



---

# Instituto Politécnico Nacional

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

UNIDAD QUERÉTARO

POSGRADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

**Estudio del sistema almidón resistente tipo 3 y pectina para el  
encapsulamiento de probióticos**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN TECNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTA

**IBT Karen Oropeza Zamora**

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Gonzalo Velazquez de la  
Cruz

Dra. Ma. Guadalupe del Carmen  
Méndez Montealvo



Querétaro, Qro. Diciembre de 2022



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, a 25 de junio del 2021

El Colegio de Profesores de Posgrado de **CICATA Unidad Querétaro** en su Sesión Ordinaria No. 210604 celebrada el día 04 del mes junio del 2021, conoció la solicitud presentada por la alumna:

Apellido Paterno:	Oropeza	Apellido Materno:	Zamora	Nombre (s):	Karen
-------------------	---------	-------------------	--------	-------------	-------

Número de registro: 

A	2	1	0	7	8	5
---	---	---	---	---	---	---

del Programa Académico de Posgrado: 

Maestría en Tecnología Avanzada
---------------------------------

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Estudio del sistema almidón resistente tipo 3 y pectina para el encapsulamiento de probióticos
--

Objetivo general del trabajo de tesis:

Establecer un sistema de encapsulación basado en almidón resistente tipo 3 y pectina que permita mantener la viabilidad de microorganismos probióticos.
---

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: 

Dr. Gonzalo Velazquez de la Cruz
----------------------------------

 2° Director: 

Dra. Ma. Guadalupe del Carmen Méndez Montealvo
--

No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

CICATA-Unidad Queretaro
-------------------------

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director de Tesis

Dr. Gonzalo Velazquez de la Cruz

2° Director de Tesis

Dra. Ma. Guadalupe del Carmen Méndez Montealvo

Aspirante

Karen Oropeza Zamora

Presidente del Colegio



Dr. Juan Bautista Hurtado Ramos



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de **Querétaro**, siendo las **16:00** horas del día **5** del mes de **diciembre** de **2022**, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de **CICATA-IPN unidad Querétaro**, para examinar la tesis titulada:

**Estudio del sistema almidón resistente tipo 3 y pectina para el encapsulamiento de probióticos**

de la alumna:

<b>Apellido Paterno:</b>	Oropeza	<b>Apellido Materno:</b>	Zamora	<b>Nombre:</b>	Karen
--------------------------	---------	--------------------------	--------	----------------	-------

Número de registro: **A210785**

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: **Maestría en Tecnología Avanzada**

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene **14%** de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.** Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **NO SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

**JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:**

En el análisis de similitud del documento de tesis no se encontraron frases completas idénticas a otras fuentes. Los porcentajes más altos de similitud que se detectaron corresponden a palabras aisladas de uso común en el área y al formato que se utiliza para las referencias en la sección de bibliografía. Para el análisis de similitud se omitió la lista de referencias.

**\*\*Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio y del Director o Directores de tesis el análisis del porcentaje de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

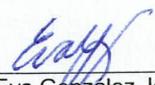
Finalmente, y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** en virtud de los motivos siguientes:

**El trabajo desarrollado, así como la comprensión y discusión de la información obtenida se considera que se cumple con los requisitos para proceder a sustentar el examen de grado al cual aspira.**

**COMISIÓN REVISORA DE TESIS**

  
\_\_\_\_\_  
Director de Tesis  
Dr. Gonzalo Velazquez de la Cruz

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Regina Hernández Gama

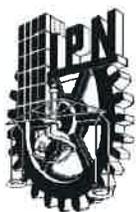
  
\_\_\_\_\_  
Dra. Eva González Jasso

  
\_\_\_\_\_  
2° Director de Tesis  
Dra. Ma. Guadalupe del Carmen  
Méndez Montealvo

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Marlenne Gómez Ramírez

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Bautista Hurtado Ramos  
**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**





## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### *CARTA DE AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA PARA DIFUSIÓN*

En la Ciudad de México el día **05** del mes de **diciembre** del año **2022**, la que suscribe **Karen Oropeza Zamora** alumna del programa **Maestría en Tecnología Avanzada** con número de registro **A210785**, adscrita al **Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada** unidad Querétaro manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del **Dr. Gonzalo Velazquez de la Cruz** y la **Dra. Ma. Guadalupe del Carmen Méndez Montealvo** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Estudio del sistema almidón resistente tipo 3 y pectina para el encapsulamiento de probióticos”**, 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 expresado del autor y/o director(es). Este puede ser obtenido escribiendo a las siguiente(s) dirección(es) de correo [gvelazquezd@ipn.mx](mailto:gvelazquezd@ipn.mx) y [cmendez@ipn.mx](mailto:cmendez@ipn.mx). Si el permiso se otorga, al usuario deberá dar agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.

IBT. Karen Oropeza Zamora

## Agradecimientos

A CICATA-IPN unidad Querétaro por la oportunidad de ser parte de esta gran comunidad, agradezco infinitamente el apoyo que siempre brindan a los estudiantes, cada uno de los docentes, así como el personal administrativo que me brindaron parte de sus valiosos conocimientos y tiempo. Agradezco la oportunidad y la confianza de hacer de uso de los laboratorios, equipos e instalaciones.

A CONACYT por el apoyo económico que me brindo, lo cual me permitió poder concluir con éxito la maestría, sin duda alguna encontraré el camino de retribuir el apoyo brindado.

A CEPROBI-IPN por el apoyo otorgado durante el desarrollo del proyecto.

A todos mis profesores mi admiración y respeto, llevaré presente todas sus enseñanzas: Dr. Pedro, Dra. Jovita, Dra. Marlenne, Dr. Adrián, Dr. Iván, Dr. Jorge, Mtro. Enrique, Mtro. Max.

A mi comité revisor por acompañarme durante estos dos años, sus valiosos consejos me ayudaron a crecer como estudiante y como persona: Dra. Regina, Dra. Eva y Dra. Marlenne.

A mis asesores Dr. Gonzalo y Dra. Lupita, sin duda alguna, grandes personas, grandes científicos; todo mi cariño, respeto y admiración, desde el día uno estuvieron con toda la intención de crear cosas grandes, gracias a ustedes he podido llegar a donde estoy. Gracias por darme la oportunidad de conocerlos y trabajar con ustedes, pues ha sido la mejor de mis experiencias.

A mi familia: Alan, Aylén, Mamá, Papá, Irvin y Jessi, sin ustedes no lo hubiera logrado. Gracias por tanto, los amo!

A mis nuevos amigos y compañeros: Aleyda, Fabi, Jaime, Ángel, Ezequiel, Eréndira, Fani, Kevin, Grecia, Jime y Pao a todos gracias por el apoyo y los consejos brindados.

A Dios, la vida y el universo, por permitirme la salud, el amor, las circunstancias, el tiempo, las herramientas y las personas indicadas.

Agradezco con el corazón todas y cada una de las enseñanzas.

## Dedicatoria

*A mamá*

*Noemi Zamora González*

*Nada es lo que planeamos, nada es lo que soñamos,  
pero de algo estoy segura, estás conmigo.*

*Todo lo que logré ser en esta vida  
es gracias a ti.*

*Te amo!*

# Contenido

Contenido .....	6
Índice de figuras.....	9
Índice de tablas .....	12
Resumen .....	13
Abstract .....	14
1. Introducción .....	15
2. Marco teórico.....	16
Probióticos .....	16
Probióticos en alimentos.....	17
Regulación de alimentos con probióticos .....	20
<i>Lactiseibacillus rhamnosus GG</i> .....	22
Prebióticos .....	24
Pectina.....	26
Almidón .....	27
Almidón resistente .....	29
Almidón resistente tipo 3.....	30
Microencapsulación de probióticos.....	32
Almidón y pectina como agentes microencapsulantes .....	35
INFOGEST 2.0 .....	38
Vigilancia tecnológica .....	42
3. Justificación .....	44
4. Objetivo general .....	46
5. Objetivos específicos.....	46
6. Hipótesis.....	47
7. Materiales y métodos .....	47
Materiales .....	47
Concentración de células.....	48

Preparación de sistemas gelificación conjunta (GC).....	48
Preparación de sistemas de recubrimiento (REC) .....	48
Microencapsulación .....	49
Caracterización de los sistemas de encapsulación .....	51
Turbidimetría.....	51
Reología.....	51
Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).....	52
Difracción de rayos X.....	52
Calorimetría diferencia de barrido (DSC) .....	52
Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	53
Viabilidad en condiciones de almacenamiento .....	53
Viabilidad en condiciones de digestión <i>in vitro</i> (INFOGEST 2.0) .....	53
Almidón resistente.....	55
Determinación de humedad .....	55
Análisis estadístico .....	55
8. Resultados y discusión .....	55
Turbidimetría .....	56
Reología .....	59
Barrido de frecuencia .....	61
Cedencia y recuperación.....	65
Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR). .....	68
Difracción de rayos X .....	73
Calorimetría diferencia de barrido (DSC).....	74
Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	76
Elección del sistema de encapsulamiento .....	82
Viabilidad en condiciones de almacenamiento .....	84
Viabilidad en condiciones de digestión <i>in vitro</i> (INFOGEST 2.0) .....	87

Almidón resistente.....	90
Determinación de humedad.....	92
9. Conclusiones.....	92
10. Referencias.....	93
11. Anexo 1.....	113

## Índice de figuras

Figura 1. Representación de las funciones beneficiosas de los prebióticos en el tracto gastrointestinal de mamíferos y sus efectos sistémicos. *Ca <sup>2+</sup> : Calcio; GLP-1: Péptido similar al glucagón-1; Gpr41: Receptor acoplado a proteína G 41; SCFA: ácido graso de cadena corta.....	25
Figura 2. a) Estructura de un gránulo de almidón (2–100 μm), b) anillos de crecimiento de tamaño submicrónico, c y d) estos anillos de crecimiento se forman de bloques de 20 a 50 nm que consisten en láminas amorfas y cristalinas (9 nm) que contienen e, f, g y h cadenas de amilopectina y amilosa (0.1–1 nm). .....	28
Figura 3. Diagrama de flujo del método de digestión <i>in vitro</i> INFOGEST 2.0. Indica el tiempo esperado (izquierda), las etapas y los números de paso correspondientes en el procedimiento (derecha). SGF (fluido gástrico simulado), SIF (fluido intestinal simulado) y SSF (fluido salival simulado). .....	39
Figura 4. Diagrama de flujo de la preparación de los sistemas de encapsulamiento GC y REC y su caracterización. ....	50
Figura 5. Absorbancia vs tiempo del sistema de encapsulación gelificación conjunta (GC) con las diferentes mezclas evaluadas. ....	57
Figura 6. Absorbancia vs tiempo del sistema de encapsulación de recubrimiento (REC) con las diferentes mezclas evaluadas. ....	58
Figura 7. Sistemas de encapsulación GC y REC en las diferentes proporciones a los 140 minutos.....	58
Figura 8. Módulo de almacenamiento (G') del sistema REC en sus diferentes proporciones ARet:PEC.....	61
Figura 9. Módulo de pérdida (G'') de los sistemas REC en sus diferentes proporciones ARet:PEC.....	62
Figura 10. Módulos de pérdida y almacenamiento del gel conformado por almidón retrogradado a las 40 horas. ....	62
Figura 11. Barrido de frecuencia y módulo de almacenamiento de las muestras del sistema GC. ....	63
Figura 12. Barrido de frecuencia y módulo de pérdida de las muestras del sistema GC.....	63
Figura 13. Imagen alusiva al estado sol-gel de una dispersión coloidal, en donde en el estado sol el agua actúa como fase dispersante y en el estado gel el agua es la fase dispersa en el interior de una red macromolecular. ....	64
Figura 14. Prueba de cedencia y recuperación del sistema de encapsulación por recubrimiento, % de deformación con respecto al tiempo. ....	65

Figura 15. Prueba de cedencia y recuperación del sistema de gelificación conjunta (GC), %de deformación con respecto al tiempo .....	66
Figura 16. Prueba de cedencia recuperación de los sistemas de encapsulación GC sin la proporción 1:3 ARet:PEC. ....	66
Figura 17. Prueba de cedencia y recuperación del sistema GC 1:1 a las 24 horas. ....	67
Figura 18. Prueba de cedencia y recuperación del sistema GC 1:1 a las 24 y 40 horas. ....	68
Figura 19. Espectros FTIR de los sistemas de encapsulamiento por recubrimiento (REC) ..	68
Figura 20. Espectro FTIR de los sistemas de encapsulación gelificación conjunta (GC). ....	69
Figura 21. Grado de orden de las dobles hélices con base a la relación 1000:1022 cm <sup>-1</sup> para los sistemas GC .....	71
Figura 22. Grado de organización (1047:1022 cm <sup>-1</sup> ) de las estructuras conformadas en los sistemas GC.....	72
Figura 23. Microfotografías del almidón retrogradado (1:0 ARet:PEC) en polvo, enfoque de 500x, 2500x y 4000x. ....	76
Figura 24. Microfotografías de la pectina (0:1 ARet:PEC) en polvo, enfoque de 500x, 2500x y 5000x.....	77
Figura 25. Microfotografías de la muestra GC 1:3 (ARet:PEC), enfoque de 500x, 2500x y 4000x .....	77
Figura 26. Microfotografías de la muestra GC 1:1 (ARet:PEC), enfoque de 500x, 2500x y 4000x. ....	78
Figura 27. Comparación de los sistemas 1:0 (ARet) a) y 1:1 (ARet:PEC) b), el círculo rojo es una representación aproximada de hasta 4 µm de largo que puede medir el probiótico <i>Lacticaseibacillus rhamnosus GG</i> . ....	79
Figura 28. Microfotografías de la muestra GC 3:1 (ARet:PEC) enfoque de 500x y 2500x ...	79
Figura 29. Microfotografías de la muestra REC 1:3 (ARet:PEC), enfoque de 500x, 2500x y 3000x .....	80
Figura 30. Microfotografías de la muestra REC 1:1 (ARet:PEC), enfoque de 500x, 2500x y 5000x .....	80
Figura 31. Microfotografías de la muestra REC 3:1 (ARet:PEC), enfoque de 500x, 2500x y 3000x .....	81
Figura 32. Sistema de encapsulación gelificación conjunta (GC) en una proporción de 1:1 ARet:PEC con el probiótico <i>Lacticaseibacillus rhamnosus GG</i> . ....	83
Figura 33. Sistema de encapsulación recubrimiento (REC) en una proporción de 1:1 ARet:PEC con el probiótico <i>Lacticaseibacillus rhamnosus GG</i> en el sistema. ....	83
Figura 34. Eficiencia de encapsulación (%EE) de los sistemas GC y REC, así como los controles LGG, ARet y PEC. Los valores porcentuales marcados con las mismas letras no son significativamente diferentes (p > 0,05).....	84

Figura 35. Viabilidad de las células probióticas en condiciones de almacenamiento (4 °C) durante un periodo de 3 meses. .... 86

Figura 36. Predicción de la pérdida de viabilidad celular en los sistemas REC y GC en comparación con las células libre de LGG bajo condiciones de almacenamiento a 4°C y de digestión *in vitro*. 0) inóculo inicial, 1) viabilidad después del encapsulamiento (0 días de almacenamiento), 2) viabilidad en 0 días de almacenamiento en condiciones de digestión *in vitro*, 3) viabilidad a los 30 días de almacenamiento y 4) viabilidad a los 30 días de almacenamiento en condiciones de digestión *in vitro*..... 90

## Índice de tablas

Tabla 1. Diferentes probióticos y/o mezclas con beneficios en la salud de acuerdo con diferentes estudios clínicos en humanos. ....	17
Tabla 2. Principales características y condiciones óptimas de crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG .....	23
Tabla 3. Productos comerciales con contenido de prebióticos y su declaración de propiedad saludable en EUA. ....	26
Tabla 4. Estudios sobre el uso de almidón resistente para la encapsulación de probióticos con los resultados más relevantes. ....	35
Tabla 5. Usos de la pectina como material encapsulante o de acarreamiento y los principales hallazgos. ....	37
Tabla 6. Evaluación de encapsulados de probióticos mediante métodos de digestión <i>in vitro</i> por diferentes grupos de investigación. ....	41
Tabla 7. Preparación de los sistemas GC y REC en diferentes proporciones, cantidades y componentes. ....	51
Tabla 8. Implementación del protocolo INFOGEST 2.0 para los sistemas de encapsulación GC y REC. ....	54
Tabla 9. Representaciones durante la caracterización de los sistemas GC y REC con respecto a las proporciones de almidón retrogradado y pectina (ARet:PEC) .....	56
Tabla 10. Imágenes de los sistemas GC y REC antes y después del secado. ....	59
Tabla 11. Geles conformados a las 40 horas de reposo a temperatura ambiente, en las diferentes proporciones estudiadas (ARet:PEC) .....	60
Tabla 12. Valores de las bandas 1000, 1022 y 1047 $\text{cm}^{-1}$ y sus relaciones (1000/1022 y 1047/1022). ....	71
Tabla 13. Cristalinidad de los sistemas de encapsulamiento .....	73
Tabla 14. Resultados del análisis del primer pico de los sistemas .....	74
Tabla 15. Resultados del análisis del segundo pico de los sistemas. ....	74
Tabla 16. Pérdida en la viabilidad del probiótico ( $\log_{10}$ UFC/g) por efecto del proceso de encapsulación. ....	85
Tabla 17. Pérdida celular $\log_{10}$ UFC/g de LGG en condiciones de digestión <i>in vitro</i> (INFOGEST 2.0) a los 0 días y 30 días de almacenamiento .....	88
Tabla 18. Contenido de almidón resistente (% AR) para los sistemas REC y GC a los 0 y 30 días de almacenamiento (4 °C) .....	92
Tabla 19. Humedad (%) de los sistemas de encapsulación GC y REC sin el probiótico. ....	92

## Resumen

El consumo de alimentos enriquecidos con probióticos (microorganismo que generan beneficios en la salud) ha incrementado en los últimos años. La industria alimentaria ha mostrado un mayor interés por estos productos debido a las ganancias que representan, sin embargo, la gran mayoría de los fabricantes adicionan a los probióticos directamente sobre la matriz alimentaria empleándola como vehículo a pesar de que se ha demostrado que cuando los probióticos se encuentran libres en un alimento disminuye su capacidad de sobrevivir a diferentes condiciones de almacenamiento y digestión, por ello la microencapsulación es una tecnología que se emplea para garantizar una entrega eficaz de los probióticos generando beneficios sobre la salud al mejorar la salud intestinal. En este estudio se utilizó almidón retrogradado (ARet) y pectina (PEC) en una mezcla en diferentes proporciones y se estableció un sistema de encapsulación que permitió mantener la viabilidad del probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus GG* en condiciones de almacenamiento y digestión (*in vitro*). Para ello se propusieron dos procedimientos de encapsulación que se denominaron: sistema de gelificación conjunta (GC) y recubrimiento (REC). Mediante la caracterización fisicoquímica se demostró que las mezclas 1:1 y 3:1 del sistema GC presentaron una mejora en sus propiedades reológicas, estabilidad térmica, resistencia y organización, con respecto al almidón retrogradado debido a la interacción molecular del almidón y pectina. Para el sistema REC se corroboró el efecto de recubrimiento para las mezclas 1:3 y 1:1, a partir de estos resultados se llevó al proceso de microencapsulación la mezcla 1:1 en donde el sistema GC tuvo una % EE del  $88.08 \pm 2.45$  y el sistema REC del  $70.14 \pm 0.50$  % EE, ambos sistemas demostraron tener una protección del probiótico en condiciones de almacenamiento y digestión *in vitro*, aunado a esto se tiene un efecto prebiótico importante por los valores de % AR que van desde 11.64% por lo que es posible obtener un beneficio en la salud a partir de su consumo.

**Palabras clave:** Almidón retrogradado, almidón resistente tipo 3, pectina, hidrogel, INFOGEST.

## Abstract

The consumption of foods enriched with probiotics (microorganisms that generate health benefits) has increased in recent years. The food industry has shown a greater interest in these products due to the profits they represent; however, the producers usually add probiotics directly to the food using it as a vehicle even though it has been shown that free probiotics in a food do not survive storage and digestion conditions, for that the microencapsulation is a technology used to ensure effective delivery of probiotics that generates health benefits-by improving gut health. In this study, retrograded starch (ARet) and pectin (PEC) were used at different proportions and an encapsulation system was prepared that allowed maintaining the viability of the probiotic *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG during storage and digestion conditions. For this, two encapsulation methods were proposed, which were called: joint gelling system (GC) and coating (REC). The GC system preserved the viability of the probiotic with a value of  $7.19 \pm 0.04 \log_{10}$  UFC/g at 30 days of storage and digestion *in vitro* while the REC system did not demonstrate greater protection with respect to free cells. Physicochemical characterization showed that the mixtures 1:1 and 3:1 of the GC system had an improvement in their rheological properties, thermal stability, strength, and structural organization, with respect to retrograded starch due to the molecular interaction of starch and pectin. For the REC system, the coating effect for the 1:3 and 1:1 mixtures was corroborated from these results, the 1:1 mixture was used for the microencapsulation process where the GC system had a % EE of  $88.08 \pm 2.45$  and the REC system of  $70.14 \pm 0.50$  % EE, both systems showed probiotic protection under storage and digestion *in vitro* conditions; in addition, there is an important prebiotic effect due to the values of % AR of around 11.64% suggesting a possible health benefit from its consumption.

**Key words:** Retrograde starch, resistant starch type 3, pectin, hydrogel, INFOGEST.

## 1. Introducción

En la actualidad, la industria de los alimentos muestra un gran interés por la incorporación de probióticos en la formulación de diversos alimentos, esto se debe principalmente a una tendencia en las preferencias de los consumidores, pues en los últimos años los consumidores buscan que un alimento pueda cumplir con sus expectativas en cuanto a sabor, olor, textura, valor nutricional y además esperan que éste les proporcione mayores beneficios en la salud. Tales beneficios de consumo se pueden obtener mediante la presencia de probióticos (Lisboa et al., 2009) de acuerdo a la FAO & OMS (2006) los probióticos son *“Microorganismos vivos, que cuando se administran en cantidad adecuada, confieren beneficios para la salud del huésped”*

Actualmente, la mayoría de los probióticos presentes en un alimento son adicionados directamente en la matriz alimentaria; sin embargo, la mayoría de estos probióticos no son capaces de sobrevivir bajo las condiciones de procesamiento, almacenamiento y condiciones gastrointestinales (Naissinger da Silva et al., 2021; Semyonov et al., 2010). Debido a que se encuentran libres en una matriz alimentaria que no les provee protección alguna, es poco probable que puedan sobrevivir en la cantidad necesaria para brindar un beneficio en la salud de quien los consume.

En el continente americano, Estados Unidos, Brasil, Canadá y México ocupan los primeros lugares en el consumo de probióticos (Feldman, 2015). Recientemente, Market Research publicó el informe de *“Mercado de ingredientes probióticos”*, cuyo pronóstico indica un crecimiento del mercado, con una tasa compuesta anual de 7.51 % que representa ingresos de 576.68 millones de dólares en el periodo del 2022 al 2025. En el mismo informe reportan que a partir de la pandemia de COVID-19 se presentó un incremento en el consumo de probióticos debido a una mayor preocupación por el cuidado y mejora de la salud inmunológica (Market Research, 2020).

La industria de los alimentos está desarrollando nuevas tecnologías para la entrega eficaz de probióticos a fin de obtener una ventaja competitiva en el mercado. En sus desarrollos se debe asegurar que los probióticos lleguen al tracto digestivo en la cantidad adecuada (FAO & OMS, 2006). Para este fin, la encapsulación de probióticos ha sido reconocida como una técnica adecuada para proteger a los probióticos de diferentes factores ambientales adversos que pueden presentarse durante su almacenamiento y a través del tracto gastrointestinal (De Araújo et al., 2015).

## 2. Marco teórico

### Probióticos

El término probiótico fue descrito por Eli Metchnikoff en 1907 quien propuso que las bacterias presentes en productos lácteos fermentados podían ayudar a prevenir enfermedades en el intestino grueso, fue entonces cuando mencionó por primera vez que *"existe una dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos, lo que hace posible adoptar medidas en la alimentación para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles"* (Metchnikoff, 1907).

Durante el mismo periodo un pediatra francés llamado Henry Tissier, identificó que los niños que pasaban por un cuadro de diarrea tenían heces con un número escaso de bacterias "bífidas", las cuales se caracterizan por tener una morfología en forma de Y, sin embargo, estas mismas bacterias ("bífidas") se encontraban abundantes en los niños sanos, fue entonces cuando Tissier planteó la posibilidad de administrar estas bacterias ("bífidas") a los pacientes con diarrea, para generar el restablecimiento de la flora intestinal sana (Tissier, 1906).

