler y BeMiller, 1999).

Sin embargo los sustituyentes hidroxipropil de la HPMC son más hidrofílicos que los grupos metil de la MC, de ahí que HPMC sea mejor para retener el agua de hidratación comparada con la metil celulosa cuando se expone al calor. lo que concuerda con los datos de energía de activación obtenido que corresponden a los más bajos dentro de las celulosas 25.65 KJ/mol para HPMC y 24.73 KJ/mol para MC.

La pectina fue de los polisacáridos que también mostró una energía de activación alta, sólo menor a la de la HPMC.

La pectina utilizada en el presente estudio fue una pectina de alto metoxilo con un grado de esterificación de aproximadamente 73 % por lo tanto contiene en su estructura un gran número de grupos hidrofílicos lo cual podría explicar el valor de E_a alto que se obtuvo.

Por lo que respecta al almidón éste fue el que presentó la menor energía de activación con 7.88 KJ/mol, el almidón utilizado fue un almidón waxy que nos indica un alto contenido de amilopectina (hasta un 99%).

Debido al tamaño de su molécula y a su estructura ramificada como la de un árbol, la formación de un gel de amilopectina es un proceso mucho más lento o incluso puede no suceder (Thomas y Atwell, 1999). Por otro lado se sabe que la amilosa es la responsable de la capacidad de formación de películas de los almidones (Mali y Grossmann, 2003), en nuestro caso el material que se usó fue almidón waxy constituido básicamente de amilopectina y por lo tanto la cubierta que se formó durante el proceso de secado no tenía las características de ser una buena película, compacta, y homogénea.

3.5. Propiedades mecánicas.

La resistencia a la tensión, elongación y el módulo de elasticidad (Módulo de Young) se pueden usar para describir como las propiedades mecánicas de las películas se relacionan con su estructura química.

Es muy importante que las películas posean una resistencia a la tensión adecuada, ya que frecuentemente el material está sujeto a fuerzas mecánicas. En una variedad de aplicaciones finales, los productos deben ser capaces de resistir fuerzas considerables sin llegar a fracturarse (Liu, 2007).

En las figuras 3.14 – 3.16 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas mecánicas para las películas de biopolímeros.

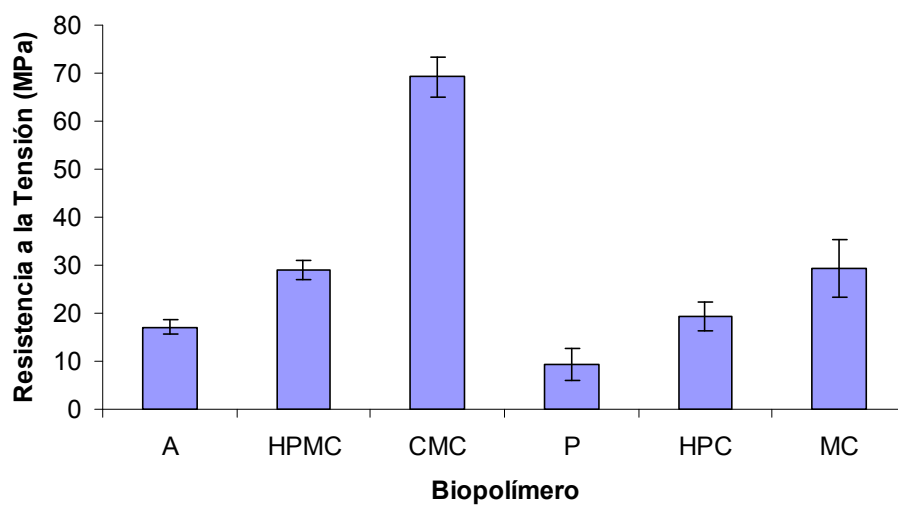


Figura 3.14 Resistencia a la tensión de películas de biopolímeros.

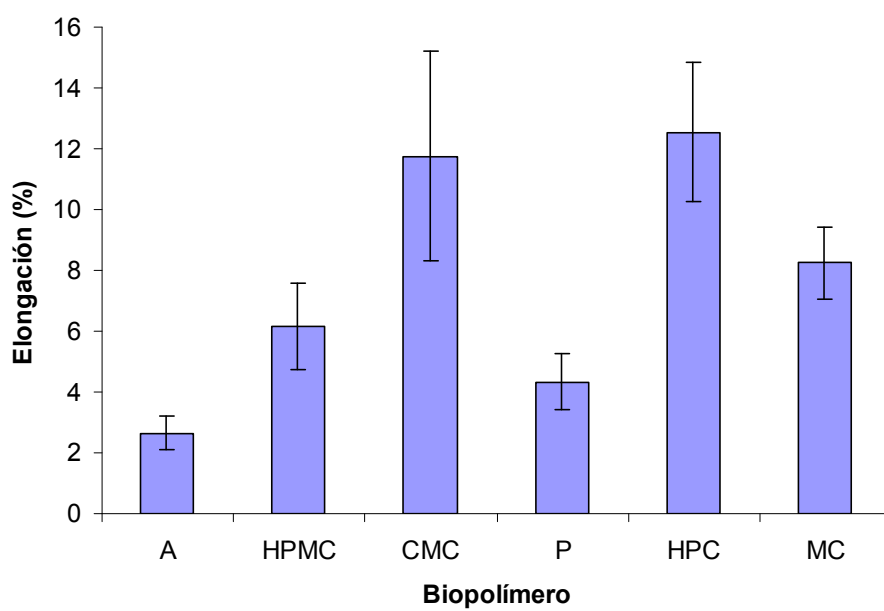


Figura 3.15 Elongación de películas de biopolímeros

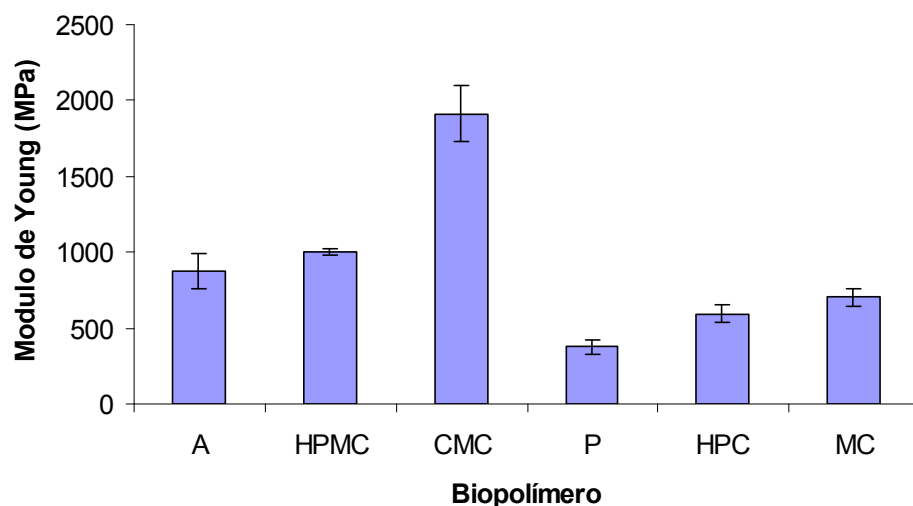


Figura 3.16 Módulo de Young de películas de biopolímeros.

Los resultados muestran que el valor más alto para la resistencia a la tensión correspondió a la CMC con 69.168 MPa y el valor más bajo lo tuvo la pectina con 9.2635 MPa , Liu (2007) obtuvo valores en el rango de 24-59 MPa para películas a base de mezclas de pectina con glutaraldehído/metanol , pectina con gelatina de piel de pescado y pectina con proteína de harina de soya, los resultados obtenidos en este trabajo también se pueden comparar con los reportados por otros autores donde obtuvieron un valor de 29 MPa para películas biodegradables a base de mezclas de proteína de harina de soya con el desecho obtenido de la mazorca de maíz carboximetilada (Schilling, 2005). Para polímeros no biodegradables como el cloruro de polivinil se obtuvieron 35 MPa y 55 MPa para el poliestireno (Callister, 2000) por lo tanto podemos concluir que la CMC podría ser un buen material para la elaboración de películas o cubiertas para el secado por aspersión así como otros usos tales como materiales de empaque. Por otra parte se podría esperar que al mezclarla con algún tipo de proteína estas propiedades mecánicas pudieran ser mejoradas.

De manera ideal una película debería ser dura y resistente pero no quebradiza. Estas propiedades se reflejan en un valor alto de resistencia a la tensión, un módulo de elasticidad alto y un porcentaje substancial de elongación a la ruptura cuando se somete a una prueba de tensión. De acuerdo a lo anterior la CMC cumple con todas estas características si la comparamos con todos los demás materiales estudiados en este trabajo.

El material que mostró más bajo valor de resistencia a la tensión y de Módulo de Young fue la Pectina, con respecto al porcentaje de elongación la pectina también se encontró entre los más bajos sólo por arriba del almidón waxy , estos valores concuerdan con los reportados por Parris, (1995) quien reportó para la resistencia a la tensión un valor de 11.1 MPa, para el módulo de Young 440 MPa y un porcentaje de elongación de 5.0 % . Ello podría deberse a que en las películas de pectina se forma una red tridimensional con las cadenas de polímero y un gran número de grupos hidroxil y carboxil que se encuentran a lo largo de la cadena de pectina pueden ser los responsables de numerosos puentes de hidrógeno entre las cadenas moleculares de pectina produciendo fuerzas intermoleculares extensivas produciendo una película quebradiza o menos resistente.

La HPMC mostró valores intermedios para los tres parámetros evaluados. Nagai, (1989) encontró que cuando se usa HPMC de baja viscosidad (5 y 15 cps) en la elaboración de películas la resistencia a la tensión y la elongación disminuyen, esto podría posiblemente justificar los resultados que mostró este material ya que también se utilizó un HPMC de baja viscosidad (6 - 11 mPa).

Por otra parte el almidón mostró valores entre los más bajos para el esfuerzo a la tensión y la elongación esto puede justificarse debido a la estructura ramificada de la amilopectina ya que estas ramificaciones tienen poca tendencia o facilidad para

interactuar y como consecuencia los geles y películas de amilopectina son débiles, generalmente poseen propiedades mecánicas diferentes, tales como fuerza de tensión baja, (Tharanathan, 2003).

Debeaufort y Voilley (1997) evaluaron películas de metilcelulosa adicionadas con diferentes cantidades de plastificante, obtuvieron una resistencia a la tensión de 20 MPa y un porcentaje de elongación de 2-3 % para la película sin plastificante, conforme se incrementa la cantidad de plastificante el porcentaje de elongación aumenta pero la resistencia a la tensión disminuye a 17 MPa.

Mali y col., (2004) evaluaron películas de almidón provenientes de diferentes fuentes y con diferentes proporciones de amilosa/amilopectina, los resultados que obtuvieron para la resistencia a la tensión estuvieron en el rango de 25-40 MPa y la elongación varió de 5-9 % según la fuente de origen del almidón.

Wang y col., (2007) evaluaron las propiedades mecánicas de diversos biopolímeros encontrándose entre ellos la PASL, Gelatina y CMC los valores de resistencia a la tensión que obtuvieron fueron los siguientes: PASL = 5.26 MPa, G = 5.7 MPa y CMC = 10.67 MPa; para la elongación obtuvieron: PASL = 22.46 % , G = 45.26 %, y CMC = 14.58 %.

A partir de los resultados obtenidos de las propiedades mecánicas se puede concluir que el material con mejores características es la CMC ya que posee una resistencia a la tensión de 69.18 MPa el cual es superior al de algunos polímeros sintéticos como el cloruro de polivinil (35 MPa) y el poliestireno (55 MPa) los cuales son ampliamente usados para películas y empaques, y también es superior a los valores reportados para algunos biopolímeros que ya se indicaron en el párrafo anterior.

Además es importante mencionar que en este trabajo se plantea utilizar mezclas de polisacáridos-proteína debido a que se han encontrado referencias que indican que

la interacción polisacáridos-proteína mejora las propiedades mecánicas y disminuye las propiedades de permeabilidad al vapor de agua; se han evaluado películas de PASL en mezcla con algunos polisacáridos (MC, alginato, pectina, carragenina y harina de konjac) y se ha demostrado que tienen más baja permeabilidad al vapor de agua y más altas propiedades mecánicas, tales como resistencia a la tensión y elongación más altas (Parris y col. 1995; Coughlan y col. 2004; Erdohan y Turhan, 2005), comparándolas con las películas preparadas sólo con polisacáridos o con PASL (Debeaufort y col. 1993; Pérez-Gago y Krochta, 2002).

3.6. Disolución de películas de biopolímeros.

La liberación de ingredientes activos sensibles en sitios específicos del sistema digestivo es importante en terapias a base de fármacos para enfermedades tales como colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y carcinoma de colon, como ya se mencionó antes, también en la administración oral de medicamentos a base de proteína, y liberación de vitaminas e ingredientes alimenticios sensibles. Este enfoque resulta atractivo para la industria de alimentos, cuando se trata de proteger ingredientes funcionales sensibles, para que puedan liberarse en condiciones adecuadas en el intestino y colon.

Así para alcanzar el colon, las cubiertas entéricas deben basarse en materiales que sean insolubles en ambientes ácidos y neutros y que no sean digeribles por las enzimas pancreáticas.

En el cuadro 3.5 se presentan los resultados obtenidos del porcentaje de disolución de las películas de biopolímeros en soluciones simulando el pH del estómago (pH =1.2).

Se realizó un Anova de una vía obteniéndose un valor de $R^2 = 0.992$ y $p < 0.05$ lo cual sugiere que si existe diferencia significativa entre algunas medias.

Mediante la prueba de Tukey se realizó una comparación de medias cuyo resultado se muestra también en el cuadro 3.6 donde letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre esos materiales.

Cuadro 3.5. Disolución de las películas de biopolímeros en pH del estómago

Material	Disolución en HCl, pH=1.2 (%)
A ^b	91.30±1.22
MC ^a	82.48±0.12
HPC ^a	84.27±0.19
HPMC ^a	86.36±0.10
CMC ^c	99.52±0.68
P ^d	73.59±2.10

De los resultados observamos que los polímeros se dividen en 4 grupos en el primer grupo se encuentra la MC, HPC y HPMC en los que no existe diferencia significativa, el siguiente grupo lo forma el almidón, luego la CMC que tuvo el mayor porcentaje de disolución (99.52) y finalmente la Pectina que tuvo el menor porcentaje de disolución (73.59).