Así fue que las obras de Metchnikoff y Tissier fueron las primeras que hicieron propuestas científicas respecto a la utilización de algunas bacterias con efectos probióticos, El término "probiótico" se designó en 1960 y se usó en aquel entonces como "las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos" (Lilly & Stillwell, 1965).

La palabra "probiótico" deriva del término griego "pro bios" que significa "para vida". Actualmente, se ha establecido una definición formulada por la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS), quienes definen a los probióticos como *"Microorganismos vivos, que cuando se administran en cantidad adecuada, confieren beneficios para la salud del huésped"* (FAO & OMS, 2006).

De entre los probióticos mayormente conocidos se encuentran las bacterias acidolácticas (LAB), mejor conocidas como productoras de ácido láctico las cuales se usan regularmente como agentes de fermentación en algunos alimentos e imparten beneficios para la salud (Malik et al., 2016); los *Lactobacilos*, *Bifidobacterias* y algunas levaduras son los microorganismos probióticos más reconocidos, también son ampliamente reconocidos otros géneros como *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus* (Sarao & Arora, 2017).

Desde los inicios del siglo XXI comenzó a surgir un gran interés por el uso de probióticos para mejorar la salud humana, esto enfocó una gran atención por la investigación de todos

los beneficios que se podían obtener a partir de su consumo, actualmente existen diversas investigaciones que han demostrado que el consumo de probióticos genera beneficios en la conformación de la microbiota intestinal, algunos de estos beneficios se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Diferentes probióticos y/o mezclas con beneficios en la salud de acuerdo con diferentes estudios clínicos en humanos.

Microorganismo probiótico	Impacto en la salud	Dosis reportada (UFC/día)	Referencia
<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus</i>	Reducción de obesidad en adultos	1 x10 <sup>11</sup> durante 10 semanas	(Skonieczna-Żydeck et al., 2020)
<i>Bifidobacterium lactis</i>	Asma y rinitis alérgica en niños	1.9 x10 <sup>7</sup> durante 12 meses	(Sazawal et al., 2010)
Mezcla probiótica	Colesterol alto en sangre	1 x 10 <sup>9</sup> durante 3 meses	(Kerlikowsky et al., 2021)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i>	Diabetes mellitus gestacional	1 x 10 <sup>6</sup> durante 2 meses	(Sahhaf et al., 2019)
<i>Alkalihalobacillus clausii</i> O88AE	Diarrea asociada a antibióticos	2 x 10 <sup>9</sup> por siete días.	(Maity & Gupta, 2021)
<i>L. plantarum</i> P-8	Ansiedad y depresión	2 x 10 <sup>10</sup> durante 3 meses	(Ma et al., 2021)

Una gran cantidad de estudios científicos demuestran el impacto positivo del consumo de probióticos en la salud humana; sin embargo, para obtener algún efecto benéfico se deben considerar variables como: el tipo de probiótico (género y especie), el tipo de padecimiento al cual va dirigido el tratamiento, frecuencia de ingesta, dosis de administración, duración del tratamiento, el vehículo mediante el cual puede ser ingerido (matriz alimentaria o no alimentaria) y sobre todo la cantidad los probióticos viables en el producto final y antes de consumirse (Lee et al., 2009).

## Probióticos en alimentos

Actualmente se sabe que los probióticos se administran por vía oral y están disponibles comercialmente en forma de suplementos, fármacos y alimentos; sin embargo, se ha detectado que las personas prefieren el consumo de probióticos en un alimento antes que

en un suplemento o medicamento, principalmente debido a los aspectos más prácticos de consumo y disponibilidad, ya que su consumo en un alimento no predispone el uso de una receta médica (Meybodi & Mortazavian, 2017).

En 2001, un grupo de expertos de la FAO y OMS evaluaron la información sobre los aspectos funcionales e inocuidad de los probióticos en los alimentos, señalaron las propiedades y funcionalidades de los microorganismos vivos en los alimentos y sugirieron que *“los probióticos desempeñaban un papel importante en las funciones inmunitaria, digestiva y respiratoria, y que podrían tener un efecto significativo en el alivio de las enfermedades infecciosas en los niños y otros grupos de alto riesgo”*. Casi al mismo tiempo aumentó considerablemente el número de alimentos y bebidas probióticas disponibles en el mercado (FAO & OMS, 2006).

El consumo de probióticos es una tendencia y se proyecta como uno de los mercados más prometedores en la industria alimentaria. La incorporación de probióticos en productos lácteos y fermentados son muy comunes; sin embargo, la búsqueda de alimentos no lácteos ha incrementado debido a que existe un gran número de personas con intolerancia a la lactosa, pues se estima que aproximadamente el 75 % de la población mundial la padece (Brown-Esters et al., 2012). Las reacciones alérgicas a las proteínas de la leche y veganismo son otros factores que influye en esta búsqueda (Kumar et al., 2015), es por ello que se han enfocado esfuerzos en el desarrollo de diversos alimentos como cereales, vegetales, jugos, chocolates, entre otros, en donde se han incorporado los probióticos (Tripathi & Giri, 2015).

De acuerdo a la FAO y OMS, los alimentos probióticos deben tener al menos  $10^6$  UFC/g de microorganismos viables para que puedan aportar sus beneficios (FAO & OMS, 2006) aunque algunos autores sugieren que los probióticos deberían encontrarse en un alimento en una cantidad de  $10^8$  o  $10^9$  UFC/g para garantizar que después de su paso por el tracto gastrointestinal disminuyan a un mínimo de  $10^6$  UFC/g (Nazzaro et al., 2009; Hill et al., 2014). Algunos autores estiman que la cantidad de alimento a consumir para obtener un efecto terapéutico es de 100 g por día (Flach et al., 2018); sin embargo, esto resulta complejo debido a todos los factores que intervienen en la supervivencia del probiótico dentro de una matriz alimentaria como lo son la temperatura, la humedad, actividad de agua, pH y el tiempo de almacenamiento (Tripathi & Giri, 2015).

La conservación de la viabilidad de los probióticos dentro de un alimento ya sea en condiciones de congelamiento, refrigeración o temperatura ambiente sigue siendo un reto para la industria alimentaria. De acuerdo a lo que menciona Tyutkov et al. (2022), cuando se tienen probióticos en una matriz alimentaria que se almacena en condiciones de

congelación tal como sucede con helados y algunas frutas y vegetales, las células se verán seriamente comprometidas debido a diferentes factores ya que el estrés térmico tiene como resultado la desnaturalización de las proteínas celulares y daño en la membrana celular, la formación de cristales de hielo puede generar daño mecánico en las células, el cambio en la presión osmótica puede generar una plasmólisis celular, y por último, el estrés oxidativo puede generar un daño en los lípidos de la membrana y las proteínas celulares (Tyutkov et al., 2022), causando la muerte de las células que pudieran ser viables en un alimento.

En condiciones de refrigeración el principal problema para un probiótico es el estrés oxidativo, que puede desencadenar el desarrollo y generación de metabolitos tóxicos lo que conduce al daño y muerte celular, además de que se puede desencadenar una liberación de peróxidos tóxicos y radicales libres por la presencia de oxígeno en un alimento (Afzaal et al., 2018). Otro factor importante es que regularmente un alimento en refrigeración se almacena de 5 a 8 °C, lo cual no limita la reproducción celular; esto implica que las células continúan metabolizando generando peróxido de hidrógeno y ácido que son perjudiciales para su supervivencia (Mortazavian et al., 2007; Meybodi et al., 2020).

En condiciones de temperatura ambiente un factor que reduce significativamente la viabilidad de las células también es el estrés oxidativo; por ello, lo ideal es que el probiótico, al estar en una matriz seca, se encuentre con una actividad de agua de máximo 0.25 para alcanzar una vida útil de 12 meses a temperatura ambiente (Fenster et al., 2019; Vesterlund et al., 2012).

Para evitar estos efectos negativos que afectan directamente la viabilidad de los probióticos en un alimento se han recurrido a diferentes métodos de protección celular como:

- a) Liofilización, es un método de secado en donde a partir de un proceso de sublimación, se elimina el agua sin generar un daño excesivo a las células, este proceso genera su inactivación. La reactivación de las células liofilizadas no es sencilla y puede requerir técnicas especiales es por ello que adicionar células liofilizadas en un alimento reducen las posibilidades de una entrega eficaz (Tripathi & Giri, 2015).
- b) Encapsulación, es un proceso físico-químico o mecánico, en el cual se busca tener un efecto de recubrimiento o atrapamiento de las células probióticas con un material de pared que en principio debe ser compatible y no tóxico para los probióticos, con el objetivo de prevenir los efectos de la presión osmótica, el estrés oxidativo (Mokhtari et al., 2017a) las condiciones ácidas y la competencia de

patógenos. Actualmente existen varias técnicas de encapsulación que permiten obtener un tamaño de cápsula específico.

- c) Prebióticos, es una técnica prometedora que consiste en su adición para la protección de probióticos en un alimento; sin embargo, debe considerarse que su presencia en un alimento puede afectar las propiedades organolépticas de un alimento, además de que esta técnica suele tener un menor impacto en la protección de células en comparación con la encapsulación (Tyutkov et al., 2022).
- d) Los crioprotectores han demostrado que pueden ser útiles cuando se agregan al cultivo celular antes de que el alimento sea congelado, los crioprotectores pueden ser de bajo peso molecular como algunos tipos de azúcares (por ejemplo glicerol, glucosa, sacarosa, trehalosa, etc), también se usan moléculas de alto peso molecular, como: proteínas (como la proteína del suero de leche) y polisacáridos (como almidón, glucógeno, celulosa y quitina) (Bhattacharya & Bozkurt, 2018). Su función es crear una capa viscosa en la superficie celular para evitar algún daño en su membrana (Tyutkov et al., 2022).

En principio, un alimento puede ser un agente protector para los probióticos (aunque hay muy poca información al respecto), ya que la gran mayoría de alimentos están constituidos de agua principalmente además de azúcares, proteínas y lípidos que en conjunto pueden promover la reproducción celular debido que son empleados como fuente de carbono y energía (Flach et al., 2018); sin embargo, esta “protección” que pudieran impartir dependerá del tipo de matriz alimentaria. Otros factores como el contenido de humedad y la condición celular del probiótico juegan un papel importante en su supervivencia (Endo et al., 2014), sobre todo ante las diferentes condiciones de procesamiento y almacenamiento prolongado tal como se describe en el ensayo de Naissinger da Silva et al. en 2021, en donde al evaluar diferentes tipos de alimentos comerciales se comprobó que la gran mayoría no cumplían con la cantidad de probióticos mínima requerida para considerarse un alimento probiótico. Sin duda alguna, la búsqueda de diferentes métodos y materiales de protección para los probióticos que garantice su entrega eficaz dentro de un alimento seguirá siendo un reto para la industria alimentaria.

## **Regulación de alimentos con probióticos**

Actualmente, al menos en Latinoamérica, se sabe que en la mayoría de alimentos con probióticos estos son adicionados directamente sobre la matriz alimentaria, siendo los alimentos lácteos los más conocidos; sin embargo, la mayoría de probióticos no son capaces de sobrevivir en las condiciones dadas durante el proceso de pasteurizado, tiempo y temperaturas de almacenamiento, cambios de pH, así como a las condiciones ácidas y enzimáticas del estómago (Semyonov et al., 2010) dado que la matriz alimentaria en la cual

se encuentra inmerso el probiótico no le provee protección alguna, por lo que es poco probable que puedan sobrevivir o conservar la viabilidad que se necesita para promover sus efectos benéficos. Por ello, es de gran importancia proteger a los probióticos ante factores ambientales adversos.

Además, se espera que puedan ser capaces adherirse al intestino y colonizarlo con el propósito de competir con otros microorganismos patógenos (Dindhoria et al., 2022), sin embargo, para generar la colonización del intestino y no verse inhibido por otro microorganismos del propio intestino ( Kumar & Kumar, 2015) es necesario que lleguen en una cantidad adecuada.

A esto se suma la investigación que realizaron Naissinger da Silva et al. (2021), en Brasil en donde al evaluar la supervivencia de los probióticos de 11 productos alimenticios comerciales, ante condiciones del tracto gastrointestinal (*in vitro*), encontraron que sólo dos de estos productos cumplían con la concentración de probióticos que indicaban en su etiquetado. Estos dos productos corresponden a una leche fermentada probiótica y a los microorganismos protegidos por cápsulas (microencapsulados). Los autores indican que es necesario el desarrollo y uso de tecnologías que contribuyan a mantener la viabilidad de los probióticos en condiciones de almacenamiento y digestión; así mismo, los autores mencionan que se requiere de una regulación que obligue a los fabricantes de productos con contenido de probióticos a garantizar que la concentración de probióticos impresa en sus etiquetas sea verdadera, ya que estos productos suelen utilizar un etiquetado atractivo que inducen al consumidor a comprar estos probióticos y no están brindando los beneficios que declaran en sus envases (Naissinger da Silva et al., 2021).

En este sentido y particularmente en el caso de México se sabe que no existe regulación para este tipo de productos (alimentos con contenido de probióticos), únicamente el Estado pone a disposición para su cumplimiento la NOM-051-SCFI/SSA1-2010, “Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-información comercial y sanitaria”, y la NOM-086-SSA1-1994, “Bienes y Servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales”, en donde no se hace ninguna referencia al contenido de probióticos en alimentos. Es la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) quien se encarga de evaluar la seguridad e inocuidad en productos de consumo humano y concede los permisos para comercializar cualquier producto en el territorio mexicano; sin embargo, dentro sus funciones no se encuentra la regulación y verificación del contenido de probióticos en un alimento.

Por otro lado, en los países de la Unión Europea si existen requisitos regulatorios para este tipo de alimentos y desde el 2006 han sido más estrictos, obligando a los fabricantes a tomar en cuenta la viabilidad y la función probiótica en sus productos para poder declarar que tiene una propiedad saludable (Jankovic et al., 2010). El organismo encargado de regular a este tipo de productos es la "Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria" (EFSA).

Otro país que cuenta con una regulación al respecto es Canadá y en 2009 publicó una guía que tiene por objetivo aclarar el uso aceptable de las declaraciones de propiedades saludables de los probióticos en las etiquetas de los alimentos y en la publicidad; de igual manera proporciona orientación respecto a la seguridad, estabilidad, calidad y etiquetado de estos productos. Quien se encarga de verificar su cumplimiento es la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos (CFIA) (Health Canada, 2009).

En Estados Unidos de América aún no existen estándares gubernamentales similares a los de la Unión Europea; sin embargo, la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) evalúa que los fabricantes de este tipo de alimentos proporcionen una justificación científica antes de realizar cualquier tipo de declaración de propiedad saludable en un alimento. En 2009 publicó una guía para la industria alimentaria sobre un "Sistema de revisión basado en la evidencia para la evaluación científica de las declaraciones de propiedades saludables" en donde se describen algunas recomendaciones a los fabricantes para fundamentar una afirmación de propiedad saludable (FDA, 2009).

La regulación de los alimentos probióticos es un factor importante para que estos cumplan con el contenido adecuado para ejercer beneficios en la salud; sin embargo, es en pocos países en donde se lleva a cabo el control de este tipo de alimentos.

### ***Lacticaseibacillus rhamnosus GG***

En principio, cualquier componente de la microbiota comensal podría ser candidato a convertirse en probiótico, pero los más utilizados pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, considerados GRAS (Generally Recognized As Safe) y QPS (Qualified Presumption of Safety) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA-por sus siglas en inglés) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), respectivamente. De igual modo, se han utilizado con este fin, bacterias que pertenecen a otros géneros por ejemplo *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, así como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Sacharomyces. boulardii* (FAO & OMS, 2006).

La recientemente reclasificada *Lacticaseibacillus rhamnosus GG* (LGG), conocida anteriormente como *Lactobacillus rhamnosus GG*, es una bacteria Gram positiva que fue aislada originalmente del intestino humano sano (Reid et al., 1987), y en 1989 se convirtió

en la primera cepa perteneciente al género *Lactobacillus* en ser patentada, debido a su capacidad de sobrevivir y proliferar en las condiciones ácidas del estómago y a la presencia de sales biliares. Otra característica que la cataloga como un buen modelo probiótico es su capacidad de adherencia y adherirse a los enterocitos (células epiteliales del intestino), lo que asegura que este microorganismo tendrá la capacidad de colonizar, proliferar y generar un efecto benéfico en la salud de quien lo consume.

Actualmente existen un número creciente de estudios clínicos que demuestran su uso en la prevención y tratamiento de diferentes trastornos de salud, como la resistencia a insulina, sobrepeso (Kim et al., 2021), dermatitis atópica, tratamiento de problemas gastrointestinales (Hojsak et al., 2010; Sireswar et al., 2021), diarrea asociada a antibióticos en niños (Mantegazza et al., 2018), reducción de colesterol, ansiedad y depresión post parto (Slykerman et al., 2017), diabetes mellitus tipo 2 (Sanborn et al., 2020) y prevención de enfermedades respiratorias (Das et al., 2022).

En la Tabla 2 se muestran las principales características, así como las condiciones óptimas de crecimiento del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Tabla 2. Principales características y condiciones óptimas de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* GG

Característica	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
Célula	Procariota
Tamaño	0.8 a 1.0 µm de ancho y 2.0 a 4.0 µm de longitud
Forma	Varilla
Morfología colonial	Las colonias 2-5 mm., elevación, convexas., consistencia, suaves., con bordes márgenes enteros, luz transmitida, opaca.,s y sin pigmentos
Afinidad tintorial	Gram positiva
Medio de cultivo	MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, que por su formulación permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas).
Temperatura de crecimiento	15-42 °C
pH	4.5 a 6.4
Requerimiento de oxígeno	Anaerobia facultativa
Metabolitos secundarios principales	Ácido láctico, acético, fórmico y etanol

En términos generales, LGG es capaz de sobrevivir a concentraciones de sales biliares de hasta 1.5 %, resiste condiciones ácidas de hasta pH 2.5 y puede crecer en temperaturas de hasta 45 °C (Reale et al., 2015).

LGG es una de las cepas mayormente empleadas en la industria alimentaria (Linares et al., 2016); sin embargo, para poder protegerla de diferentes factores durante su procesamiento y almacenamiento se han empleado diferentes técnicas, siendo el microencapsulado una de las más eficientes para recuperar el mayor número de células (Ningtyas et al., 2019; Moayyedi et al., 2018; Barajas-Álvarez et al., 2022).

### **Prebióticos**

El término "prebiótico" ha ido evolucionando con el tiempo, fue en 1995 cuando Gibson y Roberfroid, los definieron como "*ingredientes alimenticios no digeribles, que exhiben efectos beneficiosos sobre el huésped al estimular selectivamente el crecimiento y la proliferación de una o varias bacterias específicas en el colon que mejoran sustancialmente la salud del huésped*" (Gibson & Roberfroid, 1995). En 2004, los mismos autores actualizaron esta definición a "*ingredientes fermentados selectivamente que mejoran específicamente la actividad y la composición de la microflora gastrointestinal y proporcionan beneficios para la salud y el bienestar del huésped*", además, indica que los prebióticos deberán tener la capacidad de resistir a las condiciones de digestión del huésped para ser fermentados por la microflora intestinal (Gibson et al., 2004). Sin embargo, actualmente se entiende como prebióticos a los compuestos bioquímicos que pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal. Esta nueva definición incluye a una gran cantidad de biomoléculas como oligosacáridos, fibras fermentables, polifenoles y ácidos grasos, y no únicamente a carbohidratos (That et al., 2022) y se pueden encontrar naturalmente en algunos alimentos como en los espárragos, frijoles, lentejas, hongos y cereales (García-Mazcorro et al., 2017).

El mecanismo mediante el cual los prebióticos brindan beneficios en la salud será específico para cada compuesto y dependerá directamente de la estimulación selectiva de los microorganismos dentro de la microbiota intestinal, es decir, el prebiótico funciona como un sustrato para cierto tipo de microorganismos promoviendo su crecimiento, desarrollo y función de ciertas cepas bacterianas, que contribuyen al bienestar de la comunidad microbiana y del cuerpo humano, además de que pueden generar una respuesta inmune y de protección contra patógenos; así mismo, los prebióticos facilitan el metabolismo del huésped y favorecen la absorción de minerales Figura 1 (Delphine et al., 2009; Khangwal & Shukla, 2019).

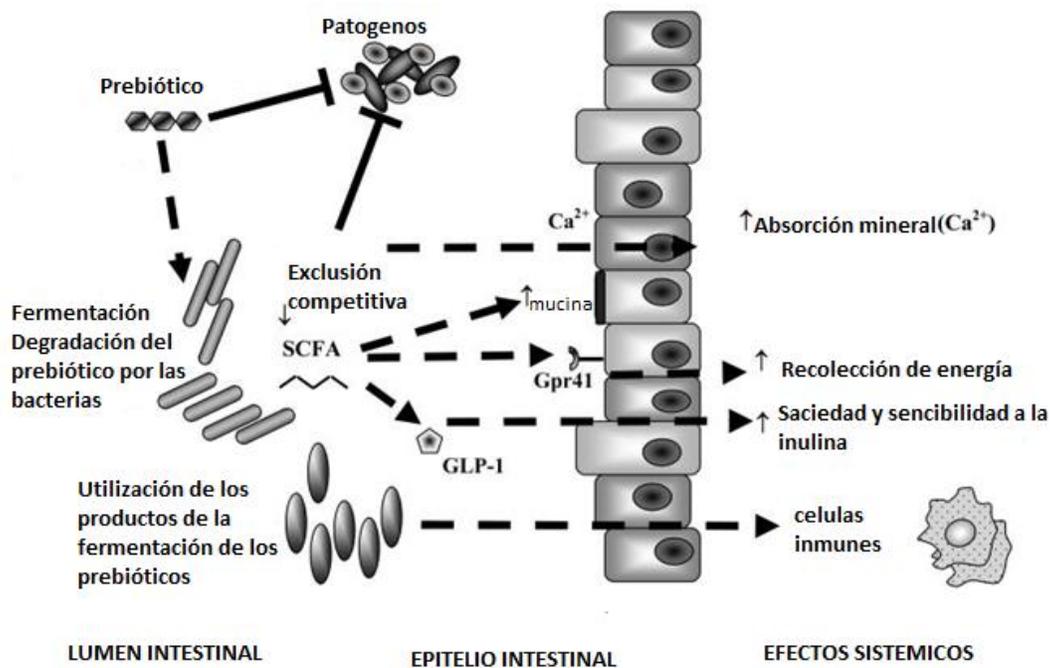


Figura 1. Representación de las funciones beneficiosas de los prebióticos en el tracto gastrointestinal de mamíferos y sus efectos sistémicos. \*Ca<sup>2+</sup>: Calcio; GLP-1: Péptido similar al glucagón-1; Gpr41: Receptor acoplado a proteína G 41; SCFA: ácido graso de cadena corta.

Nota: Adaptado de “Mechanisms of Probiosis and Prebiosis: Considerations for Enhanced Functional Foods” (p. 135–141) por Delphine M. A. S., Jennifer K. S., Glenn R. G. & James V. (2009), *Current Opinion in Biotechnology*, 20 (2).

Actualmente, el uso de prebióticos se ha extendido al tratamiento y prevención de diferentes padecimientos tales como el de mejorar la salud intestinal (de Kivit et al., 2014), obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos y cáncer (Dinesh et al., 2017; Goetze et al., 2008), prevención de alergias en niños (Grimshaw et al., 2017), cirrosis (Ballini et al., 2020), síndrome del intestino irritable (SII) (Menees & Chey, 2018), mejora de los niveles de colesterol (Mudgil et al., 2018) y efecto antiinflamatorio (Chung et al., 2017).

La industria alimentaria ha empleado una gran variedad de compuestos prebióticos en sus productos; algunos de los compuestos prebióticos que están disponibles en el mercado son la inulina, algunos fructooligosacáridos, galactooligosacáridos y la goma guar (Madsen et al., 2017). En EUA se tienen disponibles de manera comercial algunos productos que se mencionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Productos comerciales con contenido de prebióticos y su declaración de propiedad saludable en EUA.

Producto comercial	Prebiótico como aditivo	Declaración de propiedad saludable
Early Advance™ Infant Formula	Galacto-oligosacáridos	Ayuda a estimular el crecimiento de bacterias saludables, que apoyan el desarrollo del sistema inmunológico
LiveActive™ Cottage Cheese	Inulina (3 g)	Sirve como fuente de alimento para las bacterias probióticas
Silk plus para la salud ósea Leche de soja	Fructano (1 g)	Ayuda a promover la salud ósea
Cereales LiveActive™	Inulina (3 g)	Ayuda a promover la salud digestiva
Yogur Yo-Plus™	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12™ e inulina	Ayudar a mantener un equilibrio saludable de bacterias amigables en el sistema digestivo.