En el cuadro 3.6 se presentan los resultados obtenidos para la prueba de disolución de las películas de biopolímeros en solución de buffer de fosfatos simulando el pH del intestino delgado (pH=7.0).

Se realizó un Anova de una vía obteniéndose un valor de $p < 0.05$ y un valor de $R^2 = 0.975$ lo cual sugiere que si existe diferencia significativa entre algunas medias.

Utilizando la prueba de Tukey se realizó una comparación de medias los resultados se muestran en el cuadro 3.6 donde letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre esos materiales.

Cuadro 3.6. Disolución de las películas de biopolímeros en pH del intestino

Material	Disolución en Buffer de fosfatos, pH 7 (%)
A ^a ,	93.81±1.16
MC ^b	81.16±3.17
HPC ^a	98.51±0.21
HPMC ^b	82.93±1.23
CMC ^a	96.34±0.56
P ^b	83.78±1.31

De los resultados podemos observar que los biopolímeros se dividieron en dos grupos en el primer grupo se encuentran el A, HPC y CMC y en el segundo grupo la MC, HPMC y P que son los que presentan menores valores de disolución en el pH del intestino delgado.

Dimantov y col., (2004) encontraron que la pectina de alto metoxilo presenta una menor disolución que la pectina de bajo metoxilo tanto en soluciones ácidas como neutras. También ellos encontraron una mayor disolución de la pectina a pH 7.0.

Debido a que los derivados de celulosa MC, HPC, HPMC, así como el A son polímeros no iónicos van a presentar aproximadamente el mismo grado de disolución tanto en pH del estómago como en pH del intestino delgado.

3.7. Índice de hinchamiento de películas de biopolímeros en FGS.

La resistencia y la accesibilidad de las películas y cubiertas a los fluidos y constituyentes del estómago, intestino delgado y colon, representan una condición

indispensable para una biodegradación efectiva en el ambiente del colon. De ahí que el hinchamiento y la permeabilidad de la película debe ser tal que se evite una liberación anticipada del medicamento y los constituyentes de la membrana lleguen a ser gradualmente accesibles a la degradación en el colon.

El hinchamiento es particularmente determinante para la accesibilidad de la película a la microbiota del colon (Cavalcanti, 2002).

En el cuadro 3.7 se presentan los resultados obtenidos de la prueba de índice de hinchamiento de las películas de biopolímeros en solución de fluido gástrico simulado.

Se realizó un Anova de una vía obteniéndose un valor de $p < 0.05$ y un valor de $R^2 = 0.988 \%$ lo cual indica que si existe diferencia significativa entre algunas medias.

Utilizando la prueba de Tukey se efectuó una comparación de medias cuyo resultado se muestra en el cuadro 3.8 donde letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre esos materiales

Cuadro 3.7. Índice de hinchamiento de las películas de biopolímeros en FGS

Material	Ih FGS (%)	Tiempo (min)
A ^a	49.48±1.00	60
MC ^a	38.07±7.27	5
HPC ^c	136.95±22.25	5
HPMC ^{a,c}	60.41±11.62	3
CMC ^{d,}	737.28±91.73	60
P ^b	270.07±55.88	30

En el cuadro anterior podemos observar que los biopolímeros derivados de celulosa MC y HPMC así como el A, por los grupos de sustitución en la cadena polimérica y por la estructura ramificada del almidón, presentarían el mismo índice de hinchamiento tanto en fluido gástrico simulado como en fluido intestinal simulado, así mismo los valores de índice de hinchamiento que presentan en FGS resultan muy

bajos así como el tiempo por lo que no serían los materiales idóneos para esperar una adecuada liberación de los probióticos en el colón (Van den Mooter, 1994).

La CMC y la P fueron los polímeros que presentaron un mayor hinchamiento y también fueron las películas que conservaron por más tiempo su integridad ya que los demás materiales se deshicieron en el tiempo que se indica en el cuadro 3.7.

Cavalcanti (2002), evaluó el hinchamiento de películas a base de mezclas de un polímero sintético con goma de mezquite e inulina obteniendo que las películas que contenían el porcentaje más alto del biopolímero más hidrofílico alcanzaron el más alto grado de hinchamiento, de lo anterior se puede inferir para los materiales estudiados en este trabajo que el orden de hidrofiliicidad sería $CMC > P > HPC > HPMC > A > MC$.

3.8. Disolución e índice de hinchamiento de mezclas de biopolímeros

Entre los más recientes sistemas desarrollados para una liberación específica en el colon, se encuentran dos que han sido únicos en términos de su alcance *in Vivo* del sitio específico, diseño de dosis adecuadas y factibilidad en su manufactura.

1. CODES (colon-specific drug delivery) está basado en una tecnología única de liberación de la droga específicamente en el colón. El diseño de CODES explota las ventajas de ciertos polisacáridos que son solamente degradados por bacterias que se encuentran en el colon.
2. Sistema de liberación de la droga en el colón basado en cubiertas de pectina y galactomananos, el cual indica que la degradabilidad bacteriana de las películas producidas por este método fue en el colon.

Tomando en consideración los resultados obtenidos de las distintas pruebas, así como lo mencionado en el párrafo anterior se seleccionó a la CMC y P como los materiales que podrían ser los más idóneos para la microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersión, y se seleccionaron la gelatina (G) y la proteína aislada de suero de leche (PASL) como las proteínas que podrían contribuir a mejorar algunas de las características de las películas.

Se elaboraron películas de los biopolímeros solos y sus mezclas de acuerdo a un diseño símplex de centroide de 3 componentes y se evaluaron las propiedades de disolución en pH del estómago y pH del intestino delgado, así como el índice de hinchamiento en FGS y FIS.

3.8.1 Análisis estadístico de la mezcla CMC/P/G.

Disolución en HCl.

De acuerdo al análisis estadístico los datos para disolución de las películas de mezclas de biopolímeros en HCl (pH del estómago) se ajustan a un modelo cuadrático con la interacción CMC*P, el modelo que explica la disolución en función del tipo de componente es el siguiente ($R^2 = 0.641$) con una probabilidad de $P = 0.05$.

$$Y = 62.91P + 105.97 \text{ CMC} + 102.55 \text{ G} - 94.62 \text{ P*CMC}$$

En la figura 3.17 se observa la gráfica de contornos y la superficie de respuesta para este modelo, donde se puede observar que de los biopolímeros solos el material que menos contribuye a la disolución de la película es la P, y se puede observar que la interacción P*CMC disminuye la disolución de la película en este pH. También por

otro lado se observa que la interacción de la pectina con el CMC se obtiene los menores valores de disolución para una relación de 0.3 de pectina y 0.7 de CMC. Cuando se tiene la mayor concentración de gelatina se observa los mayores valores de disolución de las películas, indicando que este polímero aportaría con buenas propiedades mecánicas pero deficientes en cuanto a mantener integra la película.

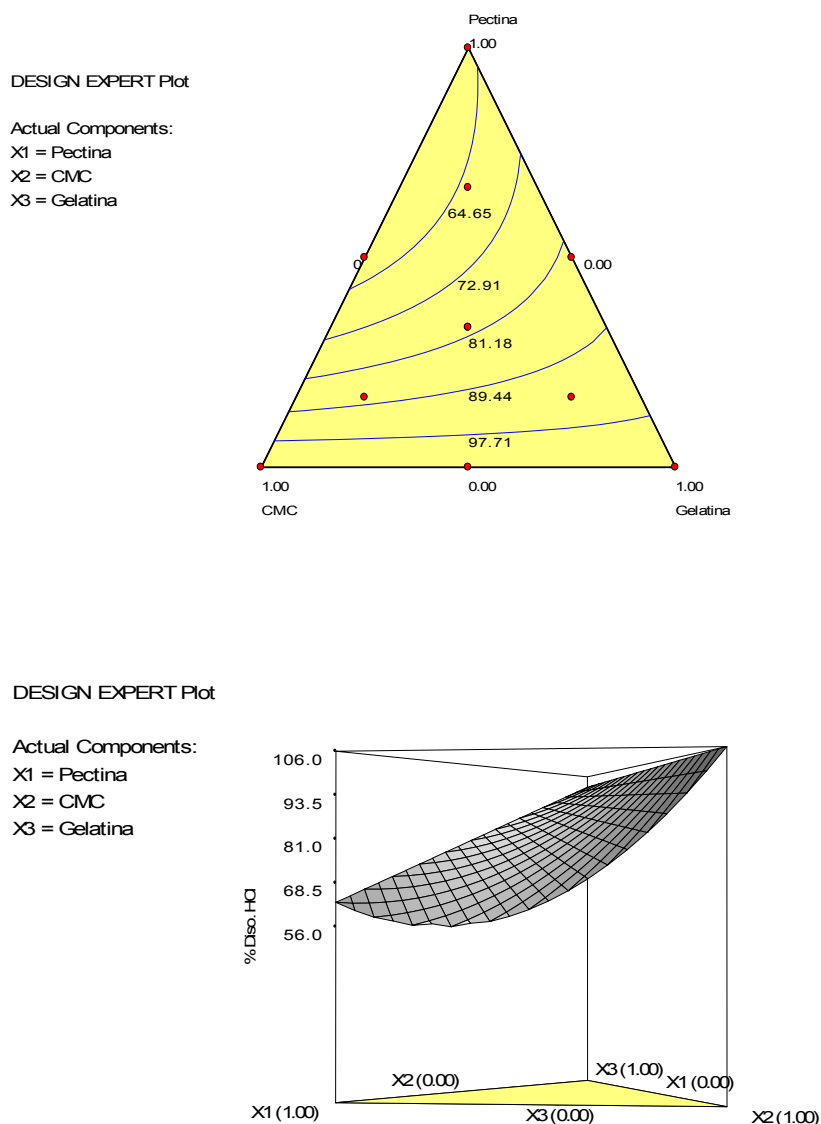


Figura 3.17 Gráfica de contornos y superficie de respuesta de la disolución en pH 1.2 de las películas de la mezcla CMC/P/G.

Disolución en buffer de fosfatos

El comportamiento de las películas en solución de Buffer de Fosfatos con pH de 7.2 simulando el intestino delgado se explica mediante un modelo cuadrático con interacción P*CMC y CMC*G, el proceso de la disolución de las diferentes películas en este pH se explica mediante la siguiente ecuación ($R^2 = 0.54$).

$$Y = 72.07P + 96.03CMC + 95.91 G -55.15 P*CMC + 26.34 CMC*G$$

En la figura 3.18 se observa la gráfica de contornos y la superficie de respuesta para este modelo, donde se puede observar que tanto la Pectina, como la CMC y la Gelatina contribuyen a la disolución de la película aunque la P en un menor grado, pero se puede observar que la interacción P*CMC disminuye la disolución de la película en este medio.

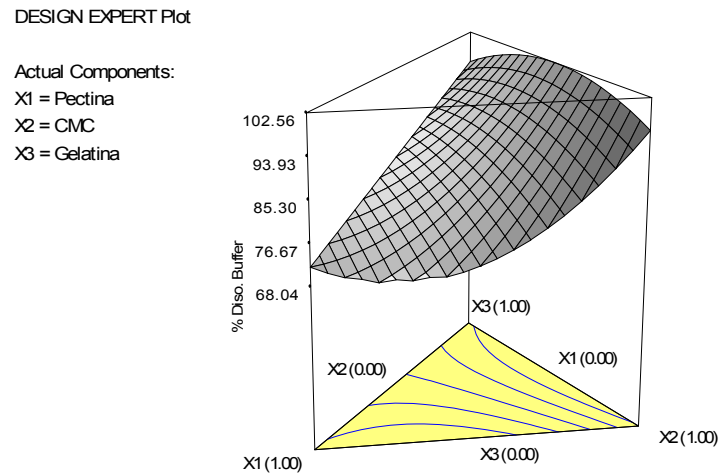
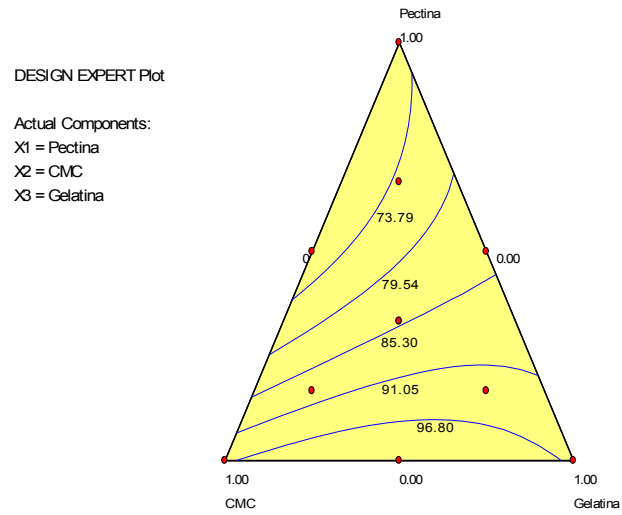


Figura 3.18 Gráfica de contornos y superficie de respuesta de la disolución en pH 7.0 de las películas de la mezcla CMC/P/G.

Índice de hinchamiento en fluido gástrico simulado.

Los datos obtenidos para el Índice de Hinchamiento de las películas se ajustan a un modelo cuadrático con la siguiente ecuación ($R^2 = 0.8798$ y $P = 0.024$).

$$Y = 783.80 P + 669.37 \text{ CMC} + 477.66 G + 338.21 P*\text{CMC} - 525.47 P*G - 401.57 \text{ CMC}*G.$$

En la figura 3.19 se observa la gráfica de contornos y la superficie de respuesta para este modelo, donde se puede observar que de los polímeros solos la P es la que más contribuye al índice de Hinchamiento y que las interacciones P*CMC y CMC*G contribuyen de manera positiva en el hinchamiento de la película. También se puede resaltar que la interacción de P y CMC (0.3:0.7 respectivamente) es la mezcla que mayor valor de índice de hinchamiento produce, corroborando con los resultados obtenidos en las propiedades mecánicas y de interacción con los demás fluidos que se asemejan a las condiciones de digestión humana.

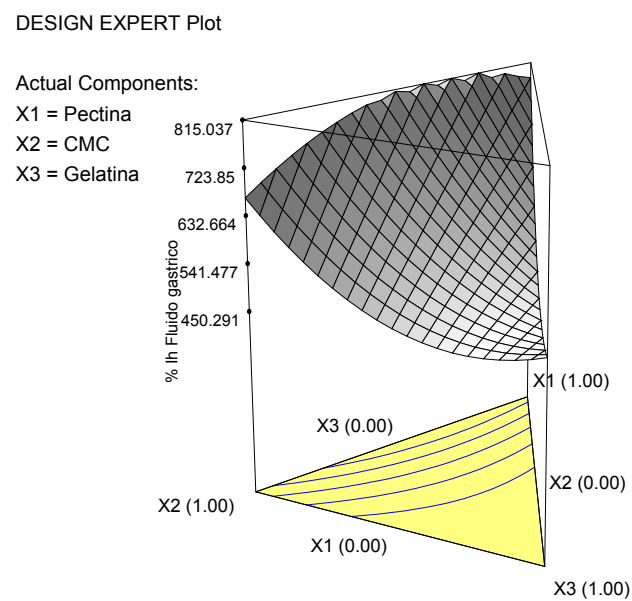
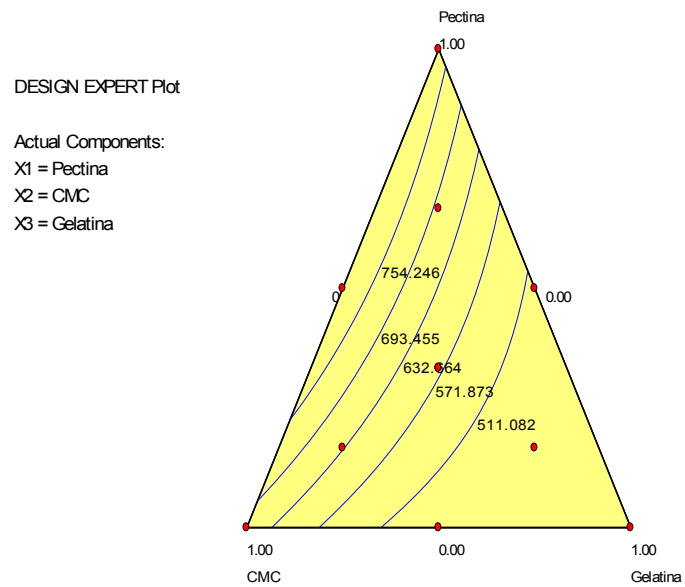


Figura 3.19 Gráfica de contornos y superficie de respuesta del índice de hinchamiento en FGS de las películas de la mezcla CMC/P/G.

Índice de hinchamiento en fluido intestinal simulado.

El comportamiento de las películas en cuanto al Índice de hinchamiento en fluido intestinal simulado se explica mediante un modelo cuadrático con la siguiente ecuación ($R^2 = 0.9185$; y $P = 0.0094$).

$$Y = 1578.63 P + 1739.52 \text{ CMC} + 137.19 G - 3493.00 P*\text{CMC} - 1054.45 P*G - 694.79 \text{ CMC}*G$$

En la figura 3.20 se observa la gráfica de contornos y la superficie de respuesta para este modelo, donde se puede observar que la G es el material que menos contribuye al hinchamiento de la película en tanto que la P y CMC presentan aproximadamente un hinchamiento 10 veces mayor que la G, la interacción $P*\text{CMC}$ es la que contribuye en menor proporción al hinchamiento de la película.

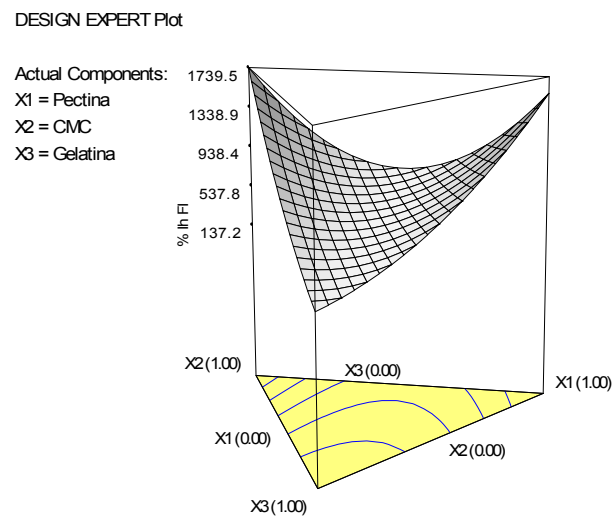
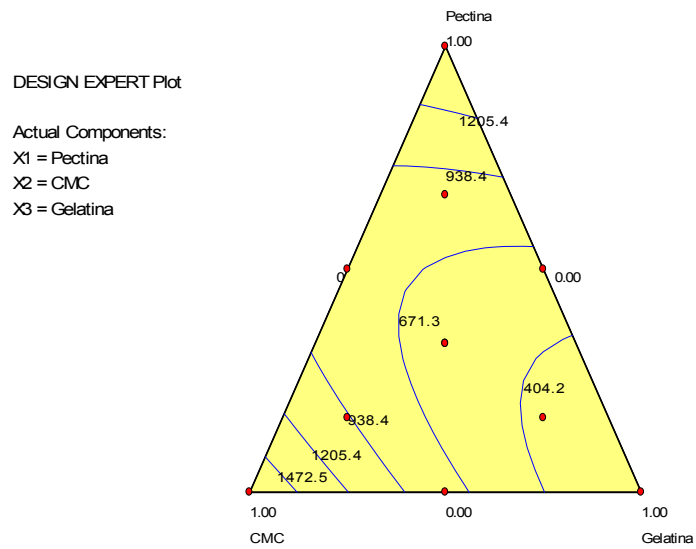


Figura 3.20 Gráfica de contornos y superficie de respuesta del índice de hinchamiento en FIS de las películas de la mezcla CMC/P/G.

Selección de la mezcla para encapsular *Lb. acidophilus*

Con el paquete estadístico Design Expert se seleccionó la mezcla que podría ser la más adecuada para encapsular las bacterias probióticas mediante secado por aspersión y que mejor resistiera las condiciones de pH del estómago e intestino delgado así como que presentará un Índice de hinchamiento adecuado. Las proporciones de cada material fueron las siguientes: Pectina = 0.63, CMC = 0.20 y G = 0.17.

3.8.2. Análisis estadístico de la mezcla CMC/P/PASL.

Disolución en HCl.

La disolución en el pH del estómago varió de 0% para la película de proteína aislada del suero de la leche (PASL) hasta 82.58% para la mezcla 0.667P-0.67CMC-0.167PASL. Los datos de disolución de las películas de mezclas de biopolímeros en HCl (pH del estómago) se ajustan a un modelo cuadrático, el cual explica la disolución en función del tipo de componente. El modelo fue el siguiente ($R^2 = 0.80$ y $P = 0.024$).

$$Y = 26.87P + 23.35 \text{ CMC} - 4.23 \text{ PASL} + 213.33 P \cdot \text{CMC} + 117.29 P \cdot \text{PASL}$$

En la figura 3.21 se observa la gráfica de contornos y la superficie de respuesta para este modelo, donde se puede observar que la PASL contribuye de manera negativa a la disolución de la película. Por lo que podría funcionar como buen sustituto de la gelatina en la elaboración de películas con las características requeridas de menor disolución antes de llegar al colon.

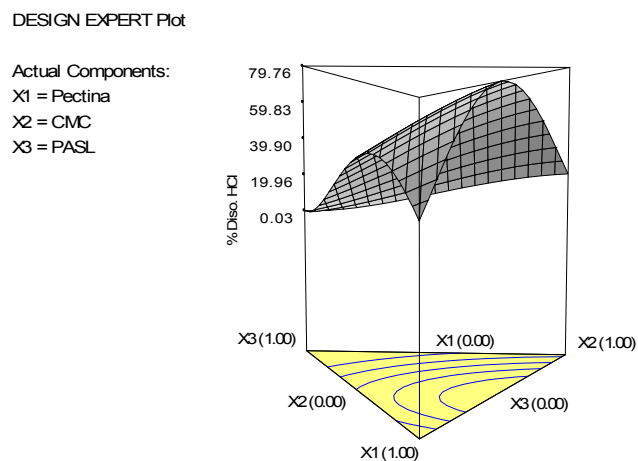
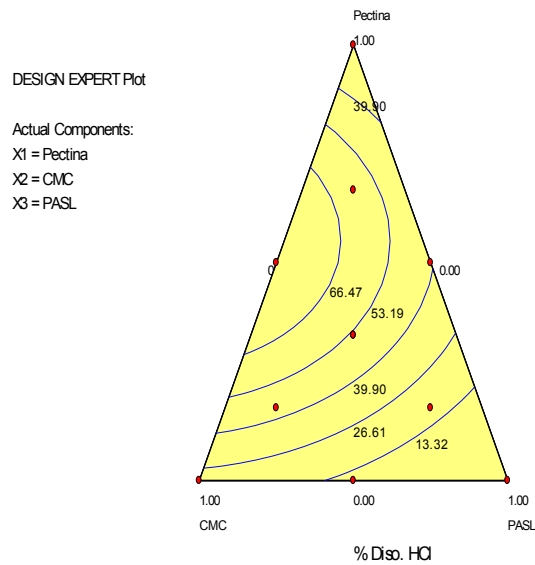


Figura 3.21 Gráfica de contornos y superficie de respuesta de la disolución en pH 1.2 de las películas de la mezcla CMC/P/PASL.

Disolución en Buffer.

La Disolución en el pH del intestino fue de 0% para PASL hasta 96.95% para CMC.

Un modelo cúbico ($R^2=0.94$ y $P = 0.015$) explica el comportamiento de las películas en función del componente, el modelo resultante fue el siguiente:

$$Y = 68.02 P + 98.77 \text{ CMC} - 6.84 \text{ PASL} + 57.22 P \cdot \text{CMC} - 46.76 P \cdot \text{PASL} - 112.33 \text{ CMC} \cdot \text{PASL} + 1183.61 P \cdot \text{CMC} \cdot \text{PASL}$$

En la figura 3.22 se observa la gráfica de contornos y la superficie de respuesta para este modelo, donde se puede observar que nuevamente es la PASL la que contribuye de manera negativa a la disolución de la película, en tanto que la combinación CMC*PASL contribuiría en mayor proporción a la no disolución de la película en este ambiente. Indicando que existe un efecto de sinergia entre ambos polímeros contribuyendo significativamente a la atenuación de la disolución en ambos fluidos que emulan al sistema digestivo.

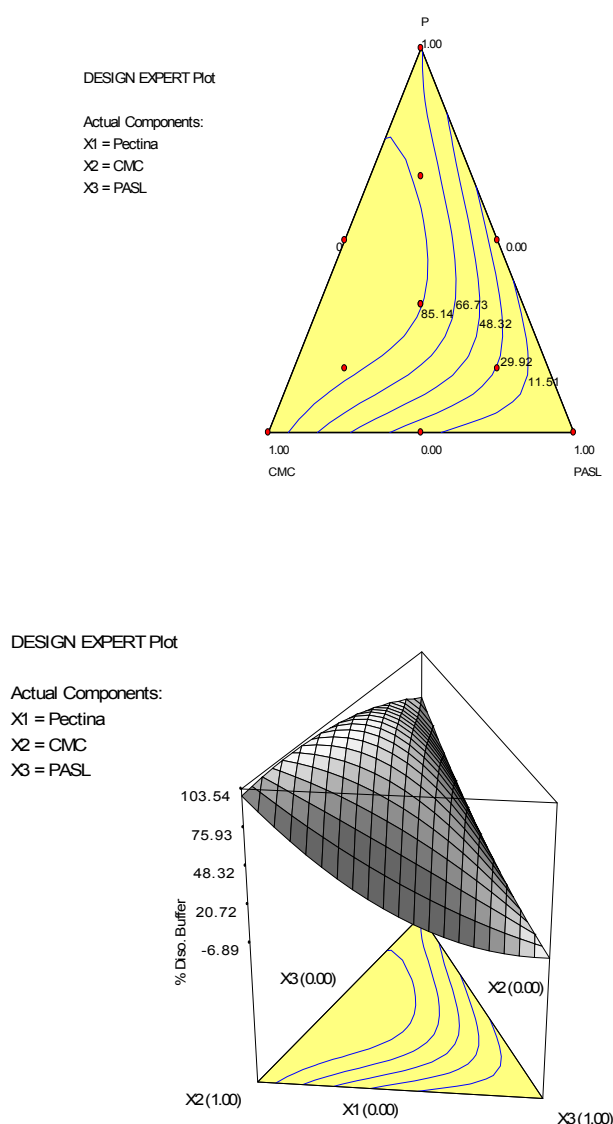


Figura 3.22 Gráfica de contornos y superficie de respuesta de la disolución en pH 7.0 de las películas de la mezcla CMC/P/PASL.

Índice de hinchamiento en fluido gástrico simulado.

El Ih en FGS estuvo en un intervalo de 110% para la mezcla 0.5P-0.5PASL, para la mezcla 0.5P-0.5CMC fue 834%, donde un modelo cuadrático explica la respuesta ($R^2=0.91$ y $P = 0.010$)

$$Y = 841.51P + 657.37CMC + 176.24 PASL + 770.28 P*CMC - 1162.57 P*PASL - 664.85 CMC*PASL$$

En la figura 3.23 se observa la gráfica de contornos y la superficie de respuesta para este modelo, donde se puede observar que la PASL es el material que contribuye en menor grado el hinchamiento de las películas en este ambiente FGS, en tanto que la interacción $P*PASL$ contribuiría de manera negativa al hinchamiento de la película. Por lo que una triple interacción podría formar películas con valores adecuados de hinchamiento, favoreciendo la liberación del producto micro encapsulado en el colon.