Algunos alimentos como la leche fermentada, el queso y otras bebidas lácteas se han empleado como transporte de algunos prebióticos como de lactosucrosa, fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), pectina, inulina, almidones resistentes, entre otros (Martín-Ortiz et al., 2017).

Para la obtención de algunos compuestos o moléculas con efectos prebióticos se requieren de ciertos procesos, tal es el caso de la hidrólisis enzimática del xilano para la obtención de productos prebióticos como los xilooligosacáridos (XOS) o la modificación fisicoquímica o enzimática del almidón para la obtención de almidón resistente.

### **Pectina**

La pectina es un heteropolisacárido que naturalmente se encuentra en la pared celular y en la lámina media de las plantas (Kumar et al., 2020). Es uno de los polisacáridos más importantes, posee una de las estructuras más complejas y se conforma por unidades repetitivas de residuos (1 → 4)- $\alpha$ -D-GalA (ácido galactopiranosilurónico), parcialmente metil-esterificados en la posición O-6 (y en menor medida también acetil-esterificados en O-2 u O-3). De acuerdo con el grado de metilación se puede clasificar como pectina de alto metoxilo (grado de metilación >50%) y pectina de bajo metoxilo (grado de metilación <50%). La estructura es interrumpida por regiones ramificadas compuestas de (1 → 2)-unidades de  $\alpha$ -l-ramnosa (regiones RG-I) que unen a los azúcares neutros adicionales,

incluyendo galactosa, arabinosa, xilosa y fructosa. Se sabe que en solución los grupos carboxilo libres presentes en la estructura de la pectina pueden formar puentes de hidrógeno con grupos hidroxilo de otras moléculas lo que puede resultar en la conformación de geles (Xie et al., 2021).

La pectina es considerada una fibra dietética, por lo tanto, es un material que no se hidroliza en la parte superior del tracto gastrointestinal y es degradada únicamente por la microbiota intestinal. Se considera un prebiótico ya que su consumo tiene efectos benéficos importantes en la salud humana, por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (Yener et al., 2022), prevención de daño pancreático (S. Hu et al., 2020) y la mejora del sistema inmunológico (Elshahed et al., 2021).

La pectina es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica y alimentaria ya que, además de los beneficios en la salud, tiene propiedades específicas de gelificación, espesamiento y emulsificación (Cazón et al., 2017) que la industria alimentaria emplea para proporcionar texturas deseables y propiedades mecánicas a los alimentos; también ha sido ampliamente utilizada para administrar fármacos cuyo objetivo de liberación es el colon (Assifaoui et al., 2011; Dhalleine et al., 2014; El-Gibaly, 2002) debido a que posee una gran capacidad para entregar compuestos al intestino y recientemente se han estudiado para la microencapsulación de probióticos (Dafe et al., 2017). Debido a su capacidad de presentarse como agregados de macromoléculas en ambientes ácidos y además es resistente a las proteasas y amilasas, enzimas activas en el tracto gastrointestinal superior (Subhedar et al., 2021).

### **Almidón**

El almidón es uno de los polisacáridos más importantes para el ser humano, se encuentra entre los tres principales polisacáridos más abundantes en la naturaleza, además de la celulosa y la quitina que son moléculas estructurales. El almidón es un carbohidrato de almacenamiento y por lo tanto es también una fuente importante de energía (Wang et al., 2012).

En su forma natural se encuentra en plantas y semillas, en forma de gránulos insolubles y semi cristalinos. Estos gránulos se componen de dos polímeros: amilosa y amilopectina, la proporción de amilosa y amilopectina varía dependiendo del origen botánico, un rango general para el almidón en su forma nativa es de entre 18 al 28 % para la amilosa, y del 72 a 82 % para la amilopectina (Sasaki et al., 2002).

La amilosa es un polímero lineal de unidades de glucosa (200 a 2500) unidas por enlaces glucósidos  $\alpha$ -(1-4) y la amilopectina es un polímero altamente ramificado con cadenas

lineales de unidades de glucosa (15 a 25) unidas por enlaces glucósidos  $\alpha$ -(1-4) y en una menor proporción con enlaces  $\alpha$ -(1-6) interconectados aproximadamente cada 22 unidades de glucosa (Yoshimoto et al., 2002; Takeda et al., 1989).

La estructura molecular de estos dos polímeros (amilosa y amilopectina) determinará las características fisicoquímicas y funcionalidad del almidón, ya que dentro de un gránulo de almidón se encuentran como estructuras altamente organizadas, se ha descrito que la conformación de las zonas amorfas está definida por la amilosa y las zonas cristalinas por la amilopectina tal como se muestra en la Figura 2 (Yoshimoto et al., 2002; Takeda et al., 1989).

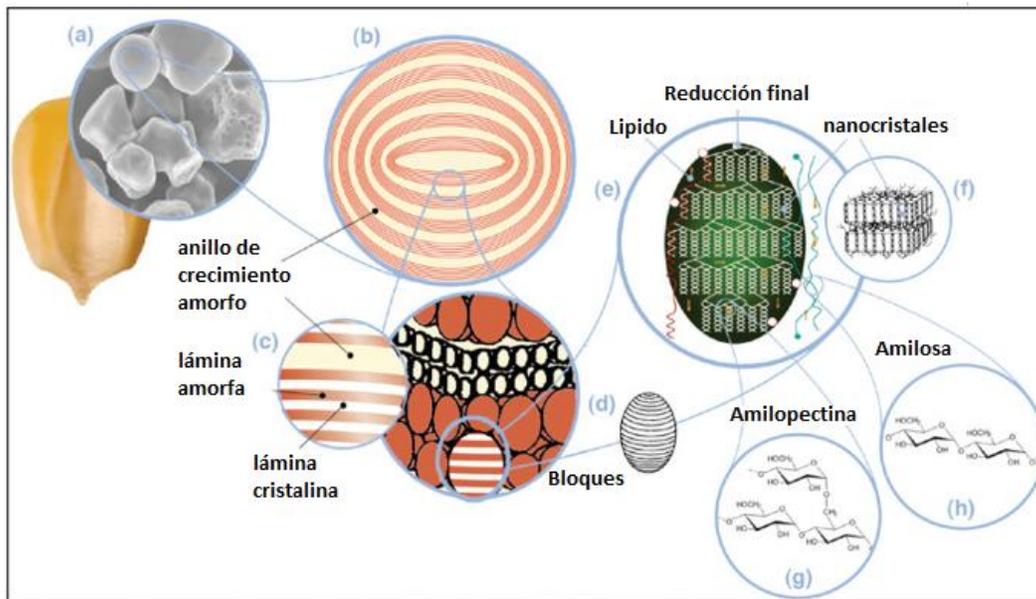


Figura 2. a) Estructura de un gránulo de almidón (2–100  $\mu\text{m}$ ), b) anillos de crecimiento de tamaño submicrónico, c y d) estos anillos de crecimiento se forman de bloques de 20 a 50 nm que consisten en láminas amorfas y cristalinas (9 nm) que contienen e, f, g y h cadenas de amilopectina y amilosa (0.1–1 nm).

Nota: Adaptado de “Starch nanoparticles: a review” (p. 1139–1153), por Le Corre D., Bras J. & Dufresne A., 2010, *Biomacromolecules*, 10;11(5).

Además del almidón normal, se pueden encontrar otros dos tipos de almidón, los cuales se clasifican de acuerdo con la proporción de amilosa/amilopectina: almidón ceroso y alto en amilosa.

El almidón ceroso contiene una cantidad muy pequeña de amilosa (inferior al 10 %); este tipo de almidón se utiliza generalmente en la producción de budines, salsas y panes para proporcionar estabilidad, textura y espesamiento debido a que presenta una mayor

viscosidad y menor tendencia a retrogradar en comparación con los almidones normales (Zhang et al., 2022a).

El almidón alto en amilosa contiene más del 50% de amilosa; este tipo de almidón exhibe mejores propiedades mecánicas que los almidones cerosos y normales, debido a la gran cantidad de estructuras lineales (dadas por la amilosa), lo cual se traduce en una mejor capacidad de procesamiento y en la conformación de películas que se asemejan al uso de polímeros sintéticos tradicionales (Wan et al., 2022).

A nivel mundial el mercado del almidón industrial proyecta un crecimiento a una tasa de crecimiento anual compuesta del 5.75 a 5.90 % para el 2025, esto representa ganancias de entre \$67 a \$112 000 millones de dólares (USD), en América del Norte el mercado de almidón industrial se valora en aproximadamente \$20 mil millones, siendo Estados Unidos quien lo liderea (con 14.000 millones de dólares), seguido de México (2.400 millones de dólares) y Canadá (2.000 millones de dólares) y se estima que para 2025, el mercado norteamericano superará los \$24 000 millones de dólares (Mordor-Intelligence, 2020).

El uso del almidón se extiende a diferentes sectores, tal es el caso de la industria textil, en donde se emplea para mejorar la resistencia, la elasticidad de las telas, así como en lavandería; la industria del papel y cartón se utiliza para mejorar las propiedades de resistencia, para modificar la reología adhesiva del papel, para reducir la energía y tiempos de secado; en la fabricación de pegamentos se aprovecha para mejorar la resistencia a la humedad y la penetración del pegamento, y en la industria farmacéutica se emplea para la fabricación de tabletas y en la industria cosmética se usa para dar versatilidad, unión, fluidez y mejorar los poderes de desintegración de sus productos (Adewale et al., 2022).

### **Almidón resistente**

El almidón resistente (AR) se define como la porción de almidón que no puede ser digerido por las enzimas del sistema digestivo, por lo tanto, se mantiene íntegro en el tracto gastrointestinal. Esta resistencia a la digestión se atribuye principalmente a su estructura física que está determinada por la relación amilosa/amilopectina, así como su organización dentro del gránulo (en su forma nativa), su fuente de obtención o naturaleza y a las condiciones de procesamiento (almidones modificados). Todos estos factores influyen en la estructura del almidón. Se sabe que cuando la estructura es más compacta será menos susceptible a la hidrólisis enzimática (Leeman et al., 2005) y estas mismas condiciones determinan sus propiedades funcionales (Wang et al., 2012).

El AR se divide en cinco categorías de acuerdo con su naturaleza y su localización en los alimentos (Gabriel et al., 2021).

- ✓ Almidón resistente tipo 1, es el almidón físicamente inaccesible presente en

legumbres, cereales y semillas crudas.

- ✓ Almidón resistente tipo 2, son los gránulos de almidón nativo parcialmente cristalino, presente en alimentos crudos como la papa y plátanos verdes.
- ✓ Almidón resistente tipo 3, es el almidón recristalizado o retrogradado, es el almidón que resulta de un proceso de gelatinización y enfriamiento.
- ✓ Almidón resistente tipo 4, es el almidón modificado químicamente; entre las reacciones más comúnmente aplicadas se puede mencionar acetilación, metilación, fosforilación, esterificación y reticulación (proceso mediante el cual se requiere de una serie de reacciones químicas entre cadenas de los polímeros para que puedan unir).
- ✓ Almidón resistente tipo 5, es el acomplejamiento de la fracción de amilosa del almidón con lípidos, grasas y surfactantes.

Comúnmente se puede encontrar al almidón resistente en alimentos como la pasta cocida, papa, puerro, granos enteros naturales, avena y arroz cocido y enfriado, legumbres, frijoles, entre muchos otros (Bello-Perez et al., 2020).

Al ser considerado un prebiótico su consumo se han asociado a algunos beneficios en la salud (Misra et al., 2021), como la modulación positiva de la salud intestinal, que deriva en una reducción del riesgo de padecer diversas enfermedades metabólicas y el fortalecimiento del entorno de la mucosa colónica; también tiene una importante influencia en la mejora de varios padecimientos como la obesidad, el control de peso (Thompson et al., 2022), la enfermedad inflamatoria intestinal, la hipercolesterolemia y el cáncer colorrectal (Kadyan et al., 2022), es capaz de promover la salud inmunitaria (Dobranowski & Stintzi, 2021). Recientemente se ha estudiado su uso en el tratamiento de enfermedades renales crónicas (Snelson et al., 2019; Bojarczuk et al., 2022) y la regulación de los niveles de glucosa en sangre, así como el control y prevención de diabetes (Bello-Perez et al., 2020).

### **Almidón resistente tipo 3**

La obtención de almidón resistente tipo 3 se deriva de la retrogradación del almidón (ARet) que ha sido gelatinizado. El proceso de gelatinización se logra a partir del calentamiento del almidón en presencia de agua, en donde los gránulos de almidón (en su forma nativa) se destruyen, así, las cadenas de almidón gelatinizadas se encontrarán en un estado desplegado y desordenado. A partir de la reducción de la temperatura, las estructuras de amilosa y amilopectina se reorganizan para dar paso a la retrogradación del almidón y a una porción de este almidón retrogradado se le ha denominado almidón resistente tipo 3 (AR3). Algunos de los efectos benéficos son la mejora de la salud intestinal mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta cuando es utilizado como sustrato por la microbiota

intestinal, además de generar un aumento en la saciedad mediante la inducción de producción de hormonas relacionadas a la saciedad (Kelly et al., 2015), también se relaciona con una mejora en el control del peso corporal a través de una reducción de la insulina (Romero-Gonzalez et al., 2015).

Se sabe que las cadenas de amilosa son las primeras en conformar estructuras helicoidales que corresponden a un estado más ordenado, después, con el paso del tiempo la amilopectina adopta esta misma conformación. Se ha reportado que las condiciones de almacenamiento (Li et al., 2022a; Corrado et al., 2022), así como las condiciones del tratamiento (You et al., 2022) definen el grado de retrogradación y la cantidad de almidón resistente tipo 3 (Soler et al., 2020; Chang et al., 2021).

La conformación de estas estructuras helicoidales ocurre a mediante enlaces de hidrógeno (Lu et al., 2023) y esta reorganización del almidón resultará en una mayor resistencia en condiciones ácidas y enzimáticas del tracto gastrointestinal, debido a la incapacidad de la  $\alpha$ -amilasa para hidrolizar las cadenas que participan en una estructura cristalina o altamente ordenada ya que este cambio en la estructura hace que no pueda encajar en el sitio activo de la enzima (Li et al., 2022b).

En los últimos años se ha presentado un gran interés por la obtención de almidón retrogradado bajo diferentes métodos y condiciones. Este interés surge a partir de que el almidón retrogradado muestra excelentes propiedades fisicoquímicas como: estabilidad térmica, baja capacidad de retención de agua, buena textura y apariencia, y por su capacidad de mejorar las propiedades organolépticas en un alimento (Adewale et al., 2022), además de algunos efectos benéficos en la salud que se obtienen a partir del consumo de almidón resistente tipo 3, se ha demostrado que un almidón con un alto contenido en amilosa conforma una mayor cantidad de almidón resistente (hasta 39 %) en comparación con almidón nativo (6 %) (Soler et al., 2020).

Los métodos empleados para la modificación en la estructura del almidón para la obtención de almidón resistente tipo 3 se pueden clasificar en tres categorías: química, enzimática y física.

Dentro de las modificaciones químicas se encuentran a la hidrólisis ácida (Soler et al., 2020), oxidación (Yu et al., 2017), reticulación (Kim et al., 2012), esterificación (Mei et al., 2015) y eterificación (Singh et al., 2007).

Para una modificación enzimática se utilizan enzimas con actividad amilolítica que pueden alterar la capacidad de retención de agua, la permeabilidad al agua de las películas o aumentar la hidrofobicidad del almidón (Xu et al., 2020; Zhou et al., 2019); sin embargo, se

ha reportado que estas técnicas de modificación son caras y puede generar residuos peligrosos (Deka & Sit, 2016).

La modificación física del almidón es la técnica más empleada debido a que es de bajo costo, y se pueden dividir en dos grupos, las térmicas y no térmicas.

La modificación térmica se lleva a cabo en presencia de agua y lo que ocurre es la modificación del almidón al aplicar una energía térmica para romper las interacciones electrostáticas intermoleculares del almidón. Las técnicas térmicas más comunes son: calor-humedad (Soler et al., 2020), recocado (Fonseca et al., 2021; Gangopadhyay et al., 2022), pre-gelatinización (Alavi et al., 2022; Nasir et al., 2021), presión osmótica (Fasuan & Akanbi, 2018; Błaszczak et al., 2007) y microondas (Wang et al., 2022; Cao et al., 2022).

Las técnicas no térmicas incluyen ultrasonido (Wang et al., 2022), campo eléctrico pulsado (Leong et al., 2022), congelación y descongelación (Zhang et al., 2022b), alta presión (Sun et al., 2022) y fresado (Limpongsa et al., 2021).

Los cambios en la estructura del almidón pueden ser descritos mediante diferentes técnicas como microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X, espectroscopía de Raman y reología (Yang et al., 2021; Soler et al., 2020; Zeng et al., 2022; Lu et al., 2023; Warren et al., 2016).

### **Microencapsulación de probióticos**

La microencapsulación de probióticos ha sido reconocida como una alternativa para aumentar la resistencia de los microorganismos a factores ambientales durante su almacenamiento y tránsito a través del tracto gastrointestinal (De Araújo et al., 2015).

La encapsulación puede definirse como una técnica para atrapar una sustancia bioactiva dentro de otra sustancia, la cual puede llamarse recubrimiento, membrana, cáscara, material portador, fase externa o material de pared (Mokhtari et al., 2017b). En el proceso se pueden producir micro partículas con diámetros de 1  $\mu\text{m}$  a 1 mm (Pinto et al., 2015). La función principal de un encapsulado es proteger su contenido de diversos factores ambientales como: pH, temperatura, humedad, acidez, luz, oxígeno, calor, entre otros. De igual manera se emplean para una liberación controlada en alguna parte específica del organismo (De Araújo et al., 2015).

Actualmente se conocen dos tipos de microcápsulas, las primeras se describen por la presencia de un núcleo en el cual se encuentra el principio activo (los probióticos), este se encontrará rodeado por una pared, conformando así una microesfera o micropartícula, y la segunda se presenta cuando los probióticos se incorporan e integran homogéneamente dentro del material (Razavi et al., 2021), en esta última se aprovecha la capacidad para la formación de hidrogeles que tienen los polisacáridos y algunas proteínas (Echalier et al., 2019). Actualmente existe una tendencia en el uso de hidrogeles para el encapsulamiento de probióticos ya que brindan importantes ventajas sobre la conservación de viabilidad de probióticos bajo diferentes condiciones (Bai et al. 2021; Razavi et al. 2021).

La conformación de un hidrogel consiste en la formación de redes poliméricas tridimensionales de macromoléculas que forman estructuras aptas para encapsular o atrapar agua; esta capacidad de atrapamiento se ha empleado para encapsular células probióticas. La conformación de este tipo de estructuras se ha demostrado que también poseen mecanismos específicos que permiten una liberación controlada (Chen et al., 2019).

Las propiedades de los hidrogeles van a estar definidas en principio por el o los materiales empleados (Guilherme et al., 2015), así como las condiciones de su proceso; estos factores van a definir el tipo de hidrogel que se obtenga y pueden ser geles de blandos a duros, reversibles a irreversibles; el tipo de hidrogel va a influir en la estabilidad de los materiales encapsulantes ante las condiciones de almacenamiento y de digestión (factores pH, enzimáticos, mecánicos durante la masticación y el movimiento peristáltico gastrointestinal) (Wu & McClements, 2015) (Li et al., 2016).

Debido a que las propiedades de estabilidad y liberación del encapsulado depende principalmente de la composición de los materiales de pared, se han empleado varios portadores para la micro encapsulación de probióticos como: proteínas, alginatos (Ta et al., 2021), almidón (Macías-Cortés et al., 2020), pectina (Eswaramma et al., 2017) y lipoproteínas (Zhou et al., 2018).

El alginato es uno de los materiales de pared más reportado para el encapsulamiento de probióticos; sin embargo, ha habido un creciente interés en su sustitución total o parcial por otros polisacáridos debido principalmente a que el alginato como sistema encapsulante tiene limitaciones por su baja estabilidad en presencia de ciertos iones de calcio y cationes como sodio o magnesio (Smidsrød & Skjåk-Bræk, 1990). Además, se ha reportado que los geles de alginato poseen una alta porosidad y sensibilidad a condiciones de pH bajo lo que puede causar una liberación más rápida y temprana de los probióticos (Gombotz & Wee, 2012).

Por otro lado, la encapsulación de probióticos se ha realizado principalmente utilizando los siguientes métodos:

I. Extrusión: se realiza una mezcla de las células probióticas junto con hidrocoloides (biopolímeros que producen espesamiento o gelificación al dispersarse en agua), la cual se extruye utilizando bajos contenidos de agua, con lo que se logra la gelificación instantánea de la mezcla del hidrocoloide y los probióticos que culmina en la formación de pellets. Los pellets del hidrocoloide con los probióticos se mezclan con una solución de endurecimiento y se secan a altas temperaturas (160 a 260 °C) (Rodrigues et al., 2020).

II. Emulsificación: consiste en la dispersión de dos líquidos inmiscibles con un agente estabilizador, que generalmente presenta una mayor afinidad a la fase continua que a la fase dispersa. Se puede utilizar un agente solidificante (calcio) para separar las gotas formadas en la fase dispersa de la fase continua. La emulsificación puede dividirse en dos mecanismos: gelificación externa y gelificación interna (Alemzadeh et al., 2020).

III. Secado por aspersión: consiste en la atomización de una solución que contiene el agente encapsulado utilizando aire a alta temperatura (hasta 200°C), formando instantáneamente un polvo (Arepally & Goswami, 2019; Ray et al., 2016). Los parámetros clave del proceso son el flujo de aire, la temperatura de alimentación y la temperatura del aire de entrada/salida (Liu et al., 2019).

IV. Secado por congelación: es análogo al secado por aspersión debido a que también se producen pequeñas gotas. Sin embargo, en esta técnica el agente encapsulado se dispersa en una matriz líquida, formada por lípidos, que se atomiza en una cámara donde se inyecta aire frío, lo que permite la solidificación de las partículas. En el proceso se utilizan crioprotectores para minimizar las lesiones por frío en los probióticos encapsulados (Pedroso et al., 2013).

V. Procesos electrohidrodinámicos: uno de ellos es el electrospinning que consiste en un proceso de hilado electrostático de fibras poliméricas y el electrospray se genera a partir de un dispositivo que emplea electricidad para dispersar un líquido (solución polimérica) en donde se utilizan campos electrostáticos de alta tensión para cargar la superficie de las gotas de solución de polímeros o biopolímeros. Cuando el campo eléctrico aplicado supera la tensión superficial de la solución, se expulsa un chorro cargado hacia el colector formando fibras y se lleva a cabo el proceso de electrospinning. Cuando la concentración de polímero es demasiado baja y desestabiliza el chorro debido a la inestabilidad de la suspensión, formando gotas finas altamente cargadas con una morfología esférica ocurre el proceso de electrospray (Lim et al., 2019; Mendes & Chronakis, 2021).

En esencia se busca que el método de encapsulación no sea agresivo para los microorganismos, reduciendo o previniendo lesiones y pérdidas celulares (De Araújo et al., 2015); sin embargo, la mayoría de estos métodos emplean temperaturas muy altas o bajas, además de que pueden llegar a emplear compuestos tóxicos para los microorganismos, durante la conformación de las cápsulas (de Araújo Etcheparea et al., 2016; Wang L. et al., 2020; Santos et al., 2019; Pedroso et al., 2013; Mendes & Chronakis, 2021)

En este sentido, la selección del método de encapsulación y el material de pared se vuelve crucial para el éxito de un encapsulado.

### **Almidón y pectina como agentes microencapsulantes**

Actualmente, diversos estudios (Tabla 4) han demostrado que el uso de almidón resistente tiene un efecto importante sobre la eficiencia de encapsulación. En los reportes se emplea en combinación con diferentes macromoléculas como proteínas, polisacáridos y lípidos. En la mayoría de las investigaciones se ha estudiado el almidón resistente tipo 1 y 2, algunos reportan uso de almidón resistente modificado por métodos químicos (Ta et al., 2021; Ashwar et al., 2021) y existe un menor número de reportes sobre del uso del almidón resistente tipo 3.

Tabla 4. Estudios sobre el uso de almidón resistente para la encapsulación de probióticos con los resultados más relevantes.