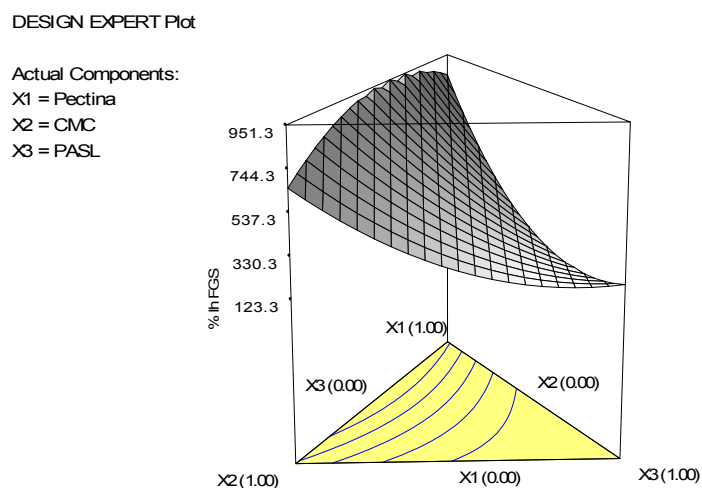
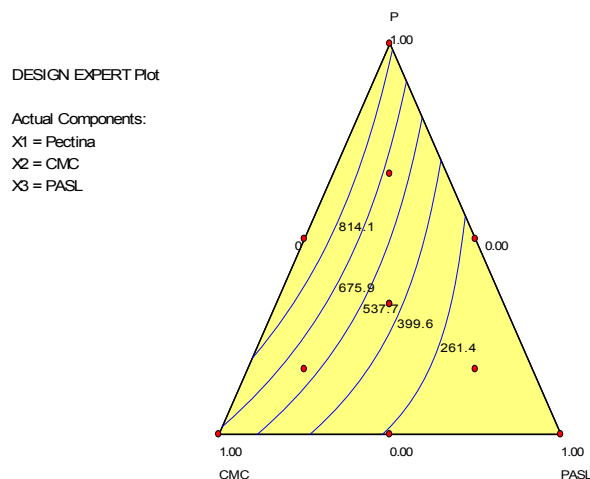


Figura 3.23 Gráfica de contornos y superficie de respuesta del índice de hinchamiento en FGS de las películas de la mezcla CMC/P/PASL.

Índice de hinchamiento en fluido intestinal simulado.

El lh en FIS, varió de 72.5% para PASL a 1993% para CMC, ajustándose los datos a un modelo cuadrático ($R^2=0.98$ y $P < 0.0001$).

$$Y = 1383.32P + 2027.45 \text{ CMC} + 65.29 \text{ PASL} + 121.81 P \cdot \text{CMC} - 2345.04 P \cdot \text{PASL} - 1661.10 \text{ CMC} \cdot \text{PASL}.$$

En la figura 3.24 se observa la gráfica de contornos y la superficie de respuesta para este modelo, donde se puede observar que la PASL sería el material que contribuiría en menor grado al hinchamiento de las películas en este ambiente y la CMC sería el material que más contribuiría al hinchamiento, en tanto que la interacción P*PASL contribuiría en mayor proporción de manera negativa al hinchamiento de la película. Por lo que la interacción P y CMC sería la adecuada para obtener mayor índice de hinchamiento en FIS, con alguna adición de PASL de forma de evitar la disolución de las películas.

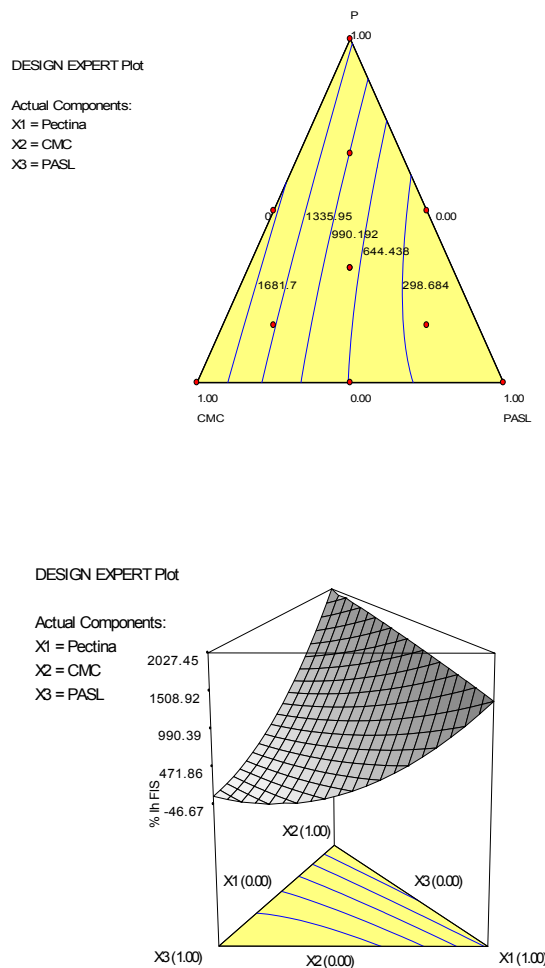


Figura 3.24 Gráfica de contornos y superficie de respuesta del índice de hinchamiento en FIS de las películas de la mezcla CMC/P/PASL

Selección de mezcla para encapsular *Lb. acidophilus*

Con el paquete estadístico Design Expert se seleccionó la mezcla que podría ser la más adecuada para encapsular las bacterias probióticas mediante secado por aspersión y que mejor resistiera las condiciones de pH del estómago e intestino delgado así como que presentará un índice de hinchamiento adecuada. Las proporciones de cada material fueron las siguientes: Pectina = 0.10, CMC = 0.49 y PASL = 0.41.

De los resultados obtenidos podemos concluir que un solo biopolímero no puede cubrir todos los requerimientos necesarios para lograr una liberación exitosa de los probióticos en el colon por lo que resulta evidente la conveniencia de realizar mezclas de ellos.

Se sabe que la pectina y la Carboximetil celulosa permanecen intactos en el estómago e intestino delgado, pero son degradados por las bacterias que habitan en el colon de los humanos.

Debido a la solubilidad de la pectina, algunos autores han sugerido la mezcla de pectina con otros materiales tanto naturales como sintéticos. Una formulación consistente de pectina, quitosano y HPMC mostró una liberación controlada del medicamento en la parte superior del tracto gastrointestinal, y la liberación del fármaco aumento en la presencia de enzimas pectinolíticas (Ofori-Kwakye, 2003). Dimantov y col., (2004) reportaron que la disolución de películas a base de pectina-almidón de maíz de alta amilosa (HACS) disminuyó conforme se incrementó la cantidad de HACS en condiciones del pH del estómago y del intestino. Ashford y col., (1993) desarrollaron un sistema novedoso de liberación específica en el colón a base de pectina. En experimentos *in Vitro* demostró que cuando se aplica pectina de alto

metoxilo como una cubierta mediante compresión esta logró proteger al núcleo de la tableta bajo condiciones que simulaban el tracto gastrointestinal y fue susceptible al ataque enzimático. En todos los voluntarios, las tabletas cubiertas con pectina se desintegraron en el colón indicando que la especificidad en el sitio había sido alcanzada y mostrando el potencial de este sistema.

Semde y col. (2000b) realizaron estudios de disolución en pellets de teofilina cubierta con varias mezclas de Pectina/EudragitRL30D, en presencia y ausencia de enzimas pectinolíticas. La velocidad de liberación de la teofilina dependió del contenido de pectina de alto metoxilo de la cobertura. La más baja liberación de la teofilina se obtuvo cuando el contenido de pectina fue de 20% en relación con el EudragitRL30D.

De los derivados de celulosa , la etil celulosa (EC), hidroxietilcelulosa (HEC), la hidroxipropil metilcelulosa HPMC, celulosa acetato talato, (CAP) ,hidroxi propil metilcelulosa ftalato (HPMCP), Hidroxipropil metilcelulosa acetato succinato (HPMCAS) y Celulosa microcristalina (MCC) son los materiales que más han sido estudiados para aplicarse en la elaboración de cubiertas entéricas, algunos de estos materiales pueden presentar inconvenientes cómo es el caso de la CAP en la cual los ácidos acético y ácido ftálico pueden hidrolizarse durante el almacenamiento y comprometer significativamente el grado de protección que la película proporciona ó como la HPMCP que se disuelve rápidamente en la parte superior del tracto intestinal.

Chambin, y col. (2004). Evaluaron gránulos y tabletas usando como matriz EC, MCC, y EC y teofilina como droga modelo, evaluaron la disolución in Vitro obteniendo el comportamiento de liberación del fármaco de estos tres materiales en el siguiente orden: liberación inmediata para la MCC, liberación firme para la HPMC y una

liberación continua y estable para la EC. Álvarez y col. (2004) evaluaron tabletas hechas a base de mezclas de HEC, EC y MCC y con teofilina como droga, encontraron que la velocidad de liberación del fármaco depende principalmente de la composición de la matriz, las formulaciones con alto contenido de HEC tuvieron una liberación más rápida, y las combinaciones de MCC–HEC fueron mejores que las correspondientes con EC-HEC.

La mayoría de los estudios reportados son para aplicaciones en la industria farmacéutica y pocos los relativos a la Industria de Alimentos, por otra parte existen muy pocos estudios referentes al uso de la CMC como cubierta entérica.

3.9 Supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* después del secado por aspersión

El porcentaje de supervivencia o rendimiento de encapsulación (PS ó RE) fue calculado de acuerdo a Picot y Lacroix (2004) y de acuerdo a Crittenden y col., (2005): mediante la siguiente fórmula:

$$RE = (N/N_0) \cdot 100 \quad (3.1)$$

donde:

N_0 = el número de bacterias viables (unidades formadoras de colonia) por gramo de materia seca antes de secar

N = es el número de bacterias viables (unidades formadoras de colonia) por gramo de materia después de secado en polvo.

En el cuadro 3.8 se muestra el porcentaje de supervivencia o rendimiento de encapsulación (RE), para cada una de las mezclas utilizadas en el proceso de encapsulación.

Cuadro 3.8. Rendimiento de encapsulación de *Lb.acidophilus*

MEZCLA	RENDIMIENTO (%)
CMC/P/G	94.62
CMC/P/PASL	99.77

Mediante el análisis estadístico ($\alpha = 0.05$) se puede concluir que para la mezcla CMC/P/G si existe una diferencia significativa entre el número de unidades formadoras de colonias antes del secado y el número existente después del proceso de secado por aspersión, aunque cabe aclarar que el número de células viables antes y después del secado disminuyó menos de un ciclo logarítmico. Para la mezcla CMC/P/PASL el análisis estadístico indica que no existe diferencia significativa entre el número de células viables antes y después del proceso de secado, de igual manera el número de células viables antes y después del secado disminuyó menos de un ciclo logarítmico, por lo tanto la mezcla que ofreció una mejor protección a las células de *Lb. acidophilus* durante el proceso de secado a la temperatura de entrada de aire de 141 °C y una temperatura de salida de 65 °C fue la formada por CMC, P y PASL.

Picot y Lacroix (2004) encapsularon *Bifidobacterium breve* R070 y *Bifidobacterium longum* R023 PASL mediante tres métodos, utilizando secado por aspersión, obteniendo un rendimiento máximo de 25.67% para *Bifidobacterium breve* mediante el método que consistía en la dispersión de células recién cosechadas en el suero de leche seguido por el secado por aspersión a una temperatura de entrada del aire de 160 °C y de salida de aire 80 °C.

Crittenden y col., (2005), encapsularon *Lb. acidophilus* La-5 mediante secado por aspersión obteniendo un rendimiento de 80 % aproximadamente utilizando una mezcla de caseinato de sodio, oligosacáridos y jarabe de glucosa.

Mosilhey (2003) obtuvo una disminución de ufc/g menor a un ciclo logarítmico después de encapsular mediante secado por aspersión *Lb. acidophilus* utilizando como material de pared diversas mezclas tales como goma arábica (GA)+ maltodextrina, GA+proteína de suero de leche, GA+soya, gelatina+proteína de soya, gelatina+alginato, GA+alginato, proteína de suero de leche+pectina. Por otra parte obtuvo una disminución de alrededor de 1 ciclo logarítmico después del secado por aspersión con las siguientes mezclas: GA+manitol, GA+carragenina, GA+lecitina, proteína de soya+pectina, gelatina+proteína de suero de leche y una reducción de 2 ciclos logarítmicos en las unidades formadoras de colonias cuando utilizó como material de pared: GA+pectina, gelatina+maltodextrina y gelatina+glicerol.

Fávaro y Grosso (2002), obtuvieron una reducción de 2 ciclos logarítmicos y un rendimiento de encapsulación de 1.92% cuando encapsularon mediante secado por aspersión *Lb. acidophilus* utilizando una mezcla de celulosa acetato ftalato, maltodextrina y fructooligosacáridos, otro resultado donde se obtiene también bajos rendimientos de encapsulación es el obtenido por Espina y Packard (1979) quienes reportaron una pérdida de al menos 2 ciclos logarítmicos cuando secaron *Lb. acidophilus* mediante secado por aspersión a una temperatura de entrada de 170 °C y temperaturas de salida de 75, 80 y 85°C.

3.10. Evaluación *in Vitro* de la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado en condiciones del tracto digestivo

Un factor muy importante para que las bacterias probióticas puedan ejercer su efecto benéfico en el tracto gastrointestinal del huésped, es el número viable en que se encuentren. Muchos factores inherentes al huésped pueden eliminar o reducir considerablemente el número de células de *Lb.acidophilus*, uno de estos factores es el pH predominante en el estómago.

En la figura 3.25 podemos observar el efecto que tuvo el FGS en la viabilidad de *Lb. Acidophilus*. Para la mezcla CMC/P/G se observa que hubo una disminución de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos entre el número de ufc/g en el microencapsulado que se obtuvo después del proceso de secado (DS), con respecto al tiempo 0, en cambio para la mezcla CMC/P/PASL la disminución para el mismo tiempo 0 fue de aproximadamente 1 ciclo logarítmico. Se puede observar que para los tiempos de 1 h y 2 h el número de ufc/g permaneció prácticamente estable disminuyendo ligeramente con respecto al tiempo 0, y siendo esta disminución constante para la mezcla CMC/P/PASL y en el caso de la mezcla CMC/P/G aumento ligeramente para el tiempo de 2 h.

Ambas mezclas utilizadas para microencapsular *L. acidophilus* mediante secado por aspersión mostraron su efectividad para proteger a las bacterias probióticas de las condiciones de pH =1.2 que presentaba el FGS.

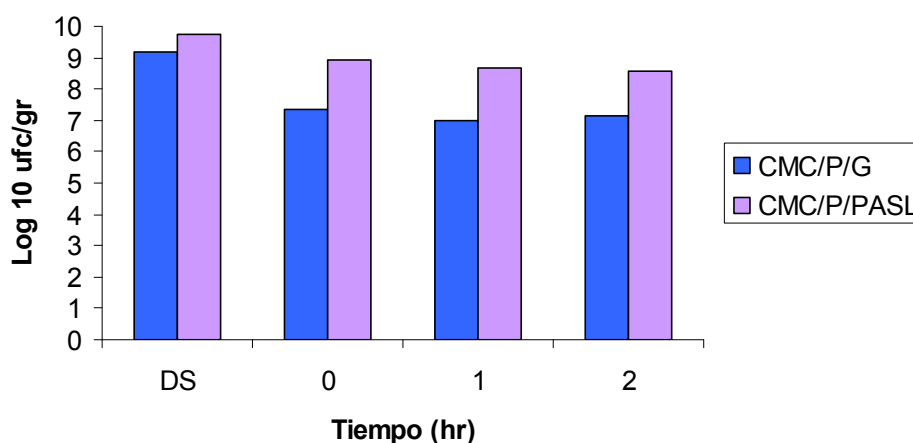


Figura 3.25 Efecto del FGS en la supervivencia de *Lb.acidophilus*.

En la figura 3.26 se muestran los resultados obtenidos para la supervivencia de *Lb. acidophilus* en fluido intestinal simulado (FIS). Las dos mezclas presentaron una disminución de sólo un ciclo logarítmico, pasando de 10^9 ufc/g en el polvo después del secado a 10^8 ufc/g inmediatamente después de que el microencapsulado es puesto en el FIS y se incuba a 37 °C (Tiempo=0). Para el tiempo de incubación de 1 h se observa que para la mezcla CMC/P/G hubo una disminución en el número de células pero para los tiempos restantes se presentó un aumento en el número de ufc/g. La mezcla CMC/P/PASL presentó un aumento en el número de células viables al tiempo 1, 2 y 3 h de incubación en FIS. Pero en el número de ufc/g entre ambas películas no se observa una diferencia significativa, considerando el mejor comportamiento las elaboradas con CMC/P/PASL.

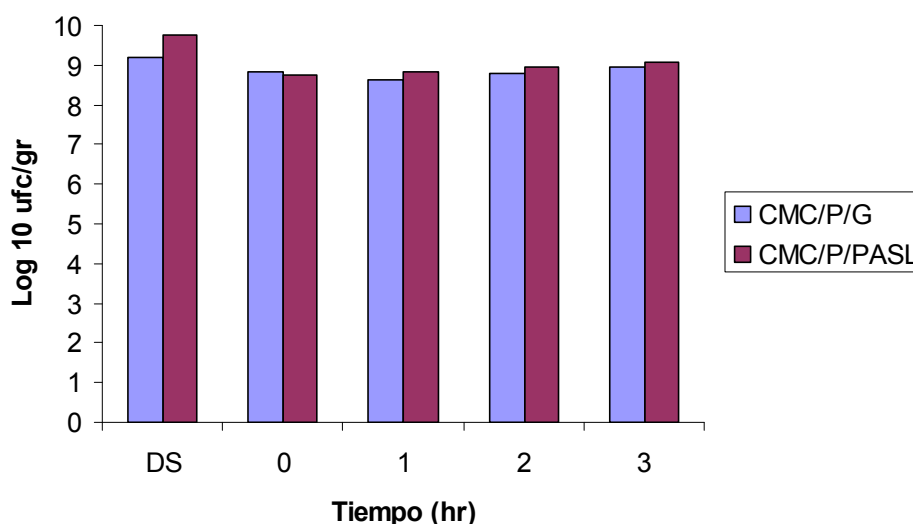


Figura 3.26 Efecto de FIS en la supervivencia de *Lb. acidophilus*.

En la figura 3.27 se muestran los resultados obtenidos para la supervivencia de *Lb. acidophilus* en sales biliares al 1% y 2%. Las bacterias microencapsuladas con la mezcla CMC/P/G presentaron una disminución de 2 y 3 ciclos logarítmicos con la concentración de 1% y 2 % de sales biliares respectivamente manteniéndose este comportamiento constante durante las tres horas de incubación; en tanto que las bacterias encapsuladas con la mezcla CMC/P/PASL sólo tuvieron una reducción de 1 ciclo logarítmico para ambas concentraciones de sales biliares, mostrando este mismo comportamiento durante las 3 horas de incubación.

El proceso de encapsulación y el material que constituye la pared de la microcápsula influyen en la viabilidad de las bacterias probióticas cuando se compara con bacterias que no han sido encapsuladas.

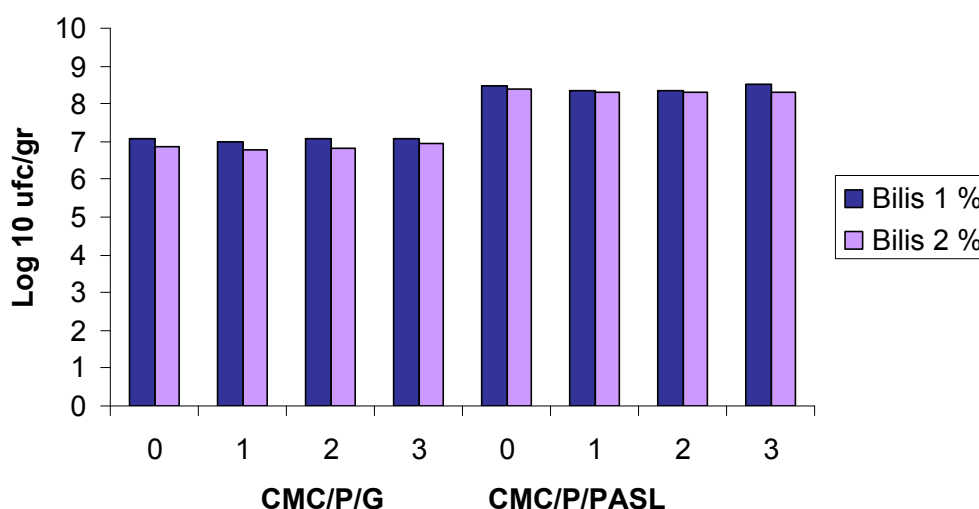


Figura 3.27 Efecto de sales biliares en la supervivencia de *Lb. acidophilus*

Con respecto al proceso de encapsulación existen publicaciones relacionadas con el efecto de diferentes materiales principalmente polisacáridos, pero pocas donde se involucre la mezcla de tres biopolímeros y en especial la mezcla de proteínas-polisacáridos como encapsulantes.

Las diferentes regiones del tracto gastrointestinal presentan diferentes niveles de acidez. El estómago y las regiones inmediatas presentan una elevada acidez y el pH puede llegar tan bajo como 1.5. Para que *Lb. acidophilus* pueda ser usado como un probiótico debe ser capaz de sobrevivir estas condiciones adversas y colonizar el intestino (Lankaputhra y Shah, 1995).

En este estudio se evaluó la sobrevivencia de *Lb. acidophilus* microencapsulado bajo condiciones simuladas del estómago (FGS y pH 1.2) durante 2 horas de incubación.

Algunos investigadores que han estudiado el efecto del pH en la supervivencia de *Lb. acidophilus* microencapsulado han obtenido resultados semejantes a los del presente trabajo, Fávaro y Grosso (2002) encapsularon *Lb. acidophilus* utilizando acetato de celulosa ftalato y obtuvieron una reducción de un ciclo logarítmico a pH 1 después de 2 horas de incubación.

Muthukumarasamy y col., (2006), encapsularon *Lb. reuteri* mediante el proceso de extrusión utilizando alginato y alginato-almidón como material encapsulante, obtuvieron también una reducción de un ciclo logarítmico después de 2 h de incubación en fluido gástrico simulado a 37 °C, en comparación células viables de *Lb. reuteri* sin encapsular murieron en su totalidad después de incubarse durante 90 min en las mismas condiciones descritas anteriormente cuando la población inicial fue también de 8 log 10 ufc/ml.

Existen también investigaciones en donde la viabilidad de la bacteria probiótica disminuyó significativamente, Desmond y col., (2002), encapsularon *Lb. paracasei* usando goma arábica y sometieron las microcápsulas a pH 3 durante 2 h a 37°C obteniendo una reducción de 6 a 4 unidades logarítmicas (7.3×10^7 a 2.71×10^1 ufc/ml).

Picot y Lacroix (2004) encapsularon *B. breve* y *B. longum* mediante secado por aspersión utilizando proteína aislada de suero de leche, inocularon las microcápsulas en fluido gástrico simulado a pH 1.9 y 37 °C obteniendo una disminución de 7 ciclos logarítmicos (10^8 a 10^1 ufc/g) durante los primeros 30 minutos de incubación.

Se cuentan con pocas publicaciones en donde se haya evaluado el efecto del FIS sobre la sobrevivencia de *Lb. acidophilus*, O’Riordan y col., (2001), sometieron células libres y microencapsuladas de *Bifidobacterium* por secado por aspersión usando almidón como material encapsulante a diferentes condiciones de pH tales como 7.0, 4.5 y 2.8 incubando durante 6 h a 37 °C, sus resultados indicaron que la encapsulación con este material no ofreció un aumento en la protección de las células bajo estas condiciones.

Varios estudios han documentado la tolerancia de las bacterias ácido lácticas a la bilis, pero la mayoría de los resultados indican la necesidad de identificar cepas de probióticos tolerantes a la bilis si van a ser usadas en alimentos funcionales (Mosilhey, 2003).

En el presente estudio se sometieron bacterias de *Lb. acidophilus* encapsuladas a sales biliares en concentración de 1 % y 2 %. Los resultados mostrados en la figura 3.27 indican que la mezcla CMC/P/PASL fue la que ofreció una mejor protección a *Lb. acidophilus* , ya que sólo se redujo su numero en un ciclo logarítmico (1.22 log ufc/g) para ambas concentraciones de sales biliares, en tanto que en la mezcla

CMC/P/G hubo una reducción de 2 ciclos logarítmicos (2.13 log ufc/g) para la concentración de 1 % de sales biliares y de 3 ciclos logarítmicos (2.43 log ufc/g) para la concentración de 2 % de sales biliares.

Holcomb y col., (1991) reportaron que la viabilidad de *Lb.acidophilus* y *B. bifidum* no fue afectada por la concentración de bilis en el rango de 0.15 a 0.45%. Esto puede deberse a la baja concentración de sales que se utilizaron y que no es representativa de la concentración que se encuentra en el organismo humano. Sin embargo la concentración de sales biliares máxima que se empleo en el presente estudio fue aproximadamente 4 veces más alta que la usada por Holcomb y col., (1991).

Ding y Shah (2007), encapsularon 8 cepas de bacterias probióticas entre ellas *Lb. acidophilus* en matrices de alginato, la tolerancia a la bilis se realizó sometiendo las bacterias libres y microencapsuladas a sales biliares, la viabilidad de las células libres fue reducida en 6.51 log ufc/ml contra una pérdida de 3.36 log ufc/ml para las bacterias microencapsuladas.

Mosilhey (2003), incubó células libres y microencapsuladas a 1, 2 y 4 % de sales biliares, obtuvo para las células libres una disminución de 1, 3, 4 y 5 ciclos logarítmicos después de 0,1, 2, y 3 h de incubación respectivamente usando sales biliares al 1 %, y no se detectó formación de colonias cuando las microcápsulas se sometieron a 4 h de incubación. En cambio las células microencapsuladas mostraron en general mayor tolerancia a la bilis para todas las concentraciones estudiadas. Las células microencapsuladas con leche de soya+goma arábica fueron las que sobrevivieron mejor en la bilis mostrando una reducción de 2 ciclos logarítmicos para la concentración de 1 % de sales biliares y 3 h de incubación y para la concentración de 2 % de sales biliares hubo una reducción de 4 ciclos logarítmicos después de 3 h de incubación.

Después de pasar a través de la barrera del estómago, las bacterias probióticas llegan al duodeno donde tiene lugar la secreción de sales biliares y donde el pH es aproximadamente neutro, de ahí que si logran sobrevivir el proceso de digestión gástrica y el efecto de las sales biliares se puede garantizar el establecimiento y crecimiento de estos microorganismos en el colon y por lo tanto su efecto benéfico en la salud del huésped.

De los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se concluye que la cubierta formada por CMC/P/PASL es la que asegura una protección más completa de la bacteria probiótica *Lb. acidophilus*. Durante el proceso de secado por aspersión prácticamente el 100 % de las bacterias sobreviven pasando de 5.9×10^9 ufc/gr antes del proceso de encapsulación a 5.6×10^9 ufc/gr después del proceso de encapsulación, siendo este valor muy alto ya que la mayoría de los trabajos reportan una disminución de al menos un ciclo logarítmico, la protección a las condiciones ácidas (pH 1.2) del estómago también fue muy buena ya que la reducción fue de aproximadamente un ciclo logarítmico durante el tiempo cero es decir durante los primeros minutos que permaneció el probiótico encapsulado en el FGS, manteniéndose el valor constante durante las próximas 2 horas, esto nos indica que la cubierta de biopolímeros protegió eficazmente a las bacterias ya que es muy poco soluble en las condiciones del FGS y también el índice de hinchamiento es muy bajo lo cual no permitió la liberación de las bacterias.

Con respecto a la supervivencia de *Lb. acidophilus* en FIS, se observó al tiempo cero una disminución de un ciclo logarítmico, pero posteriormente el número de células viables aumentó, indicando también una muy buena protección en las condiciones del intestino delgado ya que la cubierta de estos biopolímeros presenta una baja solubilidad en estas condiciones aunque se logró una cierta liberación ya

que aumento el número de células viables pasando de 5.7×10^8 ufc/gr a 1.23×10^9 ufc/gr.

Para la prueba de supervivencia de *Lb. acidophillus* en sales biliares, se obtuvo una disminución de un ciclo logarítmico para el tiempo cero, pero se comprueba que la cubierta protegió eficazmente a la bacteria probiótica y que no existió liberación de las bacterias porque su número se mantuvo constante en el mismo orden de magnitud de 2.93×10^8 ufc/gr para el tiempo cero y de 3.44×10^8 ufc/gr a las 3 horas de incubación para la concentración de 1 % de sales biliares, para la concentración de 2 % de sales biliares se obtuvieron los valores de 2.36×10^8 ufc/gr para el tiempo cero y de 2.07×10^8 ufc/gr después de 3 horas de incubación en estas condiciones. Con base en los resultados presentados podemos concluir que la cubierta formada por CMC/P/PASL asegura que *Lb. acidophillus* resista las condiciones de estrés a que se encuentra sometido durante el secado por aspersión, además protege eficazmente al probiótico de las condiciones muy ácidas y enzimáticas del fluido gástrico simulado, así como del de las condiciones del fluido intestinal simulado donde se encuentran presente las enzimas pancreáticas y finalmente las protege también de las sales biliares, asegurando así que *Lb. acidophillus* llegue viable y en número suficiente al colon.