<b>Material de pared</b>	<b>Tipo de almidón resistente/ condiciones de estudio</b>	<b>Probiótico</b>	<b>Método de encapsulación</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
<b>Alginato-almidón resistente</b>	AR tipo 4  Alginato al 2 %, almidón alto en amilosa al 2 %  Condiciones gastrointestinales simuladas	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium spp.</i>	Emulsión	El almidón aumentó en 4 % la eficiencia de encapsulación. En condiciones gastrointestinales simuladas no ofreció protección en las células encapsuladas	(Sultana et al., 2000)
<b>Almidón de taro y arroz</b>	AR tipo 1 y 2  El almidón de taro con 17% amilosa y el de arroz 86% amilosa	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Secado por aspersion	El almidón de taro brindó mayor protección con una eficiencia de encapsulación del 90 %. Se empleó la temperatura mínima del proceso de secado (70 °C).	(Alfaro-Galarza et al., 2020)

	Condiciones gastrointestinales simuladas y almacenamiento			La viabilidad se mantuvo bajo condiciones gastrointestinales y de almacenamiento	
<b>Alginato y almidón resistente</b>	AR tipo 4  Almidón alto en amilosa. Concentración de componentes 2 %  Condiciones gastrointestinales simuladas	<i>Lactobacillus casei</i>	Extrusión	Eficiencia de encapsulación del 79 %. La viabilidad se mantuvo en condiciones gastrointestinales simuladas.	(Ta et al., 2021).
<b>Pectina-almidón</b>	AR tipo 3  Se evaluaron diferentes proporciones de almidón:pectina.  No se describe contenido de amilosa	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Extrusión	Eficiencia de encapsulación de 94 % con una proporción 75:25 de almidón:pectina.  Conservó la viabilidad en condiciones gastrointestinales simuladas	(Dafe et al., 2017)

Con base en esta información se puede mencionar que, en general, la presencia de almidón resistente tiene un claro efecto de conservar la viabilidad en condiciones gastrointestinales simuladas. En todos los estudios se reportan el uso de los métodos de encapsulación más populares como extrusión, emulsión y secado por aspersion y, aunque no mencionan el porcentaje de pérdida celular por el uso de estos métodos, sus eficiencias de encapsulación son muy buenas obteniendo del 79 al 94 % en condiciones gastrointestinales simuladas.

El uso de la pectina como agente encapsulante no ha sido tan popular como el almidón, sin embargo, hay quienes lo han empleado como un agente acarreador en donde se discute su efecto protector de probióticos en una matriz, tal como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Usos de la pectina como material encapsulante o de acarreamiento y los principales hallazgos.

Materiales	Probiótico	Método de encapsulación	Principales hallazgos	Referencia
<b>Pectina, glucosa y cloruro de calcio.</b>	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Liofilización	Se presentó una pérdida del 7% de células por efecto del método de encapsulación. Demostró protección en condiciones de almacenamiento. La adición de azúcar tuvo un mayor efecto de protección que la pectina en condiciones ácidas (pH 3 a 2), sin embargo, la protección es nula en pH 1.5.	(Li et al., 2016)
<b>Pectina-inulina</b>	<i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Gelificación ionotrópica	El método empleado presentó una eficiencia de encapsulación del $96 \pm 4$ %. La pectina ayudó a conservar la viabilidad de los probióticos en condiciones de almacenamiento. En condiciones de digestión <i>in vitro</i> la pectina mejoró la protección, sin embargo, la concentración de células fue menor a 6 log de UFC/g. Hubo un mejor efecto protector de la inulina en condiciones de digestión.	(Tarifa et al., 2021)
<b>Pectinas de alto metoxilo de diferentes fuentes (limón, lima y naranja)</b>	<i>L. rhamnosus LGG</i> y <i>L. paracasei</i>	Ninguno Se emplea como portador	Las pectinas tienen el potencial de mejorar la supervivencia de las especies probióticas de <i>Lactobacillus</i> expuestas a las tensiones gastrointestinales, como el pH bajo y las enzimas digestivas en comparación con las células libres	(Larsen et al., 2018)
<b>Pectina comercial y pectina extraída de maracuyá y su pulpa</b>	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Ninguno Se emplea como portador	La pectina extraída de la fruta de maracuyá brindó un mejor efecto protector, sin embargo, la concentración de células fue menor a 6 log de UFC/g.	(Santos et al., 2017)

Con base en esta información es difícil asegurar que el uso de pectina como agente encapsulante garantice una buena protección y entrega de los probióticos, sin duda alguna, falta mayor investigación con respecto al efecto de protección que pueda brindar la pectina como único material de pared, así como el efecto de usar pectinas de alto o bajo metoxilo, que parece tener una influencia en los resultados tal como lo mencionan Larsen et al. en 2018.

Por otro lado, Dafe et al. (2017) describieron el uso de almidón resistente tipo 3 en conjunto con la pectina. Estos materiales permitieron obtener un sistema de encapsulamiento estable y resistente para proteger al probiótico *Lactobacillus plantarum* empleando el método de extrusión. La eficiencia de encapsulación fue del 94 % demostrando que el sistema provee la protección necesaria para resistir condiciones de digestión ácida y que puede ser un sistema con potencial de uso en la entrega de probióticos. Este sistema demostró además ser competente en presencia de sales biliares. En un principio se le puede atribuir a las propiedades de resistencia ácida al almidón; sin embargo, no se debe descartar que la pectina de manera natural es resistente a las condiciones ácido-enzimáticas del estómago y que incluso es capaz de inhibir la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa, por lo que la presencia de pectina sin duda mejoró la eficiencia de encapsulación del sistema (Bai et al., 2021; Dangi et al., 2020; Zhang et al., 2018).

## **INFOGEST 2.0**

INFOGEST (an international network of excellence on the fate of food in the gastrointestinal tract) es una red de consenso internacional que reúne a más de 440 científicos investigadores de 45 países (UE, Argentina, Australia, Canadá, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Japón, entre otros) quienes estandarizaron un método diseñado para llevarlo a cabo con equipo de laboratorio estándar y no se requiere de gran experiencia para implementarlo, su propósito es homologar los estudios de digestibilidad *in vitro*.

INFOGEST 2.0 es un método de simulación de la digestión gastrointestinal de alimentos estática *in vitro* que sustituye a la metodología publicada por Minekus et al. (2014), este nuevo protocolo presenta algunas modificaciones y mejoras.

Al ser un método de digestión estática hace que sea simple de usar, pero no adecuado para simular una cinética de digestión. En el método, las muestras de alimentos se someten a 3 fases de digestión: oral, gástrica e intestinal, los parámetros de electrolitos, enzimas, bilis, diluciones, pH y tiempo de digestión para cada fase se basaron en datos fisiológicos disponibles (Figura 3).

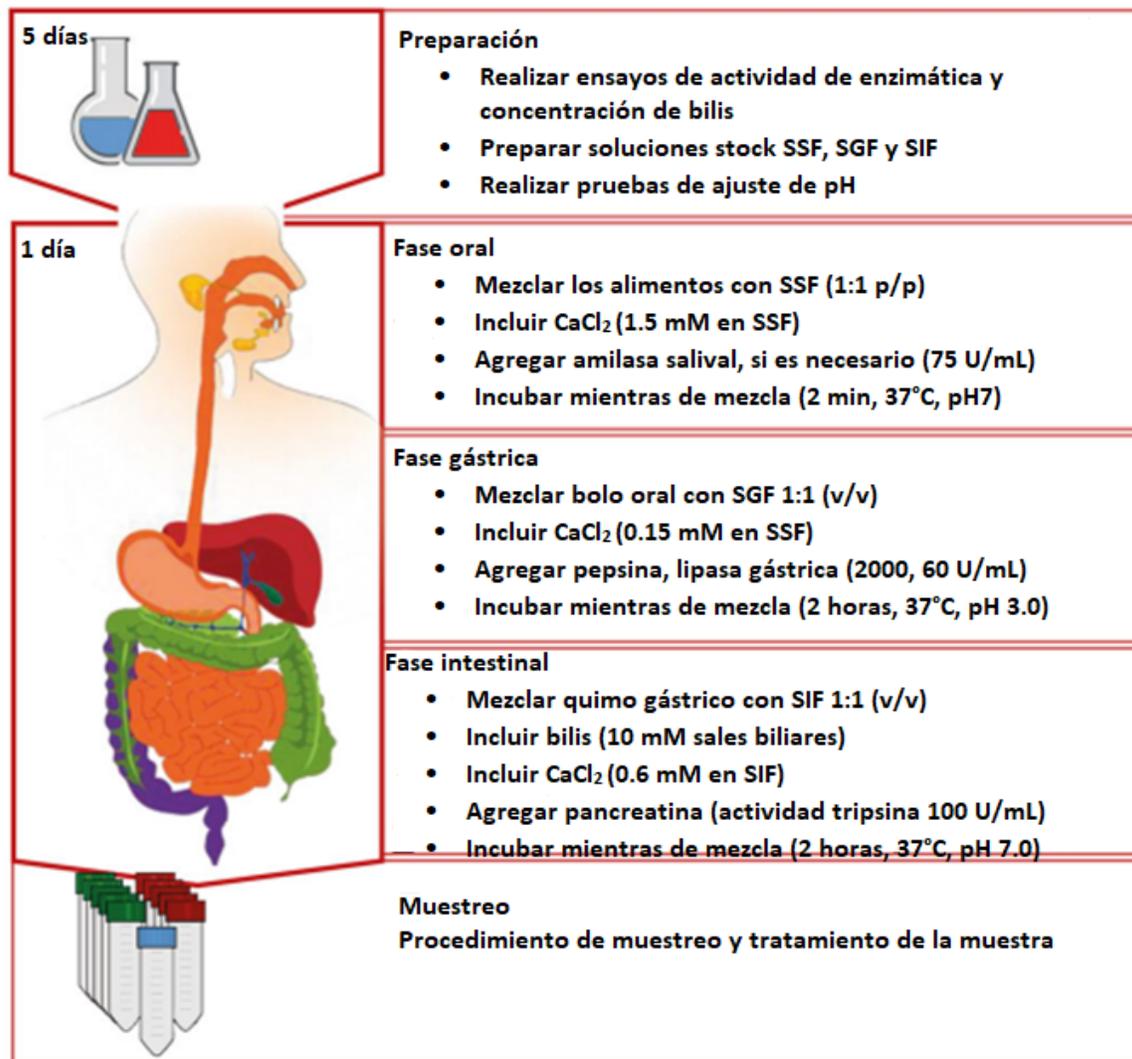


Figura 3. Diagrama de flujo del método de digestión *in vitro* INFOGEST 2.0. Indica el tiempo esperado (izquierda), las etapas y los números de paso correspondientes en el procedimiento (derecha). SGF (fluido gástrico simulado), SIF (fluido intestinal simulado) y SSF (fluido salival simulado).

Nota: Adaptado de “INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion” (p. 993), por Brodkorb et al., 2019, *Nature Protocols*, 4 (14).

Este método ha sido empleado por diversos investigadores para evaluar el efecto de un proceso de digestión gastrointestinal sobre una gran variedad de alimentos, mediante el análisis de ciertos productos de la digestión como: péptidos/aminoácidos, ácidos grasos,

azúcares simples; así mismo, ha sido empleado para evaluar la liberación de micronutrientes de la matriz alimentaria.

El protocolo fue publicado por Brodkorb et al. (2019) en donde se describe la metodología a seguir, la preparación de todas las soluciones así como algunas consideraciones.

Para el análisis de muestras con cultivos celulares, refieren que, durante la digestión gástrica *in vivo* de alimentos, las bacterias están expuestas a diferentes valores de pH llegando hasta pH 1 durante en el vaciamiento gástrico, es por ello por lo que un pH constante de 3.0 para la fase gástrica puede fallar para predecir la supervivencia de las células, por lo que recomiendan elegir un pH más bajo.

Otro aspecto para considerar es la recuperación de las células después del tratamiento donde mencionan que para los ensayos de este tipo de muestras se considere aplicar procedimientos de remoción como la centrifugación o filtración.

A pesar de que el protocolo INFOGEST se tiene al alcance desde el 2014 (Minekus et al., 2014), existe una gran variación en los métodos de digestión *in vitro* que se usan para evaluar la encapsulación de probióticos. En general se reportan modificaciones al método, en donde básicamente se emplean altas concentraciones de enzimas, sales biliares, tiempos (hasta 6 horas) y valores de pH muy bajos (de 1 o 1.5), con el propósito de probar la supervivencia de las células y efecto protector del encapsulado en condiciones muy adversas para el probiótico; en estos casos, un encapsulado puede llegar a probar una muy buena protección o se puede llegar a la conclusión de que encapsulado es deficiente; por otro lado, también se llegan a emplear bajas concentraciones de enzimas (o se omiten algunas) y sales biliares, en estos caso se pueden llegar a reportar altos valores supervivencia de las células encapsuladas relacionándolo a un encapsulado eficiente, cuando en realidad puede ser debido a las modificaciones realizadas al procedimiento y que no tienen un fundamento como el mismo protocolo INFOGEST.

En la Tabla 6 se detallan algunas investigaciones que han empleado métodos de digestión *in vitro* para evaluar una encapsulación de probióticos.

Tabla 6. Evaluación de encapsulados de probióticos mediante métodos de digestión *in vitro* por diferentes grupos de investigación.

Descripción del encapsulado	Condiciones de digestión <i>in vitro</i>	Hallazgos	Referencia
Nano encapsulado de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG, <i>Bifidobacterium bifidum</i> y <i>Bifidobacterium animalis</i> mediante un método de electrohilado de almidón de maíz y alginato de sodio	Líquido gástrico simulado: a partir de una solución de PBS (pH de 2.5-3), pepsina 3.0 (g/L).  Líquido intestinal simulado: 13.6 g/L de fosfato de hidrógeno dipotásico, 154 ml/L de NaOH 0.2 M, 2 g/L de sal biliar bovina y 10 g/L de tripsina (pH de 6.8). Se evaluaron en cada fase tiempos de 0, 30, 60, 120, 180 y 240 min.	Las células libres no fueron detectables después de la exposición en condiciones gástricas después de los 120 min, con el nano encapsulado se presentó una reducción de 1 log UFC/g.  En el líquido intestinal las células libres no fueron detectables después de los 30 min, con el nano encapsulado se tuvo una reducción de entre 2 y 3 log	(Atraki & Azizkhani, 2021)
Encapsulación de <i>Lactobacillus plantarum</i> mediante secado por aspersión (SD) y liofilización por aspersión (SFD)  Material de pared: fructo-oligosacárido (FOS), proteína de suero de leche (WP) y maltodextrina (MD) en diferentes formulaciones.	Se llevó a cabo la digestión <i>in vitro</i> con base a la metodología INFOGEST, evaluando el efecto en la viabilidad de los probióticos cada 30 minutos.	En el método de secado por aspersión en la fase oral no se tuvo pérdida, en la fase gástrica se tuvo una pérdida de 2 a 3 log, en la fase intestinal se tuvo una pérdida de 4 log.  El encapsulado por método de liofilización por aspersión tuvo una pérdida final de 2 logaritmos	(Yoha et al., 2020)
Encapsulación de <i>Lactobacillus salivarius</i> mediante un método de emulsión con múltiples capas de lípidos-proteína-pectina.	Líquido gástrico: 3 g/L de pepsina y 8,5 g/L de cloruro de sodio (pH 1.8).  Líquido intestinal: 10 g/L de pancreatina, 8,5 g/L de cloruro de sodio, 3 g/L de sal biliar y 10 g/L de tripsina (pH 6.5).	En la fase gástrica antes de las 2 horas no se tuvo una reducción importante de células (<1 log UFC/g), después de las 2 horas, a las 6 horas hubo una pérdida total de células probióticas.  En la fase intestinal la pérdida celular fue mayor, a las 2 horas	(Zhang et al., 2015)

	Se evaluó la pérdida celular durante 6 horas.	se tuvo una pérdida de hasta 3 logaritmos, después de este tiempo hubo una pérdida total de células	
Encapsulación de <i>Lactobacillus plantarum</i> mediante el método de extrusión y emulsión interna con inulina.	Jugos gástricos simulados (SGJ): caldo MRS y 3 g/L de pepsina (pH 3).  Jugo intestinal simulado (SIJ), 1 g/L de pancreatina y 4.5 g/L de sales biliares (pH 7)  Se evaluó la viabilidad en 0, 15 y 30 días de almacenamiento.	Ambos métodos mostraron una reducción al final de las dos fases de hasta 1.3 log UFC/g hasta los 30 días de almacenamiento.	(Valero-Cases & Frutos, 2015)
Encapsulación de <i>Lactobacillus casei</i> por el método de extrusión empleando varios polisacáridos: alginato, κ-carragenina, goma de garrofín, goma gelana, goma xantana y su combinación con almidón resistente, lactulosa y lactosucrosa.	La digestión <i>in vitro</i> se llevó a cabo de acuerdo al protocolo publicado por Minekus et al. (2014) con modificaciones menores, se sustituyó la α-amilasa salival humana por la α-amilasa del páncreas de cerdo.	La mayor supervivencia se observó en el encapsulado con base en alginato y almidón resistente que mostró una pérdida mínima (inferior a 1 log UFC/g) durante todo el período de digestión a diferencia de los demás sistemas y con respecto al control de células libres.	(Ta et al., 2021).

Los resultados de la evaluación de un sistema de encapsulación de probióticos en condiciones de digestión *in vitro* se relacionan con la eficiencia de encapsulación y la efectividad del material encapsulante (como agente protector) y su estabilidad (Calabuig-Jiménez et al., 2019), el uso de protocolo INFOGEST es ampliamente recomendado.

## Vigilancia tecnológica

Se conoce como vigilancia tecnológica a la forma sistemática, organizada, estructurada y permanente de obtener información sobre lo que ocurre al exterior e interior de una compañía para entender los cambios referentes a las investigaciones y los desarrollos tecnológicos de las empresas.

Para este proyecto se han identificado a las principales empresas que están desarrollando y comercializando este tipo de productos tecnológicos de acuerdo con el informe “Mercado global de Ingredientes Probióticos Análisis 2022-2029 Examinado En Un Nuevo Informe De Investigación De La Industria” en donde se menciona lo siguiente:

Principales actores en el mercado de ingredientes probióticos:

- Biena
- Ganeden
- LALLEMAND
- Nebraska Cultures
- UAS Laboratories
- BIO-CAT Microbials
- Deerland Enzymes
- PROBI
- Probiotic America
- Sabinsa Corporation
- Thera-Plantes

Segmentación del mercado:

- Probióticos en alimentos y bebidas
- Probióticos en suplementos dietéticos
- Probióticos en alimentos para animales (Lawson, 2022).

Además de las empresas que menciona el informe, existen empresas como AINIA, Kerry, Mars, DSM y Lallemand que tienen presencia en México.

Es interesante saber que la gran mayoría de estas empresas no se enfocan únicamente su aplicación en alimentos, sino que se encuentran en los 3 segmentos del mercado ya sea para su aplicación en alimentos para consumo humano, para animales, suplementos y algunos en cosméticos; de igual manera, se encuentran desarrollando este tipo de encapsulación para diferentes agentes activos como colorantes, vitaminas, saborizantes, entre otros. Además de ello, se ha encontrado que las empresas tienen alianzas con universidades para llevar a cabo la investigación y desarrollo de micro encapsulados y lo ofrecen como un servicio, es decir, los consumidores de este tipo de tecnologías, que son los fabricantes de productos con probióticos, tienen la oportunidad de solicitar un desarrollo que se ajuste a sus necesidades.

Por último, es importante mencionar que de todas estas empresas ninguna es mexicana y que la gran mayoría de estas empresas se encuentra en el extranjero, principalmente en la

Unión Europea, Canadá y Australia, esto sin duda se debe a que es en estos países en donde existe regulación y por lo tanto una necesidad por satisfacer para los fabricantes de productos con probióticos.

En la búsqueda de información acerca de las patentes que existen para la microencapsulación de probióticos, se puede mencionar lo siguiente:

- En la mayoría de los procesos de encapsulación, al igual que en los artículos científicos que se han revisado, los procesos que usan requieren de una adquisición de equipo industrial especializado.
- La mayoría de las patentes registradas tienen la participación del sector industrial, universidades y/o centros de investigación.
- Las patentes proporcionan una mejor idea de cómo es que la industria está llevando a cabo sus procesos de microencapsulación.
- Se puede identificar a los principales desarrolladores de micro encapsulados de probióticos y tener un acercamiento directo.

Sin duda alguna, la vigilancia tecnológica y científica deber ser un proceso permanentemente activo para tener un panorama completo del perfil competitivo de nuestro desarrollo.

De acuerdo con lo antes expuesto se pueden enfocar esfuerzos en generar una patente y apostar a la innovación del proceso y la eficiencia del producto a un bajo costo, tener un acercamiento con la industria que puedan ser clientes potenciales del producto para generar alianzas y/o colaboraciones es un paso crucial para el éxito de la propuesta tecnológica.

### **3. Justificación**

Existe una tendencia en las preferencias de los consumidores por alimentos con la presencia de probióticos principalmente por los beneficios que pueden obtener en la salud, por lo que el mercado de este tipo de alimentos se encuentra en crecimiento, sin embargo, para obtener los beneficios de un probiótico se requiere que lleguen en una cantidad adecuada. Actualmente en México no existe una regulación del cumplimiento en la entrega de probióticos en alimentos como se ha visto en otros países, por lo que la gran mayoría de los productos en el mercado no cumple con la cantidad mínima establecida por la FAO & OMS para obtener un beneficio en la salud. Además de la falta de regulación, se considera que hace falta el desarrollo de tecnologías de encapsulamiento de probióticos que sean eficientes, estables, compatibles con los alimentos y con un bajo costo, esto puede ser un

primer paso para acercar este tipo de tecnologías a los fabricantes de alimentos, generando un efecto dominó debido a la necesidad de obtener una ventaja competitiva dentro del mercado de alimentos con contenido de probióticos.

Para este proyecto se propone el uso de almidón resistente tipo 3 obtenido de almidón con alto contenido en amilosa (Hylon VII) de Ingredion™ en coparticipación con pectina de alto metoxilo de la casa comercial Rettenmaier mexicana de JRS Fibers for Life, como materiales de pared en la microencapsulación de *Lactocaseibacillus rhamnosus GG*, principalmente por sus características de resistencia en condiciones de digestión, compatibilidad con una gran variedad de alimentos y efecto prebiótico.

Se prefiere el uso almidón alto en amilosa (Hylon VII) debido a que presenta una mayor cantidad de almidón resistente (hasta un 39 %) comparado con un almidón normal o ceroso, además se ha reportado que cuando se tiene una mayor cantidad de amilosa se favorece la conformación de micropartículas, lo que puede beneficiar el proceso de microencapsulación. A partir del tratamiento de calor y humedad para retrogradar el almidón se espera obtener una mayor cantidad de cadenas de doble hélice conformadas moléculas de amilosa que puedan reorganizarse de una manera más efectiva al conformar una matriz continua y estable, se espera que estas estructuras reorganizadas tengan la capacidad de generar un efecto de envoltura y atrapamiento del probiótico. La reorganización del material de pared (almidón retrogradado) solo o junto con la pectina puede tener un efecto de resistencia y protección que durante el acarreamiento del probiótico le ayuden a resistir condiciones de almacenamiento (4°C) y de digestión *in vitro* bajo el método INFOGEST 2.0. El protocolo INFOGEST 2.0 se considera un método con el mayor sustento y que a pesar de no ser un sistema dinámico, las condiciones que establece son las más cercanas a los sistemas *in vivo* es por ello que los resultados de este estudio serán relevantes.

Además, se espera ligar la supervivencia del probiótico a la caracterización fisicoquímica de los materiales mediante reología, calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido (SEM).

La pectina de alto metoxilo con poder de gelificación lento fue elegida para este estudio debido a que presenta la propiedad de conformar geles estables, no termorreversibles y resistentes a condiciones ácidas. Al tener un poder de gelificación lento se espera que se pueda favorecer el atrapamiento celular, dando paso a la interacción con el almidón gelatinizado para la conformación de estructuras estables. En comparación con una pectina

de bajo metoxilo, este tipo de pectina no requiere iones de calcio para conformar un gel, esto representa una ventaja debido a que se reducen las variables a controlar, además de que la estabilidad de las mezclas no se verán comprometidas por un posible exceso de iones de calcio.

La manera en que se pretende realizar esta microencapsulación es mediante dos sistemas de encapsulación: gelificación conjunta (GC) y recubrimiento (REC).

En gelificación conjunta (GC) se espera encontrar una mezcla en la cual los dos componentes conformen un gel estable, este comportamiento se identificará mediante análisis fisicoquímico.

El recubrimiento (REC) consiste en hacer una encapsulación primero con almidón retrogradado, seguido de un secado y molienda y posterior recubrimiento con pectina, con el fin de obtener el beneficio de ambos compuestos por separado, en donde se espera que el atrapamiento ocurra con la presencia del almidón y posterior a esto, al tener un recubrimiento de pectina ayude a la protección en su paso a través de tracto gastrointestinal.

Estos sistemas serán estudiados en diferentes proporciones (ARet:PEC 0:1, 1:3, 1:1, 3:1 y 1:0) con el fin de encontrar las propiedades fisicoquímicas más apropiadas para lograr la estabilidad de este microencapsulado y mejorar así la eficiencia de encapsulación.

El estudio de estos sistemas puede ser una aportación importante para relacionar un comportamiento fisicoquímico esperado de las mezclas.

#### **4. Objetivo general**

Establecer un sistema de encapsulación basado en almidón resistente tipo 3 y pectina que permita mantener la viabilidad del microorganismo probiótico *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG.

#### **5. Objetivos específicos**

1. Describir y caracterizar la interacción entre almidón retrogradado y pectina en diferentes proporciones para formar el sistema de microencapsulación.
2. Estudiar y evaluar dos métodos de encapsulación para *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG

3. Evaluar la viabilidad de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG después de su encapsulación.
4. Evaluar el efecto de la digestión en condiciones ácidas sobre la viabilidad de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG encapsulados.

## 6. Hipótesis

El sistema almidón retrogradado y pectina encapsulará a *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG y le permitirá resistir condiciones de digestión *in vitro* y almacenamiento (4°C).

## 7. Materiales y métodos

### Materiales

La cepa probiótica *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG o *Lactibacillus rhamnosus* Strain GG ATCC 53103™ fue tomada de la colección de cepas del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA-IPN Querétaro).

Los reactivos empleados en el estudio son de grado analítico y se cuenta con certificado de calidad para cada uno de ellos.

El almidón comercial de maíz no modificado Hylon® VII (Ingredion™) se adquirió de National Starch and Chemical SA de CV (Toluca, México). De acuerdo con la ficha técnica obtenida del proveedor, el contenido de amilosa es del 70 % aproximadamente. Tiene una variedad de aplicaciones alimentarias por su capacidad gelificante y conformación de películas fuertes y resistentes.

La pectina fue una donación por parte de la empresa Rettenmaier mexicana de JRS Fibers for Life (Morelos, México). De acuerdo con la ficha técnica proporcionada, Pectin HS-S es un aditivo alimentario aprobado (Reg. (EU) No. 231/2012), es una pectina con alto contenido de metoxilo y de tiempo de fraguado lento. Los geles elaborados con esta pectina tienen una estructura firme y corta, y son transparentes, con una buena liberación de sabor. Estos geles no son reversibles al aplicar calor. Su aplicación se enfoca a la fabricación de mermeladas.

Para este estudio se prepararon soluciones y medios de cultivo que se describen a continuación.

MRS: dextrosa (20.0 g/L), sulfato magnésico heptahidratado (0.2 g/L), extracto de carne (8.0 g/L), citrato de triamonio (2.0 g/L), peptona de caseína (10.0 g/L), fosfato dipotásico (2.0 g/L), sulfato de manganeso (0.05 g/L), acetato de sodio trihidratado (5.0 g/L), extracto de levadura (4.0 g/L), Tween 80 (1 mL/L).

NaCl 0.85%: 0.85 g/ 100 mL de agua bidestilada

PBS: NaCl (8 g/L), KCl (0.2 g/L), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.44 g/L) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.24 g/L), con agua bidestilada.

Citrato de sodio 0.2 %: 0.2 g/100 mL de agua bidestilada

### **Concentración de células**

Para llevar a cabo la microencapsulación se realizó una siembra en 100 mL de medio MRS con ajuste de pH a  $6.20 \pm 0.20$  y se incubó a 37 °C durante 36 h (fase estacionaria de acuerdo con la cinética de crecimiento *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG Anexo 1), luego se llevó a centrifugación a 4000 rpm por 2 min en tubos cónicos de 15 mL, se realizaron 3 lavados con PBS bajo las mismas condiciones de centrifugación, finalmente la biomasa final se suspendió en 7 mL de NaCl 0.85%.

### **Preparación de sistemas gelificación conjunta (GC)**

Los sistemas en estudio GC se llevaron a cabo en diferentes proporciones, la metodología consiste en:

La pre-gelatinización de una solución de almidón al 5% (p/v) en parrilla en donde se mantiene en agitación a 60 °C por 15 min.

Gelatinización: se coloca la misma suspensión en autoclave en donde se alcanza una temperatura de 121 °C y una presión de 1.5 Pa por un periodo de 30 min, pasado este tiempo la solución se coloca en agitación constante para evitar la formación de grumos.

Se prepara una solución de pectina (PEC) al 3% (p/v) y se lleva a ebullición con agitación constante hasta que la suspensión sea homogénea. Cuando las dos suspensiones se encuentran a una temperatura de 80 °C se incorporan en agitación constante los materiales en la proporción de estudio (ya sea 1:3, 1:1 y 3:1 (v:v) de almidón retrogradado: pectina) hasta que la temperatura baje a 40 °C (retrogradación) como se muestra en la Figura 4.

### **Preparación de sistemas de recubrimiento (REC)**

Los sistemas en estudio REC se llevaron a cabo en diferentes proporciones, la metodología consiste en:

Pre-gelatinización de una solución de almidón al 5% (p/v) en parrilla en donde se mantiene en agitación a 60 °C por 15 min.

Gelatinización: se coloca la misma suspensión en autoclave en donde se alcanza una temperatura de 121 °C y una presión de 1.5 Pa por un periodo de 30 min. Pasado este tiempo la solución se coloca en agitación constante para evitar la formación de grumos.

Retrogradación: cuando la temperatura disminuye a 40 °C se lleva a secado en un deshidratador con aire a 40 °C.

Recubrimiento: Una vez seco el material se muelen y tamizan a un tamaño de partícula de 150 µm. El polvo de pesa y se agrega pectina en la proporción de estudio (ya sea 1:3, 1:1 y 3:1 v:v de almidón retrogradado: pectina) a una temperatura de 40 °C, se mantiene en agitación por 10 min y se lleva nuevamente a secado en deshidratador con aire a una temperatura de 40 °C hasta que el material está seco. Por último, se muele y tamiza nuevamente a un tamaño de partícula de 150 µm (Figura 4).

### **Microencapsulación**

La microencapsulación del probiótico en los dos sistemas de encapsulación se lleva a cabo con la adición de 6 mL del probiótico concentrado ( $\log_{10}$  12 UFC/mL), en 100 mL (volumen total) de los sistemas cuando se encuentran a 40 °C, para GC será de la mezcla almidón pectina y en REC será cuando el almidón se encuentre a 40 °C.

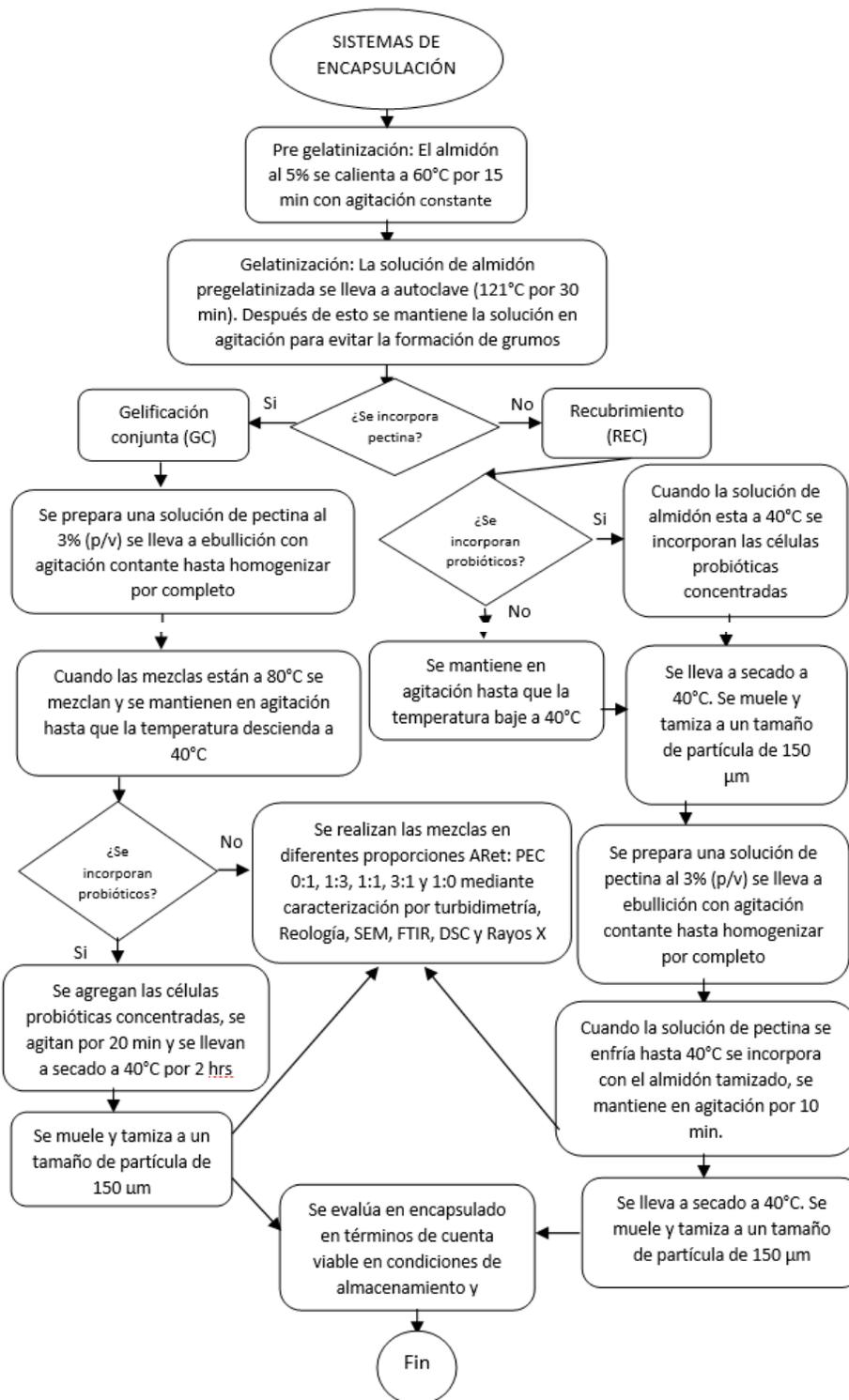


Figura 4. Diagrama de flujo de la preparación de los sistemas de encapsulamiento GC y REC y su caracterización.

## Caracterización de los sistemas de encapsulación

La caracterización de los sistemas GC y REC se llevó a cabo en diferentes proporciones su preparación se detalla en la Tabla 7. Los análisis FTIR, DSC, SEM y Rayos X se realizaron en el material seco resguardado en un desecador hasta su análisis, mientras que los análisis de turbidimetría y reología se llevaron a cabo en los sistemas antes del proceso de secado.

Tabla 7. Preparación de los sistemas GC y REC en diferentes proporciones, cantidades y componentes.

	<b>0:1</b>	<b>1:3</b>	<b>1:1</b>	<b>3:1</b>	<b>1:0</b>
<b>Proporción en los sistemas GC</b>	<b>ARet:PEC</b>	<b>ARet:PEC</b>	<b>ARet:PEC</b>	<b>ARet:PEC</b>	<b>ARet:PEC</b>
Almidón retrogradado (ARet) mL	0	25	50	75	100
Pectina (PEC) mL	100	75	50	25	0
	<b>0:1</b>	<b>1:3</b>	<b>1:1</b>	<b>3:1</b>	<b>1:0</b>
<b>Proporción en los sistemas REC</b>	<b>ARet:PEC</b>	<b>ARet:PEC</b>	<b>ARet:PEC</b>	<b>ARet:PEC</b>	<b>ARet:PEC</b>
Almidón retrogradado (ARet) g	0	1.25	2.5	3.75	5
Pectina (PEC) mL	100	75	50	25	0

## Turbidimetría

La turbidez se midió en los sistemas GC y REC antes del proceso de secado (fase líquida) en donde se colocaron las preparaciones en celdas de plástico, empleando como blanco agua bidestilada y a una densidad óptica (DO) de 600 nm. La prueba se hizo por triplicado realizando mediciones con respecto al tiempo, para los sistemas GC cada 30 min y para REC cada 2 min durante los primeros 15 min y después cada 15 min, hasta los 140 min para ambos sistemas.

## Reología

Las propiedades reológicas de los sistemas se midieron en el reómetro Anton Paar (Physica MCR 101) utilizando una geometría platos paralelos de 25 mm con una distancia entre placas de 1 mm.

La preparación de la muestra fue la misma que se plantea para los sistemas, pero no se llevaron a secado, en cambio las muestras se colocaron en placas Petri y se dejaron

reposando a temperatura ambiente hasta las 40 horas para permitir la reorganización de la amilosa, conformar la matriz y promover la interacción con la pectina. En este tiempo se observó una textura similar a un gel y las muestras se llevaron a medición.

Se realizaron los barridos de frecuencia a un intervalo de 0.1 a 10 Hz con un porcentaje de deformación del 2.5 %. El módulo de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo de pérdida ( $G''$ ) se calcularon a partir de la prueba.

Para las pruebas de recuperación por cedencia (Creep-recovery) se aplicó un esfuerzo constante de 0.4 Pa durante 50 segundos y se midió la recuperación por 50 segundos más.

### **Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)**

Se llevaron a cabo los análisis de las muestras en polvo de los sistemas en las proporciones ya descritas. Los espectros FTIR-ATR de las muestras retrogradadas se registraron utilizando un espectrofotómetro (Spectrum GX, PerkinElmer Inc., EE. UU.) con un accesorio ATR en el rango de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  a una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . El análisis se llevó a cabo después de los 30 días de almacenamiento.

### **Difracción de rayos X**

La estructura cristalina se determinó en las muestras retrogradadas secas en un tiempo de almacenamiento de 60 días. Para su análisis se empleó un difractómetro de rayos X (D8 ADVANCE, Bruker, EE. UU.). Las muestras retrogradadas se escanearon en el rango angular de  $2\theta$ . En todas las pruebas se utilizó un voltaje de aceleración de 20 kV, una corriente de 20 mA, un paso angular de  $0,01^\circ$  y 1 s de paso a paso.

El porcentaje de material cristalino en muestras retrogradadas, conocido como cristalinidad relativa (RC), se calculó de acuerdo con lo descrito por Rabek (1980) utilizando la Ecuación 1.

$$RC (\%) = \left( \frac{A_c}{A_c + A_a} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

En donde  $A_c$  es el área cristalina y  $A_a$  es el área amorfa en los difractogramas de rayos X.

### **Calorimetría diferencia de barrido (DSC)**

El análisis se llevó a cabo en las muestras secas con 30 días de almacenamiento utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC 1 STARE System, Mettler-Toledo Inc., Suiza). Las muestras retrogradadas (6 mg) se colocaron en un crisol de aluminio, se sellaron y se les

realizó un barrido de 25 a 220 °C, empleando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en el calorímetro.

Los parámetros térmicos: temperatura de inicio (To), pico (Tp), final (Te) y el cambio de entalpía (ΔH) se obtuvieron utilizando el software STARe versión 9.30. El análisis se realizó por triplicado.

### **Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Se obtuvieron micrografías electrónicas de barrido de gránulos de almidón retrogradado seco con 30 días de almacenamiento empleando el microscopio Phenom-World (Eindhoven, Países Bajos) operado a un voltaje de aceleración de 5 kV. Las muestras se adhirieron a una cinta adhesiva de carbón de doble cara y las imágenes se obtuvieron con un aumento de 500 ×, 2500x, 3000x, 4000x y 5000x.

### **Viabilidad en condiciones de almacenamiento**

Para determinar la viabilidad de las células después de su encapsulación y en condiciones de almacenamiento (4 °C), se realizó una liberación de probióticos en una la solución de citrato de sodio al 0.2% a temperatura ambiente, en agitación constante durante 20 min, después se realizaron diluciones seriadas empleando una solución de NaCl 0.85%, se realizó extensión en placa de 100 μL de muestra en placas en agar MRS (pH 6.2±0.2) que se incubaron a 37 °C durante 48 h, cada dilución se llevó a placa por triplicado.

A las 48 horas se hizo el conteo de las UFC (unidades formadoras de colonias) y se obtuvo el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) a partir de Ecuación 2.

$$\%EE = \frac{\log_{10} N}{\log_{10} N_0} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde N corresponde al número de UFC/g contabilizadas después de la encapsulación y N<sub>0</sub> corresponde al número inicial de UFC/g encapsuladas.

Los tiempos de almacenamiento evaluados fueron 0, 30, 60 y 90 días de almacenamiento en refrigeración (4 °C), en donde se contabilizaron las UFC/g y se expresan los resultados en términos de log<sub>10</sub> UFC/g, los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

### **Viabilidad en condiciones de digestión *in vitro* (INFOGEST 2.0)**

De acuerdo con el protocolo INFOGEST 2.0 se establecieron las siguientes condiciones para evaluar los sistemas de micro encapsulación establecidos para GC y REC (Tabla 8).

Tabla 8. Implementación del protocolo INFOGEST 2.0 para los sistemas de encapsulación GC y REC.

	SSF (Fase oral)	SGF (Fase gastrica)		SIF (Fase intestinal)	
<b>Digesta</b>	1 g	2 mL		4 mL	
<b>Electrolitos 1.25X (mL)</b>	0.8	1.6		1.6	
<b>Ca<sub>2</sub>Cl (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> (0.3 mM) (mL)</b>	0.005	0.001		0.08	
<b>Enzimas</b>	α-amilasa	Pepsina	Lipasa	Pancreatina	Sales biliares
<b>Actividad (U/ mL)</b>	75 U/mL	2000 U/mL	60 U/mL	1000 U/mL	0.6% (p/v)
<b>mL</b>	0.151	0.171	0.162	0.121	0.8
<b>H<sub>2</sub>O (mL)</b>	-	0.66		1.3	
<b>HCl (3 M)</b>	-	2 gotas		-	
<b>NaOH (1M)</b>	2 gotas	-		3 gotas	
<b>Volumen final (mL)</b>	2	4		8	
<b>pH final</b>	7.24	2.76		7.26	
<b>Tiempo</b>	2 min	2 h		2 h	

Para la implementación del protocolo se usaron las enzimas que se describen a continuación. Las actividades enzimáticas se tomaron de los certificados de calidad del proveedor (Sigma Aldrich) y se sustituyó el uso de α-amilasa salival y lipasa gástrica por enzimas de páncreas porcino debido a la dificultad en su adquisición:

α – amilasa de páncreas porcino lote SLCM1439 con una actividad enzimática de 11 U/mg, pepsina de mucosa gástrica porcina lote SLCC6249 con una actividad enzimática de 701 U/mg, pancreatina de páncreas porcino lote SLCD114 con una actividad enzimática de 66 U/mg, lipasa pancreática porcina Sigma Aldrich lote SLBC0073V con una actividad enzimática usando triacetin de 59 U/mg.

La preparación de la solución de electrolitos 1.5x se llevó a cabo de acuerdo a lo que indica el protocolo (Brodkorb et al., 2019).

Para cuantificar el número de células viables, el producto de la digestión *in vitro* se centrifugó a 4000 rpm por 4 min realizando 3 lavados con PBS, el producto se recuperó en un volumen final de 10 mL con NaCl 0.85 %, después se realizaron diluciones seriadas en NaCl 0.85 %, se hizo por extensión en placa (medio MRS) de 100 µL de muestra, las placas

(MRS pH  $6.2 \pm 0.2$ ) se incubaron a 37 °C durante 48 h, cada dilución se llevó a placa por triplicado.

Cada ensayo se llevó por duplicado y se evaluaron dos tiempos de almacenamiento (4°C) 0 y 30 días. Los resultados se expresan en términos de  $\log_{10}$  UFC/g, los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

### **Almidón resistente**

El contenido de almidón resistente (RS) de las muestras retrógradadas se determinó de acuerdo con el método 32–40.01 Resistant Starch in Starch Samples and Plant Materials (AACC, 1983). Se utilizó un kit de Megazyme (K-RSTAR 08/18). Las muestras se analizaron por duplicado en dos tiempos de almacenamiento 0 y 30 días sólo para la proporción de GC y REC llevada a la encapsulación de probióticos (las muestras analizadas no contenían el probiótico).

### **Determinación de humedad**

Se llevaron los sistemas GC y REC a una temperatura de 105 °C por 24 horas en estufa, de acuerdo al método que establece la AOAC (1999), el % de humedad se determinó con base a la ecuación 3, las muestras se analizaron por duplicado.

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{M-m}{M} * 100 \text{ Ecuación 3}$$

En donde

M= peso inicial en gramos de la muestra

m= peso en gramos de la muestra seca

### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5 % y las diferencias entre las medias se determinaron mediante la prueba de Tukey, utilizando el software Minitab.

## **8. Resultados y discusión**

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de los dos sistemas de encapsulación: gelificación conjunta (GC) y recubrimiento (REC), en diferentes proporciones.

Tabla 9. Representaciones durante la caracterización de los sistemas GC y REC con respecto a las proporciones de almidón retrogradado y pectina (ARet:PEC)

Proporción en los sistemas	0:1 ARet:PEC	1:3 ARet:PEC	1:1 ARet:PEC	3:1 ARet:PEC	1:0 ARet:PEC
Representación gráfica por colores	<p>PEC</p> 	<p>1:3</p> 	<p>1:1</p> 	<p>3:1</p> 	<p>ARet</p> 
Color representativo en gráficos					

### Turbidimetría

Una manera simple para determinar la compatibilidad de dos componentes es que estos no se separen. Para los sistemas de gelificación conjunta (GC) y recubrimiento (REC) se analizaron las mezclas 0:1, 1:3, 1:1, 3:1 y 1:0 ARet:PEC.

Los resultados de la Figura 5 indican que la pectina es un compuesto que ópticamente se mantiene estable debido a la transparencia de sus soluciones. Esta propiedad pudo observarse cuando se midió la absorbancia con respecto al tiempo, en donde hasta los 140 minutos no se observó algún cambio en los valores de absorbancia, a diferencia del almidón retrogradado (ARet) en donde se pudo cuantificar un cambio a partir de los 20 minutos. Este cambio consiste en un ligero incremento en el valor de absorbancia para después mantenerse estable. Este cambio en la absorbancia puede estar asociado a la reorganización de las moléculas del almidón, ya que cuando el sistema se reorganiza tiende a formar una estructura más densa que genera un cambio en la turbidez, pasando de un blanco transparente a un blanco opaco. Para la encapsulación de los probióticos no representa un factor adverso ya que se espera que durante la reorganización del almidón se genere el efecto de atrapamiento.

En las mezclas 1:3, 1:1 y 3:1 ARet:PEC del sistema de gelificación conjunta (GC) los valores de absorbancia se mantuvieron constantes desde el tiempo 0 hasta los 140 minutos, a diferencia del almidón, no se presenta ningún cambio importante en los valores de absorbancia, lo que indica que la pectina aporta un efecto estabilizante al almidón retrogradado y que no existe un efecto de separación de fases al menos dentro de los 140

minutos. Esto también es un indicativo de que tanto la pectina como el almidón se encuentran interactuando entre sí. En este sentido, el proceso de secado del sistema de encapsulación lleva un tiempo aproximado de 120 minutos, por lo que se tiene la certeza de que el sistema de gelificación conjunta (GC) se mantendrá estable en este periodo de tiempo para cualquiera de las mezclas ARet:PEC (Figura 5).

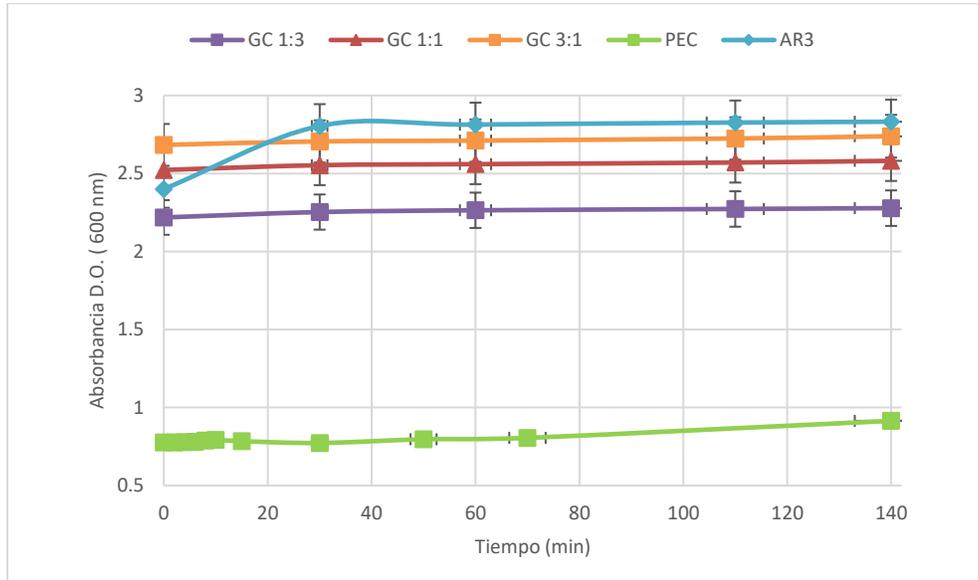


Figura 5. Absorbancia vs tiempo del sistema de encapsulación gelificación conjunta (GC) con las diferentes mezclas evaluadas.