4 CONCLUSIONES

- Los materiales seleccionados a partir de las propiedades fisicoquímicas que se evaluaron fueron la P y la CMC. La P presentó los valores más bajos de disolución en condiciones de pH del estómago y del intestino delgado con valores de 73.59 % y 83.78 % respectivamente, lo cual nos proporciona la certeza de que no habrá una liberación de las bacterias probióticas en el estómago ni en la parte superior del intestino.
- La P y la CMC fueron los materiales con el mayor Índice de hinchamiento (270.07 % y 737.28 % respectivamente) en FGS, y también fueron las que por mayor tiempo permanecieron integras bajo estas condiciones, lo anterior nos indica que estos materiales serán susceptibles del ataque enzimático de las bacterias que se encuentran en el colón y la liberación de *Lb. acidophilus* de la microcápsula será en su mayoría consecuencia de un proceso fermentativo.
- En la evaluación de las propiedades mecánicas la CMC presentó los valores más altos para la resistencia a la tensión, elongación y módulo de Young con 69.17 MPa, 11.75 % y 1912.20 MPa respectivamente. Lo anterior nos indica que la CMC proporcionaría buenas propiedades mecánicas a las

microcápsulas durante su paso a través del tracto gastrointestinal superior y durante su manejo y almacenamiento.

- A pesar de que la CMC y la P presentaron los valores más altos de difusividad térmica ($14.728 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y $16.321 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ respectivamente), se seleccionaron como materiales encapsulantes debido a que el proceso de secado dura sólo unos segundos y para la supervivencia de las bacterias probióticas resulta muy importante las temperatura del aire de entrada y la temperatura del aire de salida del secador y ambos factores podían controlarse en el equipo de secado.
- El análisis estructural y de Energía de Activación (33.45 KJ/mol para la P y 27.08 KJ/mol para CMC) nos indican que las películas de ambos biopolímeros poseen una estructura homogénea y compacta por lo cual podrían ser una buena barrera al oxígeno el cual resulta letal para *Lb. Acidophilus*.
- El rendimiento de encapsulación para el proceso de secado por aspersión fue de 99.77 % para la mezcla CMC/P/PASL y de 94.62 % para la mezcla CMC/P/G los cuales son valores muy altos, esto nos muestra que ambas coberturas protegen eficazmente a *Lb. Acidophilus* del estrés y deshidratación que sufre la bacteria durante este proceso y también nos indica que las condiciones de secado seleccionadas fueron adecuadas minimizando el daño provocado a las bacterias.
- La mezcla CMC/P/PASL mostró mejores resultados en la evaluación *in Vitro* de la supervivencia de *Lb. acidophilus* en condiciones del tracto gastrointestinal. En FGS se observó una disminución de aproximadamente 1 ciclo logarítmico manteniéndose este valor constante durante las siguientes 2

h en contraste la mezcla CMC/P/G presentó una disminución de 2 ciclos logarítmicos.

- Para la prueba en FIS ambas mezclas CMC/P/G y CMC/P/PASL mostraron una disminución de sólo un ciclo logarítmico en la supervivencia de *Lb. Acidophilus* al tiempo cero de incubación, observándose un incremento de las células viables a los tiempos 1, 2, y 3 h.
- Las bacterias encapsuladas con la mezcla CMC/P/PASL mostraron una reducción de sólo un ciclo logarítmico para las concentraciones de 1% y 2 % de sales biliares.
- La mezcla CMC/P/PASL resultó ser la más adecuada para encapsular *Lb. Acidophilus* mediante secado por aspersión, presentando una buena perspectiva para lograr la liberación específica de estos probióticos en el colon, que se encuentren además viables y en número suficiente para que ejerzan su efecto benéfico en el huésped.

5 PERSPECTIVAS A FUTURO

Al término de este proyecto de investigación, considero recomendable proponer algunos temas de estudios que servirían para ampliar el conocimiento de estos biopolímeros y la interacción polisacáridos-proteínas.

En primer lugar sería conveniente medir la difusividad térmica a las mezclas empleadas para la encapsulación de los probióticos y a otras mezclas que se pudieran proponer en base a la caracterización ya realizada de los biopolímeros, para conocer realmente el valor de difusividad térmica y como esta influyó en la viabilidad de *Lb. acidophilus* durante el secado por aspersión.

En segundo lugar a partir de la caracterización de los biopolímeros solos es posible desarrollar gran cantidad de mezclas para diversas aplicaciones en alimentos.

El tercer lugar medir la permeabilidad al oxígeno de las películas de biopolímeros solos y de sus mezclas para poder correlacionar la permeabilidad al oxígeno y el valor del parámetro de Energía de activación obtenido mediante análisis termogravimétrico.

En cuarto lugar realizar un estudio de estabilidad de las microcápsulas en condiciones de almacenamiento.

En quinto lugar aplicar los probióticos ya encapsulados en algún alimento, para estudiar su desempeño en el medio ambiente del alimento.

Finalmente, la estrategia empleada en este trabajo de caracterizar primero los biopolímeros evaluando propiedades críticas para su buen desempeño de acuerdo al objetivo planteado resulto ser exitosa, así como la utilización del diseño de experimentos y análisis estadístico de los resultados. Esta estrategia y metodología

de trabajo se podría emplear en otros proyectos, para garantizar la obtención de buenos resultados.

6 GLOSARIO

A Almidón waxy.

Alimento colónico Alimento no digerible el cual alcanza el colon, generalmente en la forma de un carbohidrato no digerible.

Alimento Funcional Un alimento modificado o ingrediente alimenticio que proporciona un beneficio a la salud más allá de satisfacer los requerimientos tradicionales de nutrientes.

BAL Bacterias ácido lácticas

Bilis La bilis es secretada por el hígado y su función es la emulsificación y solubilización de los lípidos que se encuentran en los alimentos que consume el ser humano. La bilis tiene también la capacidad de afectar los fosfolípidos y proteínas de la membrana celular de las bacterias probióticas alterando la homeostasis celular.

Biopolímero Son aquellos polímeros producidos por organismos vivos, tales como la celulosa, almidón, pectina, y las proteínas.

CMC Carboximetilcelulosa sódica

CMC/P/G Mezcla de Carboximetilcelulosa de sodio, pectina y gelatina seleccionada para microencapsular Lb acidophilus , mediante secado por aspersión.

CMC/P/PASL Mezcla de Carboximetilcelulosa de sodio, pectina y proteína aislada de suero de leche seleccionada para microencapsular Lb acidophilus , mediante secado por aspersión.

CMC/P/WPI	Mezcla de Carboximetilcelulosa de sodio, pectina y proteína aislada de suero de leche (whey protein isolated) seleccionada para microencapsular <i>Lb acidophilus</i> , mediante secado por aspersión.
Cubierta entérica	Es una película a base de polímeros sintéticos y/o biopolímeros cuya desintegración depende del pH, haciendo que ésta sea insoluble en el fluido gástrico y soluble en el fluido intestinal.
Ea	La energía de activación significa la cantidad de energía que se requiere para evaporar un mol de agua del material disperso en agua y sometido a secado isotérmico.
Elongación	Indica la capacidad de la película para estirarse antes de romperse cuando se somete a una prueba de tensión.
FGS	Fluido gástrico simulado. Disolver 2.0 g de cloruro de sodio y 3.2 g de pepsina en 7.0 mL de ácido clorhídrico y suficiente agua para aforar a 1000 mL.
FIS	Fluido intestinal simulado. Disolver 6.8 g de fosfato de potasio monobásico en 250 mL de agua, mezclar y añadir 190 ml de hidróxido de sodio 0.2 N y 400 mL de agua. Añadir 10.0 g de pancreatina, mezclar y ajustar la solución resultante con hidróxido de sodio 0.2 N hasta ajustar el pH a 7.5 ± 0.1 . Diluir con agua hasta aforar a 1000 mL.
<i>in Vitro</i>	Técnica para realizar un experimento en condiciones de controladas de laboratorio, fuera de un organismo vivo.
LAB	Bacterias ácido lácticas (Lactic Acid Bacteria)
<i>Lb. acidophilus</i>	Bacteria del género <i>Lactobacillus</i> considerada probiótico.
Módulo de Young	Es la razón entre dividir el valor de la resistencia a la tensión entre el valor de la elongación de la parte lineal de

la curva de resistencia a la tensión-elongación, durante una prueba de tensión.

MC	Metil celulosa.
HPC	Hidroxipropilcelulosa.
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa.
P	Pectina cítrica rápida, pectina de alto metoxilo que tiene la capacidad para gelificar en pocos segundos.
PASL	Proteína aislada de suero de leche.
Probiótico	Un cultivo de un sólo microorganismo o mezcla de microorganismos los cuales, cuando se administran a animales o humanos afectan benéficamente al huésped.
Prebiótico	Un alimento colónico que favorece el crecimiento de bacterias intestinales benéficas (ejemplo, <i>Lactobacilos</i> y <i>Bifidobacterias</i>)
RE	Rendimiento de encapsulación ó porcentaje de supervivencia. Es el número de bacterias viables después del proceso de secado por aspersión con respecto al número de bacterias viables antes del secado por aspersión.
Resistencia a la tensión	Es el esfuerzo o la fuerza desarrollada por la película durante una prueba de tensión.
Secado por aspersión	Consiste en la atomización de una emulsión o una dispersión, en una corriente de aire caliente en una cámara de secado. El agua se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente en la emulsión quede atrapado dentro de una película de material encapsulante.

SGF	Fluido gástrico simulado (simulated gastric fluid)
SIF	Fluido intestinal simulado (simulated intestinal fluid)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias (ufc), término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células. Se reporta como unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (ufc/g ó ml)
WPI	Proteína aislada de suero de leche (Whey protein isolate)

7 TRABAJOS PRESENTADOS DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Se presentaron los siguientes trabajos en diferentes congresos nacionales e internacionales:

- Characterization of Polysaccharide-based Films with potencial use as Enteric Coating: A Comparative Study. 3rd International Congress Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Querétaro, Qro. México, October 14-17, 2008.

En este congreso se obtuvo el primer lugar en la sesión de poster del día 15th de octubre.

- Difusividad térmica y microestructura de películas de materiales usados como cubiertas entéricas. XXV Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales. Zacatecas, Zac. México., 26-30 de septiembre de 2005.

- Análisis térmico para la selección de materiales de barrera en la microencapsulación de bacterias probióticas por secado por aspersión. XXVII encuentro nacional de la AMIDIQ. Ixtapa, Gro., 2-5 de mayo de 2006.

- Selection of wall materials by termal analysis for the microencapsulation by spray-drying of probiotic bacteria. IFT Annual Meeting & Food Expo. Orlando, Florida, USA, 24-28 de Junio de 2006.

- Caracterización de biopolímeros con potencial de uso como cubiertas entéricas. XXXVI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. México, D.F., 11-14 de septiembre de 2006.

- Propiedades físicas de películas de polisacáridos con potencial de uso en cubiertas entéricas. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos - Córdoba 2006. Córdoba, Argentina., 15-17 de noviembre de 2006.

- Propiedades de disolución e índice de hinchamiento de mezclas de proteínas de suero lácteo y polisacáridos con potencial de uso como cubiertas entéricas. IV Jornadas Internacionales de Proteínas y Coloides Alimentarios. Buenos Aires Argentina., 11-13 de julio de 2007.

8 REFERENCIAS

1. Albuquerque- Cavalcanti O., Van den Mooter G., Caramico-Soares I. and Kinget Renaat. 2002. Polysaccharides as Excipients for Colon-Specific Coatings. Permeability and Swelling Properties of Casted Films. Drug Development and Industrial Pharmacy., 28, 157-164.
2. Alistair M. 1995. Food polysaccharides and their applications. Marcel Dekker. USA.
3. Allen S. J., Okoko B., Martínez E., Gregorio G. and Dans L.F. 2004. Probiotics for treating infectious diarrhoea. Cochrane Database Syst Rev; CD003048
4. Alvarez-Fuentes M., Fernández-Arévalo M. L., González-Rodríguez M., Cirri M. and Mura P. 2004. Development of Enteric-coated Timed-release Matriz Tablets for Colon Targeting. Journal of Drug Targeting., 12, 607-612.
5. Anker M., Stading M. and Hermansson, A.M. 2002. Relationship between the microstructure and the mechanical and barrier properties of whey protein films. J Agric Food Chem, 48, 3806-3816.
6. Ashford M., Fell J.T., Attwood D., Sharma H. and Woodhead P. 1993. An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to colon. J. Control. Rel., 26, 213-220.
7. Avaria G., Morales J. E., Trichet C., Saavedra R. and Gatina N. Medidas de difusividad térmica en copolímeros vinílicos mediante el efecto fotoacústico. XIII Simposio Chileno de Física. Concepción, Chile. 13-15 Nov de 2002.
8. Banerjee R., and Chen H. 1995. Functional properties of edible films using whey protein concentrate. J. Dairy Sci., 78, 1673-1683.
9. Blanchon S., Couarraze G., Rieg-Falson F., Cohen G. and Puisieux F. 1991. Permeability of Progesterone and a Synthetic Progestin Through Methacrylic Films. International Journal Pharm., 72, 1-10.
10. Bussemer T., Otto I. and Bodmeier R. 2001. Pulsatile drug-delivery systems. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 18, 433-458.
11. Callister W.D. 2000. Materials Science and Engineering, 5th ed., Wiley. New York. pp. 800-801.

12. Cavalcanti O. A., Van den Mooter G., Caramico-Soares I. and Kinget R. 2002. Polysaccharides as Excipients for Colon-Specific Coatings. Permeability and Swelling Properties of Casted Films. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28, 157-164.
13. Chambin O., Champio D., Debray C., Rochat-Gonthier M.H., Le Meste M. and Pourcelot Y. 2004. Effects of different cellulose derivatives on drug release mechanism studied at a preformulation stage. *Journal of Controlled Release*, 95, 101-108.
14. Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L. and Collins J.K. 1998. Development and application of an in vivo methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal Applied Microbiology*, 84, 759-768.
15. Chen K.N., Chen M.J. and Lin C. W. 2006. Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). *Journal of Food Engineering*, 76, 313-320.
16. Chourasia M.K. and Jain S.K. 2004. Polysaccharides for colon targeted drug delivery. *Drug Delivery*, 11, 129-148.
17. Ciftci K. 1996. Alternative approaches to the treatment of colon cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 42, 160-170
18. Clydesdale F. 2004. Functional Foods: Opportunities & Challenges. *Food Technology*, 58, 35-40.
19. Coffey D.G., Bell D.A. and Henderson A. 1995. Cellulose and Cellulose Derivatives. In Alistair M. Stephen (ed). *Food polysaccharides and their Applications*. Marcel Dekker Inc. USA. pp. 123-153.
20. Collins J.K., Thorton G. and Sullivan G.O. 1998. Selection of probiotics strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8, 487-490.
21. Corcoran B.M., Ross R.P., Fitzgerald G.F. and Stanton C. 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal Applied Microbiology*, 96, 1024-1039.
22. Coughlan K., Shaw N.B., Kerry J.F. and Kerry J.P. 2004. Combined effect of proteins and polysaccharides on physical properties of whey protein concentrate-based edible films. *J. Food Sci.*, 69, 271-275.
23. Crank J. 1975. *The mathematics of diffusion*. Clarendon Press. Oxford
24. Crittenden R., Laitila A., Forssell P., Matto J., Saarela M., Mattila-Sandholm T. and Myllarinen P. 2001. Adhesion de bifidobacteria to Granular Starch and Its Implications in Probiotic Technologies. *Applied and Environmental Microbiology*. 3469-3475.