En el sistema de recubrimiento (REC) (Figura 6), a diferencia de las mezclas del sistema GC, los valores de absorbancia contra tiempo indican que, si hay separación de fases debido a la naturaleza de las muestras, pues se trata de un sistema que tiene una fase sólida que corresponde al almidón retrogradado en polvo inmerso en una solución de pectina.

Esta diferencia entre los sistemas GC y REC permitirá analizar la información que se obtenga de la caracterización.

Las mezclas 1:3 y 1:1 (ARet:PEC) presentan una disminución en los valores de absorbancia desde el tiempo 0 hasta los 60 minutos (Figura 6) indicando una separación de fases o asentamiento del almidón retrogradado (sólido), mientras que para la mezcla 3:1 (ARet:PEC) se observa que las absorbancias se mantienen desde el tiempo cero; sin embargo, contrario a los sistemas GC, esta permanencia de los valores de absorbancia no está ligada a una estabilidad del sistema, más bien describe una saturación en la mezcla por el exceso de almidón retrogradado y, por lo tanto, no existe una separación de fases, en

este sentido sería cuestionable la capacidad que pueda tener la pectina para generar el efecto de recubrimiento para esta mezcla.

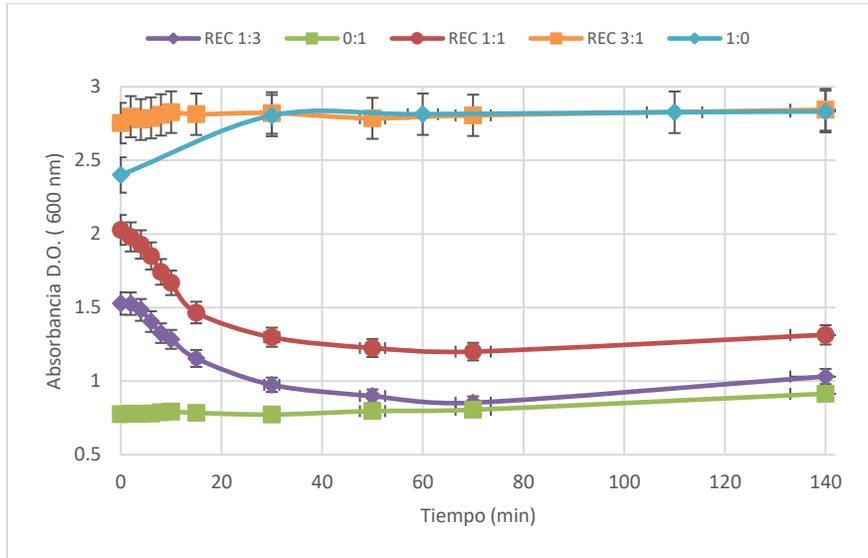


Figura 6. Absorbancia vs tiempo del sistema de encapsulación de recubrimiento (REC) con las diferentes mezclas evaluadas.

Las mezclas obtenidas para cada sistema se muestran en la Figura 7. Se puede observar que después de los 140 minutos los sistemas GC no presentan separación de fases. Para mezclas 1:3 y 1:1 de los sistemas REC si se muestra una separación o asentamiento del almidón, lo cual no se observa para la mezcla 3:1.

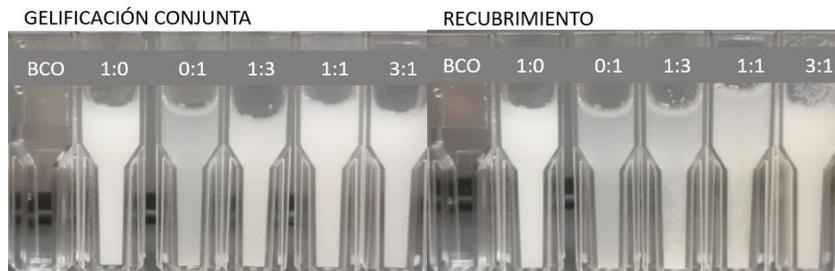
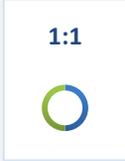


Figura 7. Sistemas de encapsulación GC y REC en las diferentes proporciones a los 140 minutos

En el proceso de secado las mezclas de GC no se separaron. En los sistemas REC 1:3 y 1:1 la pectina envolvió al almidón retrogradado; sin embargo, en la mezcla 3:1 se observó una sedimentación del almidón retrogradado (Tabla 10).

Tabla 10. Imágenes de los sistemas GC y REC antes y después del secado.

Proporción en los sistemas	1:3 ARet:PEC	1:1 ARet:PEC	3:1 ARet:PEC
Representación gráfica por colores			
Sistemas antes y después de secado GC			
Sistemas antes y después de secado REC			

## Reología

A partir de la preparación de los geles se observó que la pectina tiende a fluir más en comparación con el almidón, mientras que el almidón retrogradado es capaz de conformar con mayor facilidad un gel.

Algunos autores han reportado el uso de almidón como un buen sistema de encapsulación de probióticos (Homayouni et al., 2008), sin embargo, la combinación con pectina ha demostrado que mejora la conformación de la red de hidrogel en los sistemas de encapsulamiento.

Qi et al. (2020) emplearon pectina para conformar un gel fuerte con alginato, con el propósito de generar un sistema de encapsulación de doble red, que consiste en aprovechar las propiedades de un polímero primario y un secundario para mejorar la conformación del gel, en ese estudio probaron diferentes proporciones y evaluaron las propiedades reológicas; por otro lado Hu et al. (2021) reportaron que la pectina es capaz mejorar una red de hidrogel al llenar los espacios dentro de una matriz encapsulante.

En la Tabla 11 se puede ver la conformación de los geles para los sistemas de encapsulación GC y REC en las proporciones de estudio.

La conformación de geles de los sistemas GC a las 40 horas mostró un efecto en la reorganización del almidón por la presencia de pectina. Para la mezcla 1:3 (ARet:PEC) se observó un gel menos conformado, con característica predominante a fluir, mientras que en la mezcla 1:1 (ARet:PEC) se conformó un gel suave y continuo, en la proporción 3:1 (ARet:PEC) se logró un gel denso y débil.

Para el sistema de recubrimiento REC, es difícil asegurar que se obtuvo una conformación de gel, ya que la pectina de alto metoxilo es capaz de conformar geles en presencia de sólidos solubles. En este caso, el almidón no es un sólido soluble, por lo que no se pudo ver una conformación de un gel verdadero.

Tabla 11. Geles conformados a las 40 horas de reposo a temperatura ambiente, en las diferentes proporciones estudiadas (ARet:PEC)

Proporción en los sistemas	0:1 ARet:PEC	1:3 ARet:PEC	1:1 ARet:PEC	3:1 ARet:PEC	1:0 ARet:PEC
Representación gráfica por colores	PEC 	1:3 	1:1 	3:1 	ARet 
Imagen correspondiente a los geles del sistema REC (a las 40 h)					
Imagen correspondiente a los geles del sistema GC (a las 40 h)					

Estas características fueron mejor descritas por las pruebas de barrido de frecuencia, y la prueba de cedencia y recuperación.

## Barrido de frecuencia

La caracterización reológica de los sistemas de encapsulación REC y GC (con 40 horas de reposo a temperatura ambiente) se describen a continuación.

De acuerdo con el módulo de almacenamiento,  $G'$  (Figura 8) de los sistemas REC se observa el comportamiento de un fluido viscoelástico dependiente de la frecuencia por efecto de la pectina. Los valores de  $G'$  están influenciados por la cantidad de pectina, en cambio para el módulo de pérdida,  $G''$ , (Figura 9) se observa un incremento en los valores de  $G''$  a medida que se incrementa la frecuencia, esto va ligado al comportamiento que tiene la pectina a conformar un sistema fluido que no es capaz de permanecer, además de que se observa nuevamente que los sistemas (en sus diferentes proporciones) presentan el comportamiento de la pectina y no se ven alterados por la presencia del almidón. De acuerdo con estos resultados, la pectina no es capaz de conformar una estructura propia de un gel que permita el atrapamiento y encapsulación del probiótico; sin embargo, para este sistema el propósito de la pectina es actuar como un agente de recubrimiento.

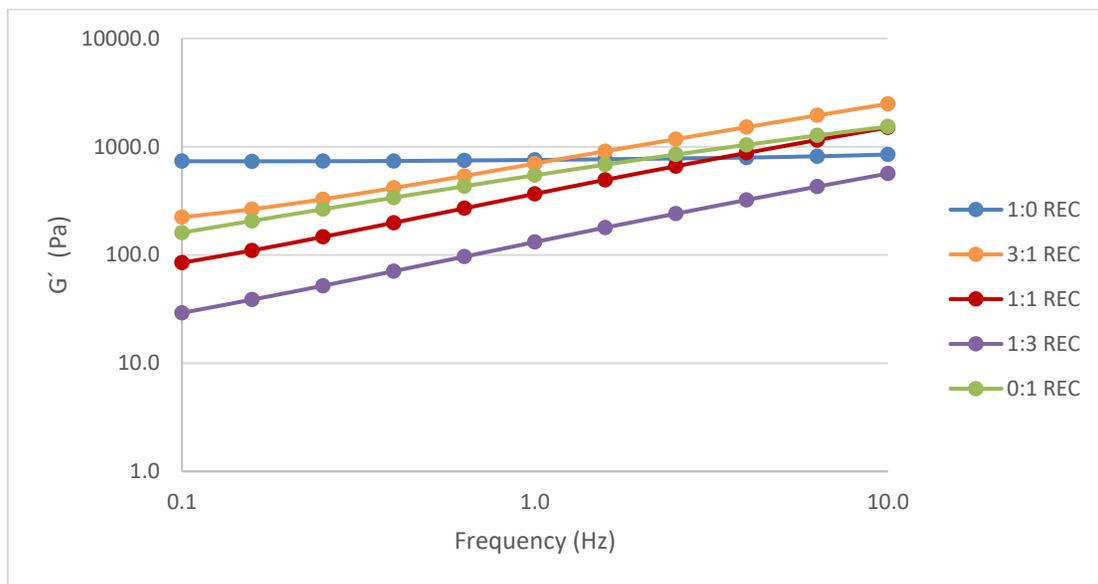


Figura 8. Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) del sistema REC en sus diferentes proporciones ARet:PEC

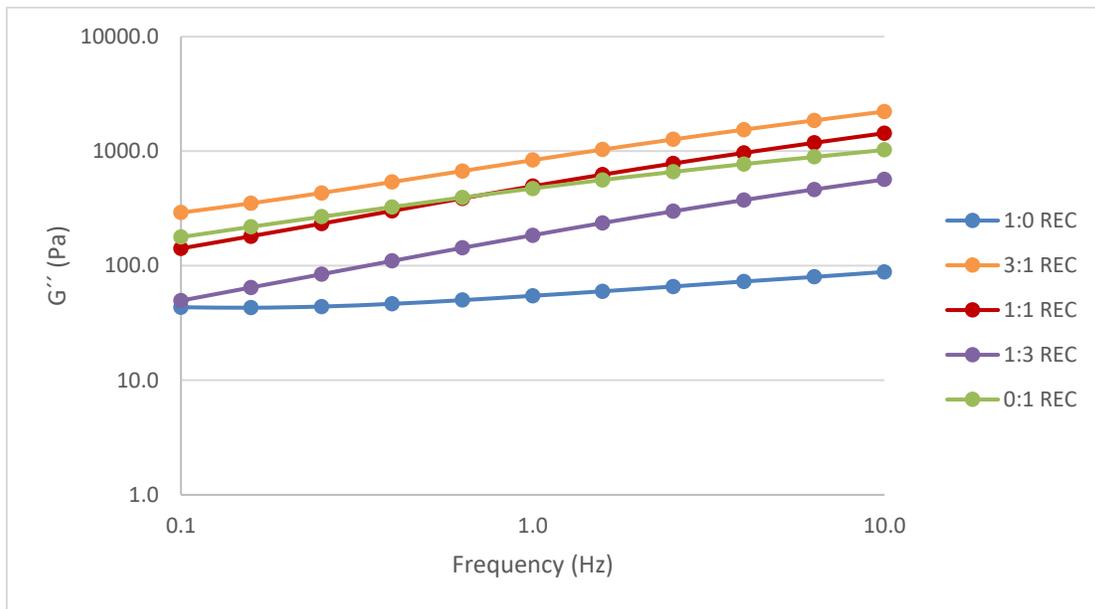


Figura 9. Módulo de pérdida ( $G''$ ) de los sistemas REC en sus diferentes proporciones ARet:PEC

Para el sistema (REC) es relevante el comportamiento que tiene el almidón retrogradado, pues es quien se encarga de generar la encapsulación de los probióticos. En la Figura 10 se puede observar que el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) es hasta 10 veces mayor que el de pérdida indicando que se trata de un gel que es capaz de permanecer cuando se incrementa la frecuencia lo que demuestra que hay conformación y estabilidad en el gel.

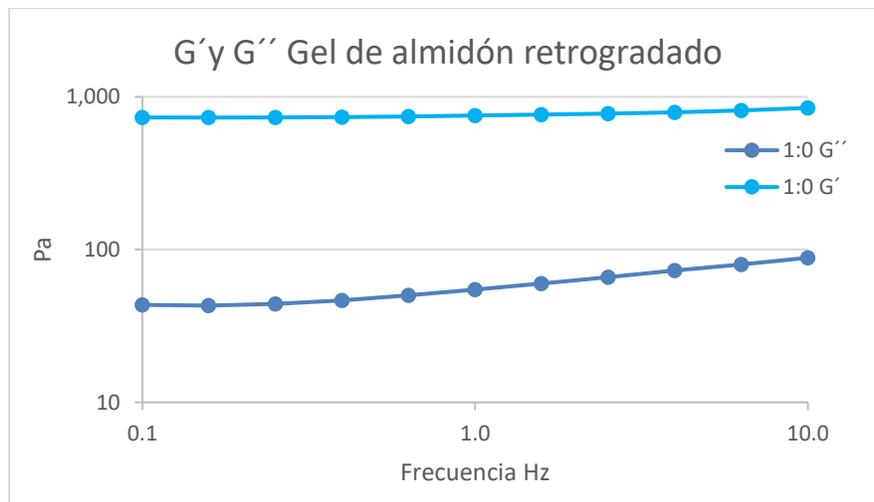


Figura 10. Módulos de pérdida y almacenamiento del gel conformado por almidón retrogradado a las 40 horas.

Para los sistemas GC, en el módulo de almacenamiento  $G'$  (Figura 11) y de pérdida  $G''$  (Figura 12) se puede observar que se trata de hidrogeles con un comportamiento viscoelástico, participando tanto el componente elástico como el viscoso. De acuerdo con Yang et al. (2023), este comportamiento es característico de los materiales que son capaces de conformar red de hidrogel pues se considera que son materiales relativamente suaves y flexibles.

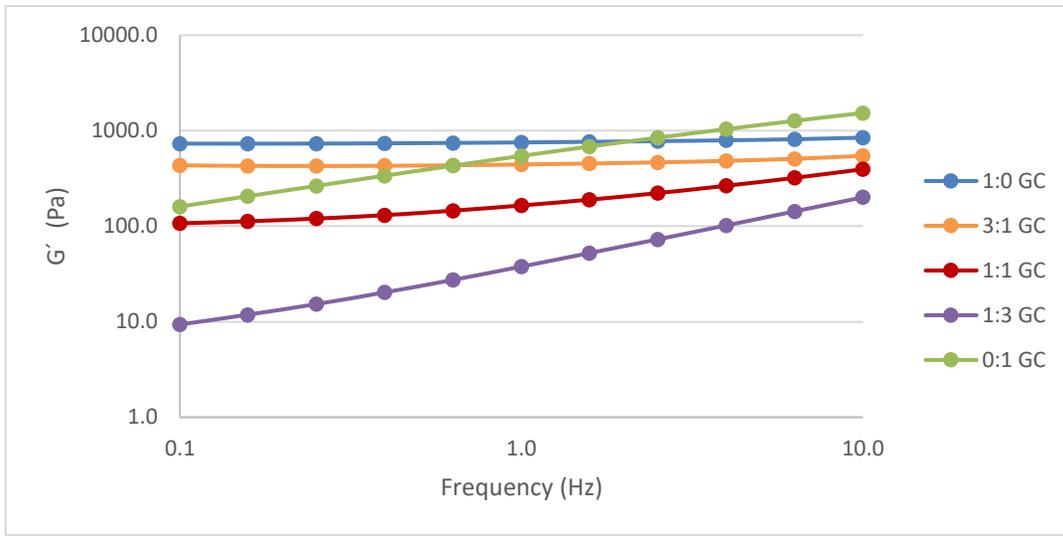


Figura 11. Barrido de frecuencia y módulo de almacenamiento de las muestras del sistema GC.

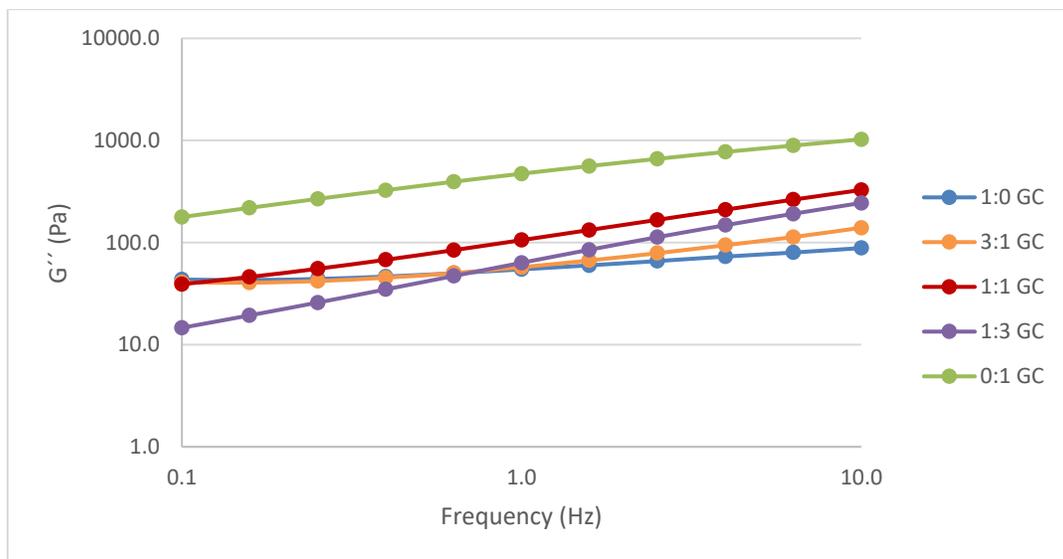


Figura 12. Barrido de frecuencia y módulo de pérdida de las muestras del sistema GC.

También observa que  $G'$  (componente elástico o módulo de almacenamiento) y  $G''$  (comportamiento viscoso o módulo de pérdida) exhibieron ligeras variaciones ante el incremento de frecuencia. Los valores del módulo de almacenamiento son ligeramente más altos que el módulo de pérdida, el carácter elástico de los hidrogeles incrementó por la presencia de la pectina (Yuliarti et al., 2021), y esto se puede interpretar como un fortalecimiento de la red de hidrogel del almidón.

En ambos módulos  $G'$  y  $G''$  se puede observar además que la mezcla 1:3 (ARet:PEC) presenta un comportamiento muy parecido a la pectina y que la proporción 3:1 (ARet:PEC) es muy similar al comportamiento del almidón; sin embargo, la mezcla 1:1 tiene un comportamiento independiente (no tan asociado al ARet o PEC). Yuliarti et al. (2021) mencionan que las propiedades reológicas se pueden controlar manipulando la concentración de los biopolímeros dentro de un sistema hidrogel y es interesante ver como en este estudio la proporción de pectina define las cualidades de los hidrogeles y como se puede extrapolar al sistema de encapsulación.

Los resultados indican que las dispersiones coloidales se encuentran en un estado sol-gel (Figura 13) y es evidente que la cantidad de pectina determina el grado de acomodo de la red hidrocoloide de los geles.

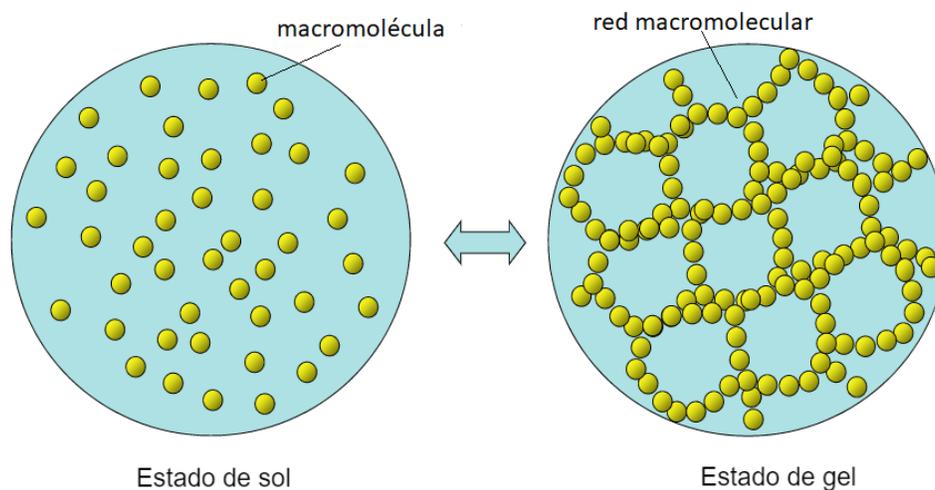


Figura 13. Imagen alusiva al estado sol-gel de una dispersión coloidal, en donde en el estado sol el agua actúa como fase dispersante y en el estado gel el agua es la fase dispersa en el interior de una red macromolecular.

Nota: Adaptado de “disolución en estado sol-gel” (p. 9), (Sánchez-Guillén (2016), IES Pando - Oviedo Departamento de Biología y Geología 1 <https://docplayer.es/22592525-J-I-sanchez-guillen-ies-pando-oviedo-departamento-de-biologia-y-geologia-1.html>

En este contexto, se busca encontrar un sistema de encapsulación en estado gel que permita la conformación de los materiales y el empaquetamiento de las dobles hélices del almidón retrogradado junto con la pectina, que van a generar la red de atrapamiento de los probióticos.

### Cedencia y recuperación

Esta prueba tiene como principio medir la deformación que presentan los materiales a una fuerza determinada con respecto al tiempo. Para estos materiales se aplicó una fuerza de 0.4 Pa y los resultados se muestran a continuación en la Figura 14.

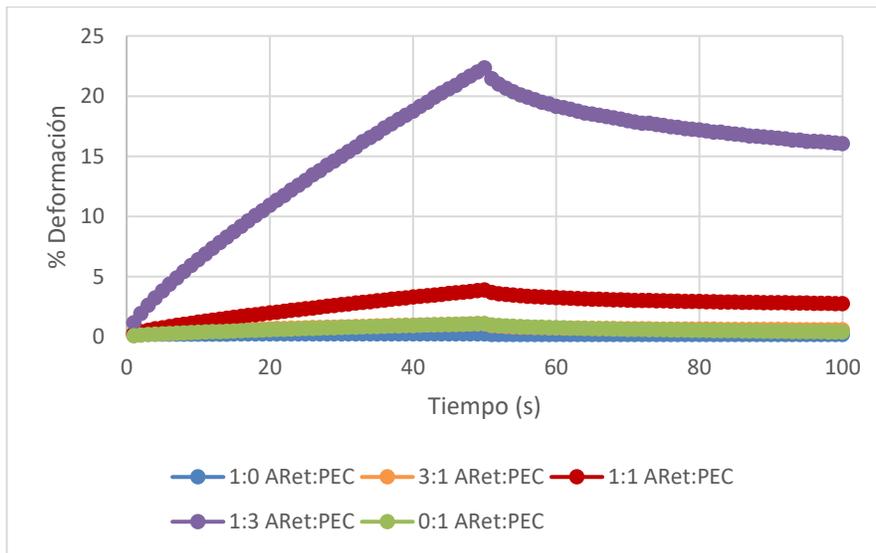


Figura 14. Prueba de cedencia y recuperación del sistema de encapsulación por recubrimiento, % de deformación con respecto al tiempo.

Para los sistemas de recubrimiento (REC) se corrobora que no hay una conformación de un gel verdadero, únicamente el almidón mostró la conformación de una matriz compacta, característica de un almidón retrogradado (Yuliarti et al., 2021). Este comportamiento del almidón se modifica con la presencia de pectina. Zhang et al. (2020) reportaron una tendencia similar y demostraron que la pectina tenía un efecto de modificación estructural en el almidón inhibiendo la retrogradación y la lixiviación de la amilosa. Aunque el estudio se realizó en condiciones de calor húmedo con almidón nativo normal, también encontraron que la pectina conformaba una pasta estable. Los autores atribuyen los

resultados a una interacción por puentes hidrógeno entre las cadenas de amilosa o amilopectina con las de pectina.

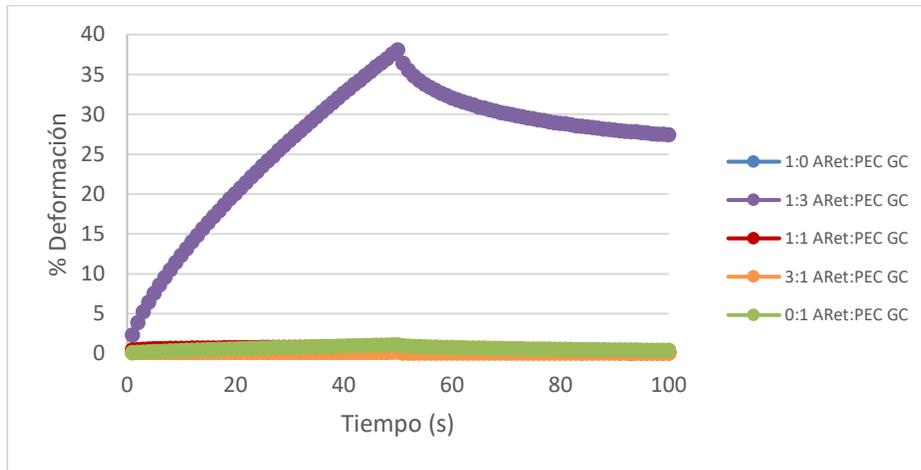


Figura 15. Prueba de cedencia y recuperación del sistema de gelificación conjunta (GC), %de deformación con respecto al tiempo

La Figura 15 muestra que el porcentaje de deformación del hidrogel en la mezcla 1:3 superó el porcentaje de deformación de los demás. No logró conformar un gel verdadero y los valores de deformación superaron incluso los valores de la pectina, por lo que la mezcla 1:3 no conforma una red de hidrogel fuerte que sea apropiada para la encapsulación de los probióticos.

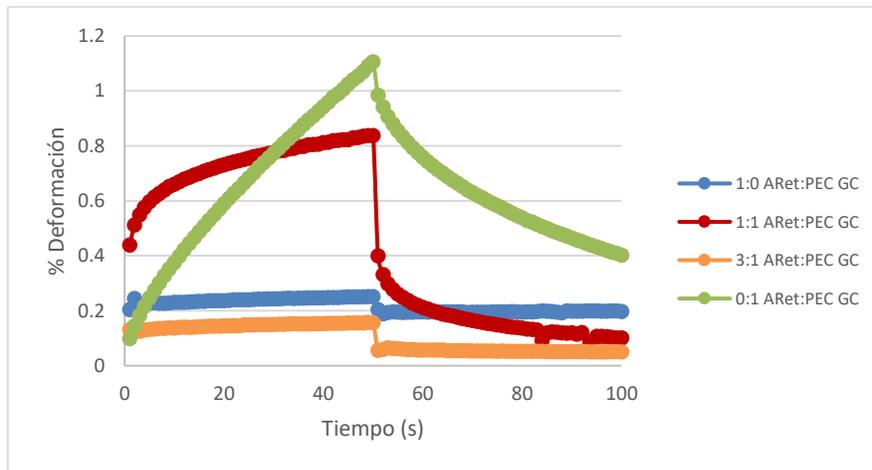


Figura 16. Prueba de cedencia y recuperación de los sistemas de encapsulación GC sin la proporción 1:3 ARet:PEC.

Debido a esta diferencia en los valores de porcentaje de deformación de los sistemas, se presenta la Figura 16 sin la proporción 1:3 (ARet:PEC), en donde se observa que la pectina tampoco tiene la conformación de un hidrogel. El almidón retrogradado (ARet), a pesar de conformar una matriz estable como se muestra en los barridos de frecuencia, al menos a las 40 horas y bajo las condiciones de esta prueba, no presentó una conformación de hidrogel ya que los resultados describen una estructura más cerrada, que no permite una recuperación después del remover el esfuerzo. La mezcla 3:1 (ARet:PEC) de igual manera no conformó un gel verdadero y en este sentido pudiera ser cuestionable la capacidad de encapsulación de estos sistemas; sin embargo, Cui et al. (2022) mencionan que los hidrogeles de almidón con alto contenido en amilosa son más fuertes y requieren de la aplicación de una fuerza de 50 a 90 kPa para su deformación, por lo que valdría la pena realizar la prueba bajo condiciones diferentes, ya que a una mayor presencia de pectina el comportamiento de los hidrogeles tienden a la viscoelasticidad más participativa por ambos componentes del sistema (elástico y viscoso).

En cambio, el sistema GC 1:1 ARet:PEC a las 24 y 40 horas aplicando una fuerza de 0.4 Pa, presentó la conformación de un gel verdadero, de acuerdo a esta prueba.



Figura 17. Prueba de cedencia y recuperación del sistema GC 1:1 a las 24 horas.

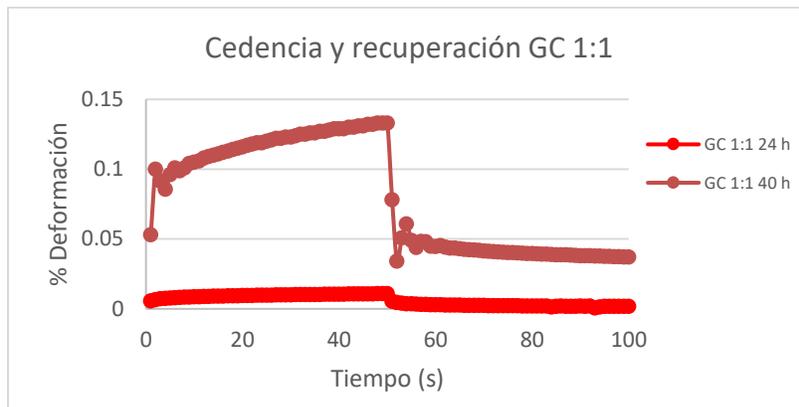


Figura 18. Prueba de cedencia y recuperación del sistema GC 1:1 a las 24 y 40 horas.

Además de que es el único sistema que, si conforma un gel verdadero, se aprecia como un gel estable y fuerte, pues al realizar la medición a las 24 h ya se denota esta conformación del hidrogel y que permanece hasta las 40 h.

### Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

FTIR es una técnica que se ha empleado para describir cambios estructurales de una gran variedad de compuestos. En este estudio se empleó para describir la interacción del almidón retrogradado y la pectina en los sistemas de encapsulación GC y REC.

A continuación, se presentan los resultados de FTIR.

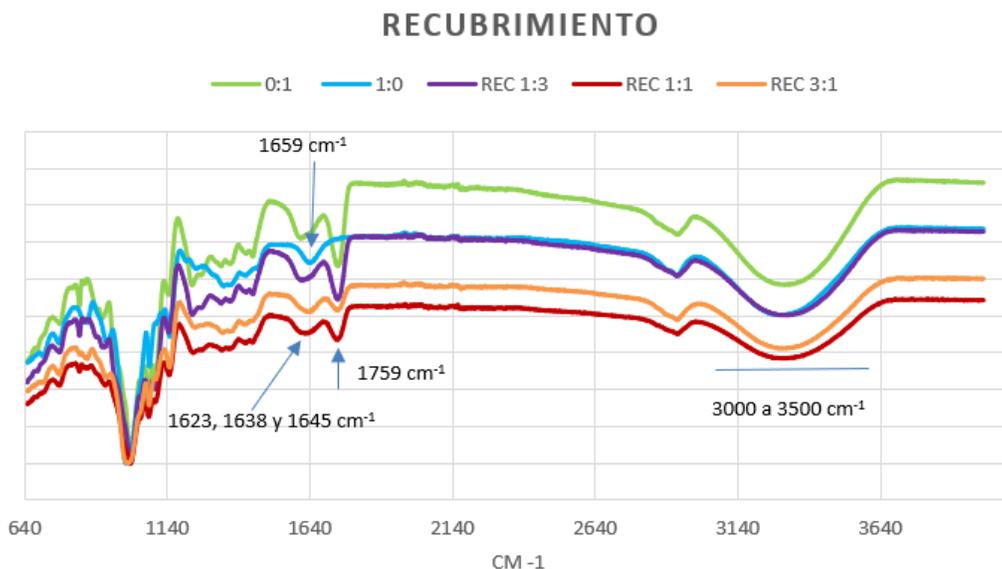


Figura 19. Espectros FTIR de los sistemas de encapsulamiento por recubrimiento (REC)

De acuerdo con los espectros del sistema REC (Figura 19) en sus diferentes proporciones se puede observar que la pectina presenta una banda fuerte a  $1759\text{ cm}^{-1}$ , esta banda no la presenta el almidón y de acuerdo con Assifaoui et al. (2010) se asocia al estiramiento del éster metílico de la pectina. A partir de esta banda, se observa que el pico se presenta en todas las mezclas (1:3, 1:1 y 3:1 ARet:PEC) aunque la banda disminuye de tamaño en las mezclas 3:1 y 1:1; sin embargo, al estar presente en todos los sistemas se puede confirmar que si existe un efecto de recubrimiento por parte de la pectina. Un comportamiento similar se observa para la banda  $1659\text{ cm}^{-1}$  del almidón retrogradado que se relaciona con el grupo amida, y que para las mezclas 1:3, 1:1 y 3:1 se presentan en las bandas 1623, 1638 y  $1645\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, mientras que la pectina presenta una banda a los  $1600\text{ cm}^{-1}$ , claramente se observa que en las mezclas hay un recorrido de estas bandas a valores más cercanos a  $1600\text{ cm}^{-1}$  conforme se incrementa la cantidad de pectina, por lo que se demuestra nuevamente el efecto de recubrimiento que va disminuyendo cuando la cantidad de almidón es mayor. Aunado a esto, se presentan amplias bandas de espectros entre los  $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$  las cuales, de acuerdo con Wang et al. (2019) se relacionan con el estiramiento de los enlaces O-H, sin embargo, para las mezclas no se presentan cambios en la amplitud o pico de las bandas lo que se puede interpretar como una ausencia de interacción molecular de los componentes.

## GELIFICACIÓN CONJUNTA

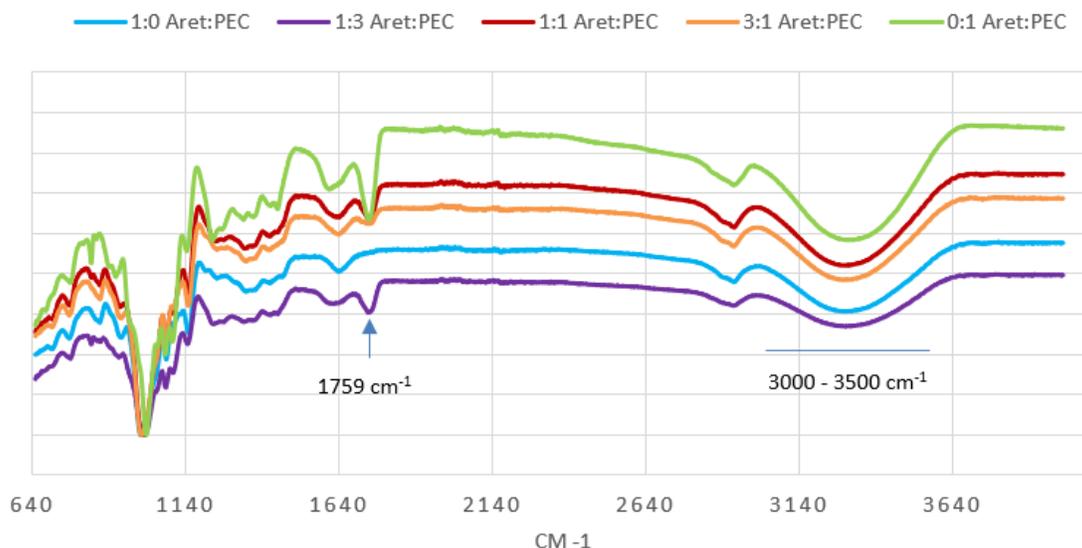


Figura 20. Espectro FTIR de los sistemas de encapsulación gelificación conjunta (GC).

En los espectros de FTIR del sistema de gelificación conjunta (Figura 20) se observa que sí existe una interacción de los compuestos debido a algunos cambios en la intensidad y la amplitud de los picos característicos de cada uno. Estos cambios en los espectros están en función de la proporción de cada elemento (almidón retrogradado y pectina).

El cambio en las bandas de  $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$  indica que se generaron nuevas interacciones dadas por puentes de hidrógeno en las mezclas, que se traduce en una interacción entre los componentes (M. Wang et al., 2019). Una hipótesis que se tenía en este estudio es que la mezcla de estos componentes en el sistema GC a una temperatura de  $70$  a  $80^\circ\text{C}$  generaría una interacción molecular de los componentes (ARet:PEC) debido a que las cadenas de amilosa y amilopectina se encuentran abiertas y disponibles al igual que la pectina. Con los resultados de FTIR se puede comprobar que sí hubo una interacción molecular de los componentes.

Los cambios en la banda  $1759\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la pectina también confirman la interacción del ARet y PEC y se puede observar que para la mezcla 1:3 la banda exhibe un mayor cambio que puede estar relacionado a la interrupción más pronunciada de la estructura del almidón. Los resultados de reología muestran este mismo efecto que se tradujo en la conformación de un sistema fluido que pudiera no ser favorable para el atrapamiento de los probióticos, en cambio para las muestras 1:1 y 3:1 se puede ver que espectros de FTIR muy similares que, si se relaciona con el comportamiento reológico, puede indicar un cambio en la reorganización del almidón y la conformación de sistemas con un buen grado de ordenamiento a diferencia del sistema 1:3.

Por otro lado, FTIR se ha sugerido como un método para medir el orden de corto alcance de la estructura del almidón (Warren et al., 2016). Las bandas en la región  $1100\text{--}900\text{ cm}^{-1}$  han demostrado ser sensibles a los cambios en la estructura del almidón, en particular las bandas de  $1000$ ,  $1022$  y  $1047\text{ cm}^{-1}$  han sido ampliamente estudiados (Capron et al., 2007; Wilson et al., 1987; Sevenou et al., 2002). De acuerdo con Warren et al. (2016), la banda a  $1022\text{ cm}^{-1}$  parece aumentar en muestras amorfas, mientras que las bandas a  $1000$  y  $1047\text{ cm}^{-1}$  se definen más en muestras más cristalinas. Para tener una mejor comprensión acerca de la organización molecular de corto alcance del almidón se ha establecido el estudio de las relaciones de banda  $1022:1000\text{ cm}^{-1}$  y  $1047:1022\text{ cm}^{-1}$ .

En este sentido, la Tabla 12 muestra que el sistema 1:3 presenta el valor más alto (76.97 %T) seguido del almidón retrogradado (ARet), por lo que se entendería que estos sistemas son más amorfos, mientras del sistema 1:1 posee el valor más bajo (68.57 %T) seguido del sistema 3:1 (71.21 %T).

La relación de intensidad de las bandas a  $1022:1000\text{ cm}^{-1}$ , así como  $1047:1022\text{ cm}^{-1}$  demostró ser una herramienta útil para monitorear la pérdida de estructura.

Dado que en los sistemas GC se presentó una interacción de los componentes, en la Tabla 12 se expresan las relaciones  $1000:1022$  y  $1047:1022\text{ cm}^{-1}$ .

Tabla 12. Valores de las bandas  $1000$ ,  $1022$  y  $1047\text{ cm}^{-1}$  y sus relaciones ( $1000/1022$  y  $1047/1022$ ).

$\text{cm}^{-1}$	A Ret GC	GC 1:3	GC 1:1	GC 3:1
<b>1047</b>	80.66	81.49	74.79	77.3
<b>1022</b>	75.1	76.97	68.57	71.21
<b>1000</b>	71.57	74.9	64.44	66.83
<b>R1000/1022</b>	0.953	0.973	0.940	0.938
<b>R1047/1022</b>	1.074	1.059	1.091	1.085

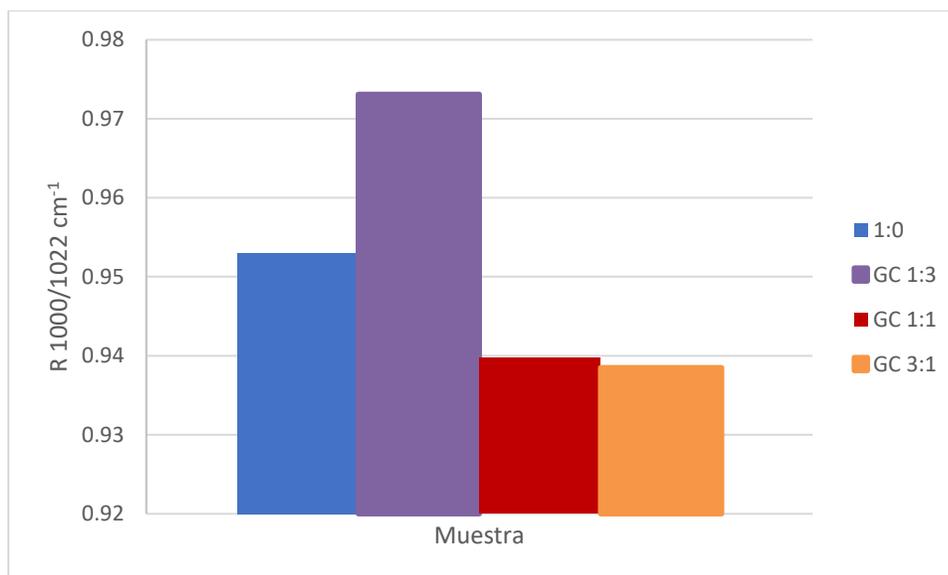


Figura 21. Grado de orden de las dobles hélices con base a la relación  $1000:1022\text{ cm}^{-1}$  para los sistemas GC

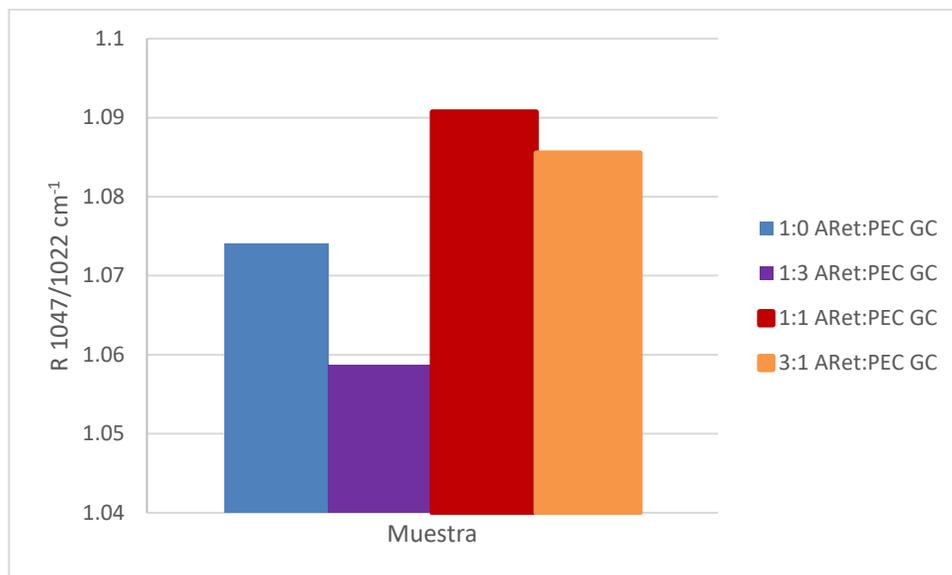


Figura 22. Grado de organización ( $1047:1022 \text{ cm}^{-1}$ ) de las estructuras conformadas en los sistemas GC

La relación de la intensidad a  $1000/1022 \text{ cm}^{-1}$  se utilizó para caracterizar el orden de la doble hélice de las muestras retrogradadas y, como se puede observar en la Figura 21, en donde los valores más cercanos a 1 representan el grado de reorganización del almidón, la mezcla 1:3 (ARet:PEC) representa el valor más alto, esto concuerda con lo observado en reología en donde esta mezcla se describe como un sistema más fluido en donde la pectina interfirió para dispersión del almidón. Por lo cual, este sistema se puede describir como el más desorganizado con respecto al almidón. Las mezclas 1:1 y 3:1 ARet:PEC no muestran grandes diferencias en el grado de organización entre sí, pero sí presentan un grado de organización helicoidal menor que el almidón retrogradado (1:0).

En la Figura 22 se expresa la relación de las bandas  $1000$  y  $1047 \text{ cm}^{-1}$  que definen a las muestras más cristalinas, en donde se observa que en efecto la mezcla 1:3 (ARet:PEC) no presenta un buen nivel de organización y lo más importante para este análisis es que tanto la mezcla 1:1 y 3:1 (ARet:PEC) presentan un mejor nivel de organización incluso que el almidón, siendo la mejor la mezcla 1:1. En este sentido se encontró que la pectina puede mejorar el grado y nivel de organización del almidón retrogradado, esta información va a complementarse con el análisis de DSC y Rayos X.

## Difracción de rayos X

A continuación, se presentan los resultados del cálculo de cristalinidad para cada sistema.

Tabla 13. Cristalinidad de los sistemas de encapsulamiento

<b>ARet:PEC</b>	<b>Cristalinidad (%)</b>
<b>1:0</b>	15.20
<b>0:1</b>	9.15
<b>1:3 REC</b>	10.84
<b>1:1 REC</b>	11.19
<b>3:1 REC</b>	19.15
<b>1:3 GC</b>	13.82
<b>1:1 GC</b>	16.99
<b>3:1 GC</b>	18.61

A partir de estos resultados se observa que en los sistemas GC, los porcentajes de cristalinidad tienden a mejorar con la presencia de la pectina a pesar de que en sí misma tiene una cristalinidad baja (9.15 %). Soler et al. (2020) reportaron una cristalinidad del 16 % para Hylon VII bajo el tratamiento de autoclave por 30 minutos, este porcentaje de cristalinidad es ligeramente mayor al 15.20 % obtenido en este estudio. Es interesante ver que a pesar de que la pectina interrumpe la organización del almidón retrogradado, se obtiene un incremento en el porcentaje de cristalinidad incluso por encima del almidón retrogradado alto en amilosa.

Se sabe que durante la retrogradación del almidón, las cadenas de amilosa forman una estructura de doble hélice mediante puentes de hidrógeno, estas dobles hélices conforman la región cristalina del almidón retrogradado (Lu et al., 2021).

Para el sistema de recubrimiento los resultados no muestran evidencia de una interacción molecular; sin embargo, la mezcla 3:1 (ARet:PEC) presentó una cristalinidad del 19.15 % (el más alto). Esto se debe probablemente a que al verse limitada la pectina por la cantidad del almidón se sumaron los valores de cristalinidad. Para las mezclas 1:3 y 1:1 hubo una reducción del porcentaje de la cristalinidad con respecto al ARet. Este efecto, al igual que en FTIR, puede ser indicio de que, si hubo un recubrimiento, ya que los valores obtenidos están relacionados más con la pectina que con el almidón y, por ende, se confirma nuevamente el efecto de recubrimiento por parte de la pectina en estas mezclas.

## Calorimetría diferencia de barrido (DSC)

Para DSC se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 14 y Tabla 15.

Tabla 14. Resultados del análisis del primer pico de los sistemas

PRIMER PICO						
A Ret:PEC	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)	S (±)
1:0	52.63	60.1	68.16	15.53	0.175	0.064
0:1	35.78	47.8	55.65	19.87	1.280	0.057
GC 1:3	42.37	50.62	58.22	15.85	0.605	0.007
GC 1:1	45.85	55.03	65.88	20.03	0.605	0.177
GC 3:1	47.11	55.37	62.19	15.08	0.260	0.127
REC 1:3	41.95	49.19	55.82	13.87	0.285	0.064
REC 1:1	42.38	52.61	62.93	20.55	0.720	0.141
REC 3:1	47.87	55.85	65.58	17.71	0.415	0.148

Tabla 15. Resultados del análisis del segundo pico de los sistemas.

SEGUNDO PICO						
A Ret:PEC	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)	S (±)
1:0	150.75	151.47	158.83	8.08	159.600	0.007
0:1	175.54	176.76	179.88	4.44	157.670	0.255
GC 1:3	159.51	160.5	166.65	7.14	94.300	4.384
GC 1:1	156.04	157.5	166.145	10.105	106.240	0.679
GC 3:1	158.91	159.53	167.04	8.13	125.340	2.326
REC 1:3	174.75	175.12	181.41	6.66	139.100	5.650
REC 1:1	170.2	170.87	177.17	6.97	120.290	3.939
REC 3:1	164.87	166.54	170.62	4.75	132.560	1.195

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica empleada para caracterizar el comportamiento de gelatinización del almidón. Los resultados obtenidos muestran variaciones significativas en temperatura de inicio (To), pico (Tp) y conclusión (Tc) de los termogramas. Los niveles más altos de entalpía indican una cristalinidad más pronunciada y una mayor presencia de hélices dobles ordenadas.