25. Crittenden R., Sanguansri L., Augustin M.A. 2005. WO/2005/030229. Probiotic Storage and Delivery.
26. Cross M.L., Mortensen R.R., Kudsk J. and Gill H.S. 2002. Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. Med. Microbial Immunol. (Berl)., 191, 49-53
27. Cummings J.H. and Englyst H.N. 1987. Fermentation in the human large intestine and available substrates. Am. J. Clin. Nutr., 45, 1243-1247.
28. Dave R.I. and Shah N.P. 1997a. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. International Dairy Journal, 7, 31-41.
29. Debeaufort F., Martin-Polo M. and Voilley A. 1993. Polarity , homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible films. J Food Sci, 58, 426-429.
30. Debeaufort F. and Voilley A. 1997. Methylcellulose-based edible films and coatings: Mechanical and thermal properties as a function of plasticizer content. Journal Agriculture Food Chemistry, 45, 685-689.
31. Desmond C., Stanton C., Fitzgerald G.F., Collins, K. and Ross, R.P. 2001. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improved performance during spray drying. International Dairy Journal, 11, 801-808.
32. Desmond C., Ross R.P., O'Callaghan E., Fitzgerald G. and Stanton C. 2002. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray dried powders containing gum acacia. Journal Applied Microbiology, 93, 1003-1011.
33. Desmond C., Stanton C., Fitzgerald G.F., Collings K. and Ross R.P. 2002. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. Int Dairy, 12, 183-190.
34. Dimantov A., Kesselman E. and Shimoni E. 2004. Surface characterization and dissolution properties of high amylose corn starch-pectin coatings. Food Hydrocolloids, 18, 29-37.
35. Ding W.K. and Shah N.P. 2007. Acid, bile and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. Journal of Food Science, 72, M446-M450.
36. Doleyres Y., Fliss I. and Lacroix C. 2004. Increased stress tolerance of *Bifidobacterium longum* and *Lactococcus lactis* produced during continuous mixed-strain immobilized-cell fermentation. J Appl Microbiol, 97,527-539.

37. Doleyres Y. and Lacroix C. 2005. Technologies with free and immobilized cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *Int Dairy J*, 15, 973-988.
38. Donohue D.C., Deighton M., Ahokas J.T. and Salminen S. 1993. Toxicity of lactic acid bacteria. In: Saminen S., von Wright A., (Eds.) *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, New York, pp. 307-313.
39. Donohue D.C. and Salminen S. 1996a. Safety assessment of probiotic bacteria. *Asia Pac. J. Clin Nutr.*, 5, 25-28.
40. Donohue D., Salminen S. and Marteau P. 1998. Safety of probiotic bacteria. In: Salminen S., von Wright A. (eds.), *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, New York, pp.369-384.
41. Dziezak J.D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, 42, 136-151.
42. Englyst H.N. and Cummings J.H. 1985. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 42, 778-787.
43. Englyst H.N. and Cummings J.H. 1986. Digestion of the polysaccharides of banana (*Musa paradisica sapientum*) in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, 44, 42-50.
44. Englyst H.N. 1987. Digestion of the polysaccharides of potato in the small intestine of man. *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 423-431.
45. Erdohan Z.Ö. and Turhan K.N. 2005. Barrier and mechanical properties of methylcellulose-whey protein films. *Packag. Technol. Sci.*, 18, 295-302.
46. Espina F. and Packard V.S. 1979. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in a spray-drying process. *Journal Food Protection*, 42, 149-152.
47. Famularo G., de Simona C., Gionchetti P. and Campieri M. 2000. The role of digestive microflora and probiotics in inflammatory bowel disease. *Micronb. Ecol. Health Dis.*, 12 (supp), 138-145.
48. Fang Y., Tung M.A., Britt I.J., Yada, S. and Dalgleish D.G. 2002. Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. *J. Food Sci.*, 6, 188-193.
49. FAO/WHO. 2001. Evaluation of Health and Nutritional Properties of Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report from FAO/WHO Expert Consultation, 1-4 October 2001, Cordoba, Argentina.
50. Fávaro-Trindade C.S. and Grosso C.R.F. 2002. Microencapsulation of *L.acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival

at the pH values of the stomach and in bile. Journal of Microencapsulation, 19, 485-494.

51. Felton L.A., Haase M.M., Shah N.H., Zhang G., Infeld M.H., Malick A.W. and McGinity J.W. 1995. Physical and enteric properties of soft gelatin capsules coated with Eudagrit® L 30 D-55. Int. J. Pharm., 113, 17-24.
52. Fennema, O. 1996. Food Chemistry. third edition. Marcel Dekker Inc. USA.
53. Fooks L.J., Gibson G.R. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. British Journal of Nutrition, 88, 39-49.
54. Fukui E., Miyamura N. and Kobayashi M. 2001. An *in vitro* investigation of the suitability of press-coated tablets with hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate (HPMCAS) and hydrophobic additives in the outer shell for colon targeting. J. Controlled Release, 70, 97-107.
55. Gardiner G.E., O'Sullivan E., Kelly J., Auty M.A., Fitzgerald G.F., Collins J.K., Ross R.P. and Stanton C. 2000. Comparative survival rates of human derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. Appl. Environ. Microbiol., 66, 2605-2612.
56. Gibney M. J., Kearney M. and Kearney J. M. 1997. Introduction-IEFS pan-EU survey of consumer attitudes to food, nutrition and health. Eur J Clin Med., 51, S2.
57. Gilliland S.E. and Rich C.N. 1990. Stability during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* grown at different pH. J Dairy Sci. 73, 1187-1192.
58. Gomes A.M.P. and Malcata F.X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus* : Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science and Technological, 10,139-157.
59. Heath H.B. 1985. The flavor trap. Food Flavors, Ingredients, Packaging and Processing, 7, 21-25.
60. Hergenrother R.W., Wabers H.D. and Cooper S.L. 1992. The effect of chain extenders and stabilizers on the in vivo stability of polyurethanes. J. Appl. Biomat., 3, 17-22.
61. Holcomb J. E., Frank J.F. and McGregor J.U. 1991. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in soft-serve frozen yogurt. Cultured Dairy Products Journal, 26, 4.
62. Holzapfel W.H. and Schillinger U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. Food Research International, 35,109-116.

63. Hoyos R. and Urrego L. 1997. Empaques y/o películas comestibles y biodegradables. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de las Américas, México.
64. Huges K. 2007. Functional Foods Find Demand. Prepared Foods. January. NS13-NS18.
65. Ishibashi N. and Shimamura S. 1993. Bifidobacteria: research and development in Japan. Food Technology, 47,126-135.
66. Isolauri E., Juntunen M., Rautanen T., Sillanpää P. and Koivula T. 1991. A lactobacillus strain (lactobacillus GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. Paediatrics, 88, 90-97.
67. Iyer C., Phillips M. and Kailasapathy K. 2005. Release studies of *Lactobacillus casei* strain Shirota from chitosan-coated alginate-starch microcapsules in *ex vivo* porcine gastrointestinal contents. Letters in Applied Microbiology, 41, 493-497.
68. Jackson L.S. and Lee K. 1991. Microencapsulation and the food industry. Lebensmittelwissenschaft und Technologie, 24, 289-297.
69. Johnson J.A.C. and Etzel M.R. 1995. Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze-drying, or freezing. Journal Dairy Science, 78, 761-765.
70. Jonkers D. and Stockbrügger R. 2007. Review article: probiotics in gastrointestinal and liver diseases. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 26, 133-148.
71. Kaila M., Isolauri E., Soppi E., Vitanen V., Lane S. and Arvilommi, H. 1992. Enhancement of circulating antibody secreting cell response in human diarrhoea by a human lactobacillus strain. Pediatrics Res., 32, 141-144.
72. Kailasapathy K. and Rybka S. 1997. L. acidophilus and Bifidobacterium spp. –their therapeutic potential and survival in yogurt. Australian Journal Dairy Technol, 52, 28-35.
73. Kailasapathy K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. Curr Issues Intest Microbiol., 3, 39-48.
74. Kalliomaki M.A. and Isolauri E. 2004. Probiotics and down-regulation of the allergic response. Immunol Allergy Clin North Am., 24, 739-752.
75. Karel M. and Langer R. 1988. Controlled release of food ingredients. In: Reineccius, G.A. & Risch, S.J. (ed.). Flavor Encapsulation. American Chemical Society. Washington D.C. pp. 177-191.

76. Kierney J.M., Gibney M.J., Livingstone M.B.E., Robson P.J., Kiely M., and Harrington K.E. 2001. Attitudes towards and beliefs about nutrition and health among a random sample of adults in the Republic of Ireland and Northern Ireland. *Pub Hlth Nutr.*, 4, 1117-1126.
77. Kinget R., Kalala W., Vervoort L. and van den Mooter G. 1998. Colonic drug delivery. *J. Drug Target.*, 6, 129-149.
78. Kinsella J.E. and Whitehead D.M. 1989. Proteins in whey: Chemical, physical, and functional properties. *Adv. Food Nutr. Res.*, 33, 343-438.
79. Klaver F.A.M., Kingma F. and Weerkamp A.H. 1993. Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Neth Milk Dairy Journal*, 47, 151-164.
80. Kosaraju S. 2005. Colon targeted delivery systems: Review of polysaccharides for encapsulation and delivery. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 251-258.
81. Krasaekoopt W. Bhandari W. and Deeth H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13, 3-13.
82. Kulisaar T., Zilmer M., Mikelsaar M., Vihalemm T., Annuk H., Kairane C and Kilk A. 2002. Two antioxidative strains as promising probiotics. *International Journal Food Microbiology*, 72, 215-224.
83. Kunz B. 1994 .Grundriß der Lebensmittelmikrobiologie (2. Aufl). Hambur: Berh's Verlag.
84. Kurmann J.A. and Rasic J.L. 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. In: Robinson, R. K. (ed.). *Therapeutic properties of fermented milks*. Elsevier. London. pp. 117-158.
85. Lankaputhra W.E.V. and Shah N.P. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts. *Culture Dairy Products Journal*, 30, 2-7.
86. Lee Y.K. and Salminen S. 1995. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci Technol.*, 6, 241-245.
87. Lee Y.K and Wong S. F. 1998. Stability of lactic acid bacteria in fermented milk. In: S. Salminen, A. von Wright (ed.). *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York.
88. Lent L. E., Vanasupa L. S., and Tong P.S. 1998. Whey protein edible film structures determined by atomic force microscope. *Journal of Food Science*, 63, 824-827

89. Leopold C. and Eikeler D. 2000. Basic coating polymers for the colon-specific drug delivery in inflammatory bowel disease. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 26, 1239-1246
90. Lian W.C., Hsiao H.C. and Chou C.C. 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal Food Microbiology*, 74, 79-86.
91. Liu L.S., Liu C.K., Fishman M.L. and Hicks K.B. 2007. Composite films from pectin and fish Skin Gelatin or Soybean Flour Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2349-2355.
92. Lylli D.M. and & Stillwell R.H. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*, 147, 747-748.
93. Macfarlane G.T. and Cummings J.H. 2002. Probiotics, infection and immunity. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 15, 506-510
94. Mack, D.R. and Lebel S. 2004. Role of probiotics in the modulation of intestinal infections and inflammation. *Curr. Opin Gastroenterol.*, 20, 22-26.
95. Macleod, G.S., Fell J.T., and Collett J.H. 1997. Studies on the physical properties of mixed pectin/ethylcellulose films intended for colonic drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 157, 53-60.
96. Mali S., Grossmann M.V.E. 2003. Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries. *J. Agric. Food Chem.* 7055-7011.
97. Mali S., Karam L.B., Pereira R.L y Groosmann M. V. 2004. Relationships among the Composition and physicochemical Properties of starches with characteristics of their films. *J Agric. Food Chem*, 52, 7720-7725.
98. Markowitz J.E. and Bengmark S. 2002. Probiotics in health and disease in the pediatric patient. *Journal Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 49, 127-141.
99. Marquezini M. V., Cella N., Mansanares A. M., Vargas, H. and Miranda, L. C. M. (1991). Open photoacoustic cell spectroscopy. *Meas Sci Techno*, 2, 396-401.
100. Marteau P., de Vrese M., Cellier C. and Schrezenmeir J. 2000. Protection From Gastrointestinal Diseases Using Probiotics in *Am. J. Clin. Nutr.* (in press).
101. Martinez-Bustos, F., Lopez-Soto, M., San Martin-Martinez, E., Zazueta-Morales, J.J., Velez-Medina, J.J. 2007. Effects of high energy milling on some functional properties of jicama starch (*Pachyrrhizus erosus* L. Urban) and cassava starch (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Food Engineering*. 78:1212–1220

102. McFarland L. 2000. A review of the evidence of health claims for biotherapeutic agents. *Microbiology Ecology Health Dis.*, 12, 65-76.
103. Miller, K.S., and Krochta J.M. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 8, 228-237.
104. Milojevic S., Newton J.M., Cummings J.H., Gibson G.R., Bothman R.L., Ring S.C. Stockham M. and Allwood M.C. 1996b. Amylose as a coating for drug delivery to the colon: preparation and *in vitro* evaluation using glucose pellets. *J. Control. Rel.*, 38, 85-94.
105. Mitsuoka T. 1997. The Intestinal Flora and its Important Relationship with Health. In *Intestinal Flora and Immunity. Intestinal Infection, Allergies and Cancer. Special 20th Anniversary Edition of Healthist.* Yakult Honsha co. Ltd. Tokyo Japan.
106. Momin M. and Pundarikakshudu K. 2007. Design, Development and *In vitro* Evaluation of Sennosides Tablets Containing Pectin HPMC for Colonic Drug Delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69, 394-401.
107. Moser S. and Savage D.C. 2001. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in *Lactobacilli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3476-3480.
108. Mosilhey S.H. 2003. Tesis de doctorado: Influence of Different Materials on the Physiological Properties of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. University of Bonn. Germany.
109. Murphy, P. 2000. Starch. In G. Phillips & P. Williams. *Handbook of hydrocolloids*. CRC Press, 41-65.
110. Muthukumarasamy P. Allan-Wojtas P. and Holley R.A. 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in Different Types of Microcapsules. *Journal of Food Science*, 71, M20-M24.
111. Myrna O. and Nisperos-Carriedo M.O. 2002. Edible Coatings and Films Based on polysaccharides. In: J. M. Krochta., E.A. Baldwin & M.O. Nisperos-Carriedo (ed.). *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. CRC Press. USA. pp. 305-335
112. Nagai T., Fugio S. and Noboru H. 1989. Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms. In: J.W. McGinity. (ed.). *Marcel Dekker*. New York. pp. 89
113. Nahaisi M. H. 1986. *Lactobacillus acidophilus*: Therapeutic Properties, Products and Enumeration. In: Robinson R.K. (ed.). *Developments in Food Microbiology*. Elsevier Applied Science publishers. London, UK. pp. 153-178.

114. Ofori-Kwakye K. and Fell J.T. 2003. Biphasic drug release from film-coated tablets. *Int. J. Pharm.*, 250, 431-440.
115. Olejnik A., Lewandowska M., Obarska M. and Grajek W. 2005. Tolerance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains to Low pH, Bile Salts and Digestive Enzymes. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Food Science and Technology*. 8(1) [http:// www.ejpau.media.pl](http://www.ejpau.media.pl).
116. O'Riordan K.O., Andrews D., Buckle K. and Conway P. 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal Applied Microbiology*, 91, 1059-1066.
117. Ouwehand A.C., Salminen S. and Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289.
118. Park K., Shalaby S.W.W. and Park H. 1993. Biodegradation. In: J. Guillet (ed.). *Biodegradable hydrogels for Drug Delivery*. Technomic Publishing. Lancaster, PA. pp. 13-34.
119. Parker R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health*, 29, 4-8.
120. Parris N., Coffin D.R., Joubran R.F. and Pessen Helmut. 1995. Composition factors Affecting the Water Vapor Permeability and Tensile Properties of Hydrophilic Films. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1432-1435.
121. Parvez S., Malik S., Kang A. and Kim H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1171-1185.
122. Pathmakanthan S., Meance S. and Edwards C.A. 2000. Probiotics: A review of human studies to date and methodological approaches. *Microbiol. Health Dis.*, 12, 10-30.
123. Pérez-Alonso C., Báez-González J.G., Beristain C.I., Vernon-Carter. E.J and Vizcarra-Mendoza, M.G. 2003. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for the use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 53, 197-203.
124. Pérez-Alonso C. 2004. Tesis de doctorado: Análisis Térmico y Termodinámico de Biopolímeros para Establecer Condiciones de Estabilidad de Microcápsulas de Carotenoides Naturales por Secado por Aspersión. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México
125. Pérez-Gago M.B., Nadaud P. and Krochta J.M. 1999. Water Vapor Permeability, Solubility and Tensile Properties of Heat-Denatured versus Native Whey Protein Films. *Journal Food Science*, 64, 1034-1037.

126. Pérez-Gago M.B. and Krochta J.M. 2002. Formation and properties of whey protein films and coatings. In: A. Gennadios. (ed.). Protein-Based Films and Coatings. CRC Press. Boca Raton, FL.
127. Pérez O., Wargon, V., and Pilosof, A. 2006. Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. Food Hydrocolloids, 20, 966-974.
128. Picot A. and Lacroix Ch. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Dairy Journal, 14, 505-515
129. Poppe J. 1997. Gelatin. In: A. Imeson (ed.). Thickening and gelling agents for food. 2nd edition. Chapman & Hall .London. pp. 144-168.
130. Prajapati J.B., Shah R.K. and Dave, J.M. 1987 Survival of *Lactobacillus acidophilus* in blended-spray dried acidophilus preparations. Aust. J. Dairy Technol., 42, 17-21.
131. Reineccius G.A. 1995a. Controlled release techniques in the food industry. In: Risch ,S.J. and Reineccius, G.A. (ed.), Encapsulation and controlled release of food ingredients. American Chemical Society. Washington D.C. pp. 8-25
132. Roberfroid M.B. 1998. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. Br. J. Nutr., 80 (Suppl.), S197-202
133. Rodd A.B., Dunstan D.E. and Boger D.V. 2000. Characterization of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. Carbohydrate Polymers, 42, 159-174.
134. Ross S. 2000. Functional Foods: the Food and Drug Administration perspective. American Journal Clinical Nutrition. 71(suppl):1735S-8S: discussion 1739S-42S.
135. Ross R.P., Desmond C., Fitzgerald G.F. and Stanton, C. 2005. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. A review. Journal of Applied Microbiology, 98, 1410-1417.
136. Rowland I. 2002. Alimentos Funcionales. Nuevas tendencias. In R.M. Ortega., A. Marcos., J. Aranceta., J. A. Mateos., A.M. Requejo and L. Serra (ed.). Alimentos Funcionales Probióticos. Editorial Medica Panamericana. España. pp. 1-7.
137. Rubinstein A. 1990. Microbially controlled drug delivery to the colon. Biopharm. Drug Dispos., 11, 465-475.

138. Rubinstein A., Radai R., Ezra M., Pathak S. and Rokem J.M. 1993. *In vitro* evaluation of calcium pectinato: A potential colon-specific drug delivery carrier. *Pharm. Res.*, 10, 258-263.
139. Rubinstein A. 2000. Natural polysaccharides as targeting tools of drugs to the human colon. *Drug Dev. Res.*, 50, 435-439.
140. Rutherford-Markwick K.J. and Harskarnjit S. Gill. 2004. Probiotics and Immunomodulation. In: Hughes, D.A. Darlington, G.L. and Bendich, A. Diet and Human Immune Function. Humana Press Inc. USA. pp. 327-344.
141. Rybka S. and Kailasapathy K. 1995. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yogurts. *Aust. Journal Dairy Technology*, 50, 51-57.
142. Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J and Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.
143. Salminen S., Gorbach S., Lee Y. and Benno Y. 2004. Human Studies on Probiotics: What is Scientifically Proven Today?. In: Salminen, S. Wright, A. and Ouwehand, A. (ed.). *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. Marcel Dekker, Inc. USA. Pp. 515-530.
144. Sanders M.E. 1998a. Overview of Functional Foods: Emphasis on Probiotic Bacteria. *International Dairy Journal*, 8, 341-347.
145. Sanders M.E. and Klaenhammer, T.R. 2001. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus Acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.*, 84, 319-331.
146. SCAN. 2000. Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Safety of Use of Bacillus Species en Animal Nutrition. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. ><http://europa.eu.int/comm./food/fs/sc/scan/out41.pdf>
147. Schaafsma G., Meuling W.J.A., Van Dokkum ,W and Bouley C. 1998. Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus Acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 52, 436-440.
148. Schilling C.H., Tomasik P., Karpovich D.S., Hart B., Garcha J. and Boettcher P.T. 2005. Preliminary study on converting agricultural waste into biodegradable plastics. Part II: corncobs. *J. Polym. Environ.*, 13, 57-63
149. Schmidt G. and Zink R. 2000. Basic features of the stress response in three species of bifidobacteria: *B. longum*, *B. adolescentis*, and *B. breve*. *Int J Food Microbiol*, 55, 41-45.

150. Schrezenmeir J. and de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition. *American Journal Clinical Nutrition*, 72 (Suppl), 361S-364S.
151. Semde R., Amighi K., Devleeschouwer M.J. and Moes, A.J. 2000b. Effect of pectinolytic enzymes on the theophylline release from pellets coated with water insoluble polymers containing pectin HM or calcium pectinate. *Int. J. Pharm.*, 197, 169-179.
152. Senok A.C., Ismaeel A.Y. and Botta G.A. 2005. Probiotics: facts and myths. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11, 958-966.
153. Shah N. P. 2000. Symposium Probiotic Bacteria, *Journal of Dairy Science*, 83, 894-907.
154. Shah N. P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal Dairy Science*, 83, 894-907.
155. Shah N.P., 2001. Functional Foods from Probiotics and Prebiotics,: to modify gastrointestinal flora has the potential to provide maximum health benefits. *Food Technology*, 55, 46-53.
156. Shahidi F. and Han X. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Review Food Science Nutrition*, 33, 501-547.
157. Sharma S.K. Mulvaney S.J. and Rizvi S.S.H. 2003. *Ingeniería de Alimentos operaciones unitarias y prácticas de laboratorio*. Limusa Wiley. México.
158. Sheehan V.M., Sleator R.D., Fitzgerald G.F. and Hill C. 2006. Heterologous expression of BetL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl Environ Microbiol*, 72, 2170-2177.
159. Sheehan V., Sleator R.D., Fitzgerald G. and Hill C. 2007. Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology*, 153, 3563-3571.
160. Siew L.F., Basit A.W. and Newton J.M. 2000. The properties of amylose-ethyl cellulose films cast from organic based solvents as potential coating colonic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 11, 133-139.
161. Simpson P.J., Stanton C., Fitzgerald G.F. and Ross R.P. 2005. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying. *Journal Applied Microbiology* (in press).

162. Siuta-Cruce P. and Goulet J. 2001. Improving Probiotic Survival Rates. Microencapsulation preserves the potency of probiotic microorganisms in food systems. *Food Technology*, 55, 36-42
163. Sleator R.D. and Hill C. 2006. Patho-biotechnology; using bad bugs to do good things. *Curr Opin Biotechnol*, 17, 211-216.
164. Sleator R.D. and Hill C. 2007a. Bioengineered Bugs a new patho-biotechnology approach to probiotic research and applications. *Med hypotheses* doi:10.1016/j.mehy.2007.03.008.
165. Sleator R.D. and Hill C. 2008. New frontiers in probiotic research. *The Society for Applied Microbiology. Letters in Applied Microbiology*. 46, 143-147.
166. Sperti G.S. 1971. *Probiotics*. West Point, C.T. Avi Publishing, Co.
167. Stanton C., Gardiner G., Meehan H., Collins K., Fitzgerald G., Lynch P.B. and Ross R.P. 2001. Market potential for probiotics. *American Journal Clinical Nutrition*, 73, 476s-483s.
168. Stanton C., Desmond C., Coakley M., Collins J.K., Fitzgerald G. and Ross R.P. 2003a. Challenges facing development of probiotic containing functional foods. In E.R. Farnworth. *Handbook of Functional Fermented Foods* Ch. 11 ed. CRC Press. Boca Raton, FL.
169. Sullivan A. and Nord C.E. 2005. Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal International Medicine*, 257, 78-92
170. Sun W. and Griffiths M.W. 2000. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *Int J Food Microbiol*, 61, 17-25.
171. Surawicz C.M., Elmer G., Spelman P., Lynne V., McFarland L.V. and Chuinn J. 1989. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces Boulardii*, a prospective study. *Gastroenterology*, 9, 981-988.
172. Swift G. 1992. Biodegradable polymers in the environment: are they really biodegradable? *Proc. ACS Div Polym. Mat. Sci. Eng.*, 66, 403-404.
173. Talwalkar A. and Kailasapathy K. 2003. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 36-39.
174. Talwalkar A. and Kailasapathy K. 2004. A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 117-124.

175. Texeira P., Castro H. and Kirby R. 1995. Spray drying as a method for preparing concentrate cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. Journal Applied Bacteriology, 78, 456-460.
176. Tharanathan R.N. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. Trends Food Sci. Technol., 14, 71-78.
177. Thomas D, and Atwell W, 1999. Starches. Eagan Press. EUA.
178. Tomás S. A., Cruz-Orea A., Stolik S., Pedroza-Islas R., Villagómez-Zavala D. L. and Gómez-Corona C. 2004. Determination of the thermal diffusivity of edible films. International Journal of Thermophysics, 25, 611-620.
179. Turkoglu M. and Ugurlu T. 2002. *In vitro* evaluation of pectin-HPMC compression coated 5-aminosalicylic acid tablets for colony delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm., 53, 65-73.
180. Van den Mooter G., Samyn C. and Kinget R. 1994. Characterization of colon-specific azo polymers: A study of the swelling properties and the permeability of isolated polymer films. International Journal of Pharmaceutics, 111, 127-136.
181. Villalobos R., Chanona J., Hernández Pilar., Gutierrez G., Chiralt A. 2005. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. Food Hydrocolloids, 19, 53-61.
182. Wakerly Z., Fell J.T., Attwood D. and Parkins, D. 1997. Studies on drug release from pectin/ethylcellulose film-coated tablets : a potential colonic delivery system. Int. J. Pharm., 153, 219-224.
183. Wang L., Liu L., Homes J., Kerry J.F. and Kerry, J.P. 2007. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. International Journal of Food Science and Technology, 42, 1128-1138.
184. Ward G. and Nussinovitch A. 1996b. Peel gloss as a potential indicator of banana ripeness. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 29, 289-294.
185. Ward G. and Nussinovitch A. 1997. Characterizing the gloss properties of hydrocolloid films. Food Hydrocolloids, 11, 357-365.
186. Watts P., and Illum L. 1997. Colonic drug delivery. Drug Dev. Ind. Pharm., 23, 893-913.
187. Whistler R.L. and BeMiller J.N. 1999. Carbohydrate Chemistry for Food Scientists. Eagan Press. USA.

188. Wildman R.E.C. 2001. Handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC Press. Boca Raton, FL.
189. Yang L., Chu J. and Fix J. 2002. Colon-specific drug delivery: new approaches and *in vitro/in vivo* evaluation. Int. J. Pharm., 235, 1-15.
190. Zecher D. and Gerrish T. 1997. Cellulose derivatives. In: Imeson, A. (ed.). Thickening and Gelling Agents for Food. Blackie Academic and Professional. U. K. pp. 61-85.
191. Ziegler G. and Hasselman D.P.H. 1981. Journal Material Science, 16, 495.
192. Ziemer C.J. and Gibson G.R. 1998. An overview of probiotic, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. International Dairy Journal, 8, 473-479.