El cambio en los valores de Tp y ΔH (J/g) corroboran que ocurrió una modificación en la estructura de las moléculas del almidón por la presencia de la pectina en las diferentes mezclas del sistema GC. Los valores obtenidos pueden relacionarse con el grado de reorganización en las mezclas para identificar sistemas térmicamente más estables, ya que

se ha reportado que un incremento en los valores de  $T_p$  y  $\Delta H$  se atribuye a un sistema más estable y organizado (Warren et al., 2016).

Los termogramas muestran dos picos. Para los sistemas con almidón se observó una transición desde los 42 hasta los 62 °C. En el almidón se ha reportado una temperatura de desorganización de la amilopectina alrededor de los 50 °C. Por otro lado, la pectina presenta de igual manera una transición de los 35 a los 55 °C, esta propiedad se verá reflejada en la temperatura pico de las mezclas.

De acuerdo con la Tabla 14, los valores obtenidos para el primer pico son 50.62, 55.03 y 55.37 en temperatura pico ( $T_p$ ) y valores de 0.605, 0.605 y 0.260 de  $\Delta H$  para las mezclas 1:3, 1:1 y 3:1, respectivamente, de los sistemas GC. Estos valores indican que la mezcla 1:1 y 3:1 presentaron los valores de  $T_p$  más altos en comparación con la mezcla 1:3; sin embargo, para  $\Delta H$  fue la mezcla 3:1 la que presentó el valor más bajo. Cuando se comparan estos resultados con los valores del almidón retrogradado (ARet) que presentó una  $T_p$  de 60.1 y  $\Delta H$  de 0.175, resulta evidente que la pectina redujo la temperatura pico ( $T_p$ ) alrededor de 5 °C, lo que se traduce en una estabilidad térmica reducida en comparación con el almidón retrogradado. Este valor deberá considerarse al momento de darle una aplicación industrial a los sistemas; sin embargo,  $\Delta H$  se incrementó para todas las mezclas aunque fue más evidente en los sistemas 1:3 y 1:1 (ARet:PEC).

La segunda transición térmica (segundo pico) está relacionada con la organización de la amilosa, en los sistemas GC se observa que los valores de  $\Delta H$  son más altos que para la primera transición. Esto se debe a que en el almidón alto en amilosa ocurre una transición de los 150 a los 167 °C; por otro lado, la pectina presenta una transición desde 175 hasta 179 °C, una  $T_p$  de 176.76 °C y una  $\Delta H$  (J/g) de 157.67, mientras que el almidón retrogradado presenta una  $T_p$  de 151.47 °C y una  $\Delta H$  (J/g) de 159.60. Para las mezclas se presentaron temperaturas pico de 160.5, 157.5 y 159.53 °C con  $\Delta H$  de 94.30, 106.24 y 125.34 para las mezclas 1:3, 1:1 y 3:1 (ARet:PEC), respectivamente. La temperatura pico de la pectina indica que es un material térmicamente más estable que el almidón.

Con respecto a los valores de  $T_p$  de las mezclas se observa que el sistema que presenta el mayor valor es la mezcla 1:3; sin embargo, su  $\Delta H$  es la más baja. Esto confirma que, si bien presenta una mayor  $T_p$  por efecto de la pectina, esta mezcla tiene una interrupción en la conformación de las dobles hélices (de la amilosa) por la presencia de la pectina. Para la mezcla 1:1 y 3:1 se puede observar que 3:1 (ARet:PEC) conforma una estructura térmicamente más estable que la mezcla 1:1 con un  $\Delta H$  de 157.5 °C, pero que esta mezcla (1:1) presenta una  $T_p$  mayor que el almidón retrogradado (151.47 °C). Nuevamente se

confirma que en estas mezclas la presencia de pectina mejora la reorganización del almidón y conforma estructuras más estables que el almidón retrogradado.

Para los sistemas de recubrimiento (REC) la prueba de calorimetría diferencial de barrido no proporciona información adicional que refiera a un cambio en la conformación de los sistemas ya que los valores de  $T_p$  y  $\Delta H$  van a estar relacionados a la cantidad pectina.

### **Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Como parte final de la caracterización de los sistemas se presentan las imágenes obtenidas por SEM.



Figura 23. Microfotografías del almidón retrogradado (1:0 ARet:PEC) en polvo, enfoque de 500x, 2500x y 4000x.

En la Figura 23 se observa el efecto del tratamiento hidrotérmico sobre el almidón retrogradado donde se aprecia la presencia de remanentes de los gránulos. La deformación que presentan estos gránulos son resultado de la lixiviación de la amilosa. Así mismo, se pueden observar estructuras no granulares que corresponden a la amilosa (70 %) y amilopectina (30 %). De acuerdo con estas imágenes, el sistema de almidón retrogradado (1:0 ARet:PEC) se puede describir como una matriz compacta de conformación no lisa debido principalmente a la presencia de una gran cantidad de gránulos remanentes, que puede presentar cierto grado de porosidad.

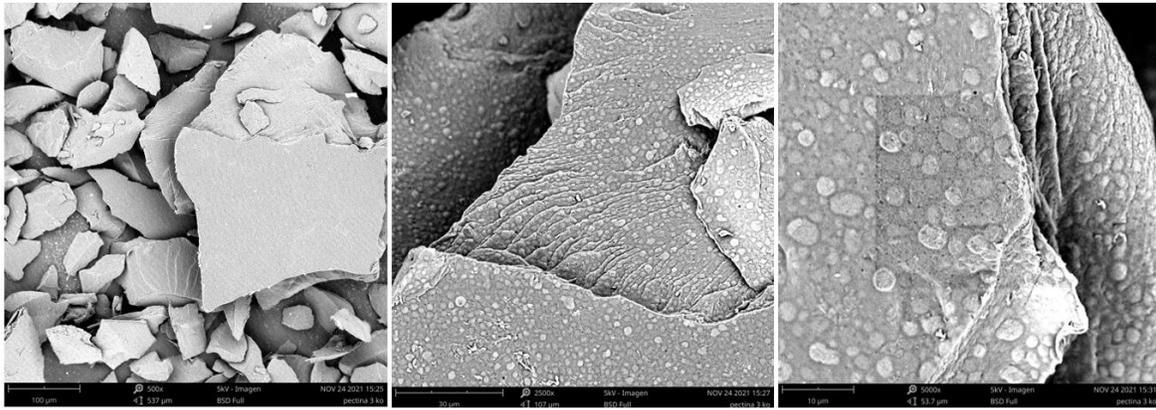


Figura 24. Microfotografías de la pectina (0:1 ARet:PEC) en polvo, enfoque de 500x, 2500x y 5000x.

La pectina (Figura 24) posee una estructura más rígida, conforma láminas (500x) y presenta formas redondas que pudieran ser propias del material o debido a la presencia de burbujas de aire por efecto de la agitación durante su preparación.

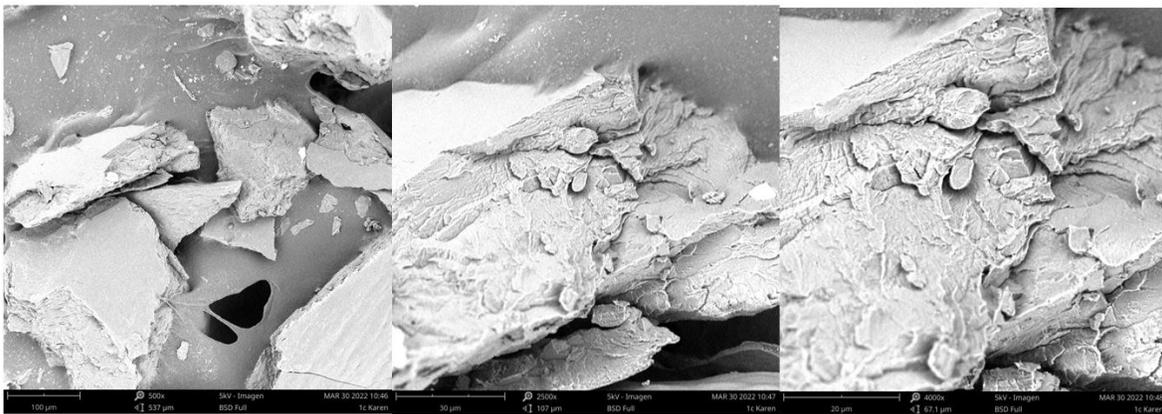


Figura 25. Microfotografías de la muestra GC 1:3 (ARet:PEC), enfoque de 500x, 2500x y 4000x

Para la mezcla de pectina y almidón se observa una estructura más heterogénea donde se aprecia la formación de láminas parecidas a la pectina; sin embargo, la matriz conformada se ve modificada por el almidón. Por último, se puede observar que el material tiene restos a su alrededor (enfoque 500x), lo que puede estar relacionado a que el material es más frágil o quebradizo. Este resultado coincide con los datos presentados en la Tabla 10 y con la experiencia al haber manipulado los materiales ya que esta mezcla en especial fue más quebradiza que las demás.

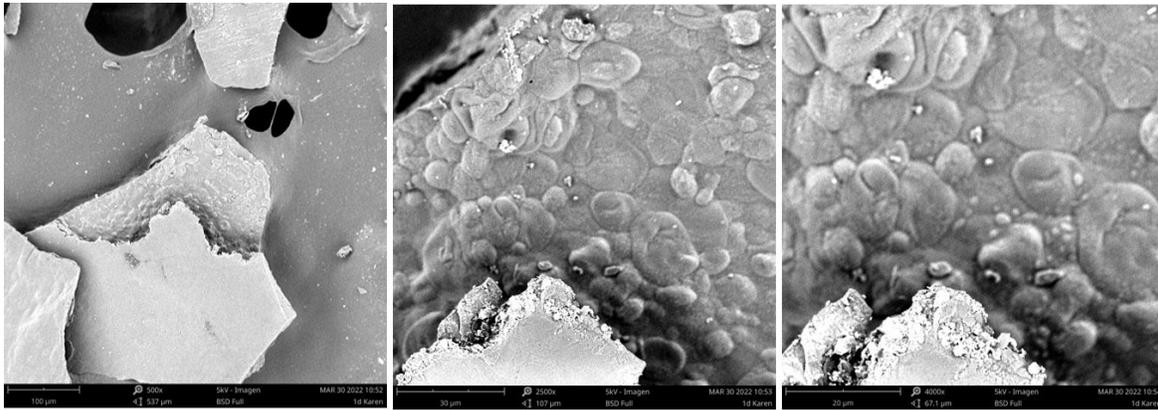


Figura 26. Microfotografías de la muestra GC 1:1 (ARet:PEC), enfoque de 500x, 2500x y 4000x.

En la Figura 26 se observa la conformación de una matriz más continua con respecto a ARet:PEC 1:0 (almidón retrogradado), no presenta porosidad aparente y se pueden apreciar los gránulos remanentes. Las imágenes muestran que la pectina fue capaz de introducirse y permanecer en conjunto con el almidón retrogradado por lo que claramente se aprecia la participación de los dos componentes en la matriz.

De acuerdo con las características que presenta este sistema y al compararlo con la conformación del almidón retrogradado, existe la posibilidad de que el espacio que se encuentra dentro de la conformación de este sistema (1:0 ARet) no sea apropiado para la introducción y permanencia del probiótico, considerando que *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG mide de 0.8 a 4.0  $\mu\text{m}$ . En la mezcla 1:1 (Figura 26) se puede apreciar que existe un mayor espacio, dado por la movilidad que la pectina genera en la conformación de la matriz y que se pudo caracterizar de acuerdo a las pruebas de reología antes expuestas.

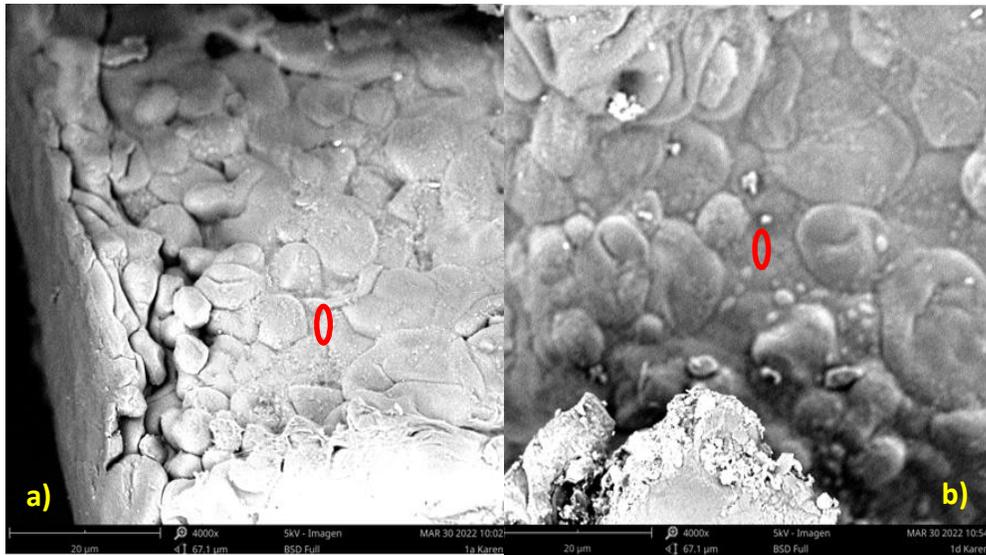


Figura 27. Comparación de los sistemas 1:0 (ARet) a) y 1:1 (ARet:PEC) b), el círculo rojo es una representación aproximada de hasta 4 µm de largo que puede medir el probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus GG*.

Al hacer este análisis y comparativo de los sistemas se aprecia que el sistema 1:1 (ARet:PEC) puede tener mayor posibilidad de incorporar al probiótico en su interior sin ocasionar incluso un daño mecánico a las células. En este sentido, el hecho de tener un sistema más fluido en comparación con el almidón retrogradado puede tener un mayor efecto en la protección y conservación de la viabilidad del probiótico en cuestión.

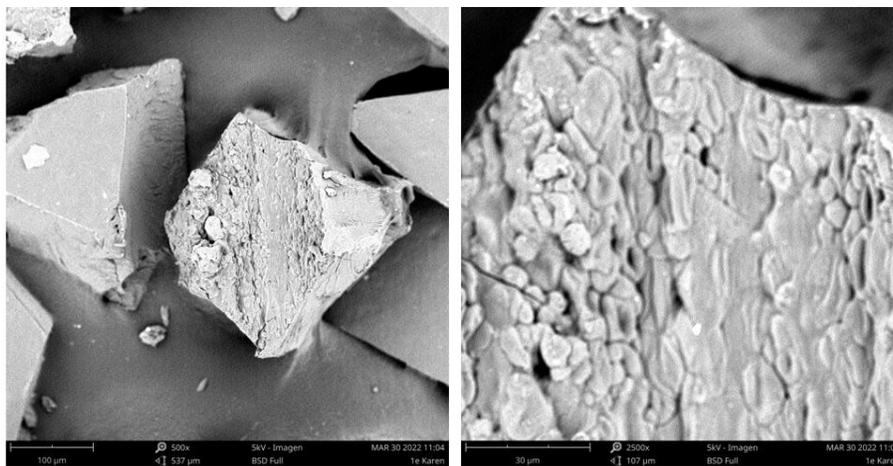


Figura 28. Microfotografías de la muestra GC 3:1 (ARet:PEC) enfoque de 500x y 2500x

En la

Figura 28 se muestran las imágenes del sistema GC 3:1 (ARet:PEC) en donde se pueden apreciar los remanentes de gránulos de almidón. No se observa la presencia de la pectina como en el sistema 1:1; sin embargo, si contribuye a generar una conformación más continua en comparación con el almidón retrogradado, pero sigue presentando cierta porosidad. Aunado a esto, al igual que en el almidón retrogradado (ARet), sería cuestionable la capacidad de incorporar y mantener dentro del sistema al probiótico sin generarle algún daño.

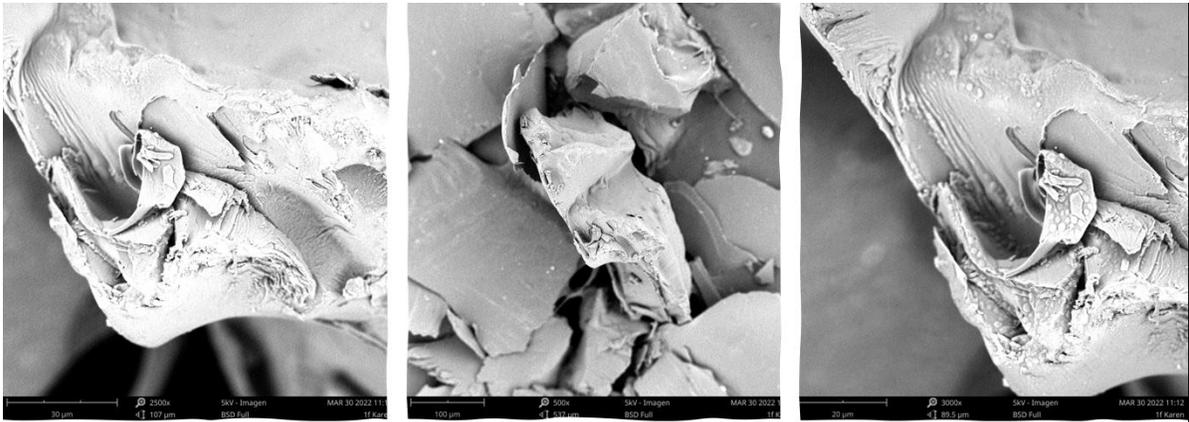


Figura 29. Microfotografías de la muestra REC 1:3 (ARet:PEC), enfoque de 500x, 2500x y 3000x

En la Figura 29 se observa el sistema REC 1:3 (ARet:PEC). En las imágenes no se aprecian remanentes de gránulos de almidón, en cambio, se pueden apreciar únicamente características de la pectina (Figura 24), por lo que en este sistema no hay duda del efecto de recubrimiento de la pectina.

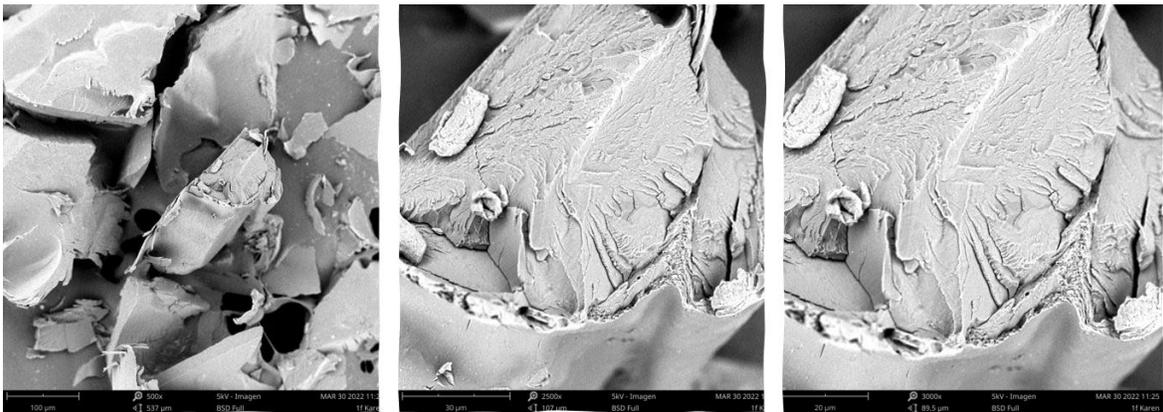


Figura 30. Microfotografías de la muestra REC 1:1 (ARet:PEC), enfoque de 500x, 2500x y 5000x

En las imágenes del sistema REC 1:1 (Figura 30) se puede observar todavía un efecto de recubrimiento por parte de la pectina debido a que no se identifican remanentes de gránulos de almidón.

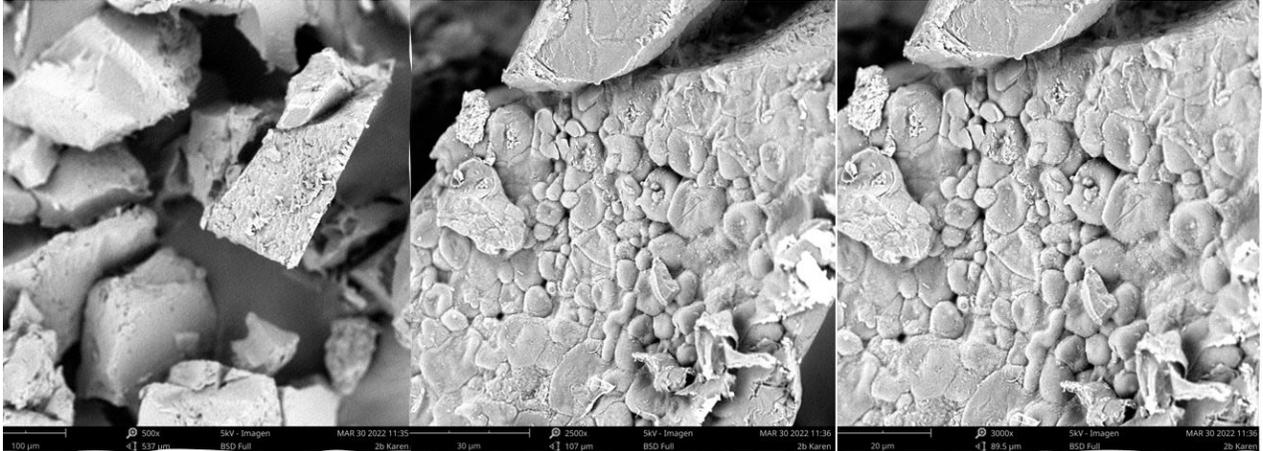


Figura 31. Microfotografías de la muestra REC 3:1 (ARet:PEC), enfoque de 500x, 2500x y 3000x

El sistema 3:1 (Figura 31) muestra que el efecto de recubrimiento se perdió en esta mezcla, pues se pueden observar los gránulos remanentes del almidón. Por lo que, esta mezcla no cumple la función de recubrimiento de la pectina.

## Elección del sistema de encapsulamiento

Con base en la caracterización de los sistemas en diferentes proporciones se establece lo siguiente:

1. La naturaleza de los sistemas GC y REC es diferente.
2. Turbidimetría, reología, FTIR y SEM demuestran el efecto de recubrimiento para las mezclas 1:3 y 1:1 pero no se encontró un efecto de recubrimiento para la mezcla 3:1 (ARet:PEC). Con base en ello, esta mezcla se descarta para la encapsulación del probiótico.
3. Turbidimetría, reología, FTIR, DSC, rayos X y SEM sustentan que en el sistema GC ocurre una interacción molecular de los componentes (almidón retrogradado y pectina).
4. El sistema GC 1:3 es un sistema fluido ya que la presencia de pectina no le permite conformar un hidrogel firme; por lo tanto, es probable que no se genere el atrapamiento del probiótico (Reología). Es el sistema menos estable de acuerdo con los valores obtenidos en DSC, Rayos X y la relación  $1047/1022\text{ cm}^{-1}$  de FTIR donde se demuestra que la pectina interfirió en la conformación de las dobles hélices del almidón, generando cierta fragilidad en la matriz lo que se confirmó con las imágenes de SEM.
5. El sistema GC 1:1 conforma una red de hidrogel de acuerdo con las pruebas reológicas. Así mismo, se determinó que el hidrogel se encuentra en una región viscoelástica, con una participación notable por ambos componentes (elástico y viscoso) ya que las pruebas de cedencia y recuperación comprueban que se trata de un gel suave a diferencia del hidrogel de almidón retrogradado. Rayos X indica que posee un porcentaje de cristalinidad más alto que el almidón retrogradado, FTIR corrobora que existe una interacción de los materiales debido a la presencia de puentes de hidrógeno y los cambios en los espectros, la relación  $1047/1022\text{ cm}^{-1}$  de FTIR demuestra que es la mezcla con un mejor grado de organización del almidón, superando al almidón retrogradado. Mediante DSC se comprueba una mejora en la estabilidad térmica dada por la presencia de la pectina, con los resultados de Rayos X, el porcentaje de cristalinidad supera al del almidón retrogradado y SEM muestra un sistema menos compacto que puede funcionar para el atrapamiento celular. Además, se sustenta la teoría de que la conformación de un hidrogel suave y estable puede generar un mejor atrapamiento de los probióticos que se puede reflejar en una buena protección en condiciones de almacenamiento y de digestión *in vitro*.
6. El sistema GC 3:1 es una matriz densa y compacta que tiende poco a la deformación y recuperación (reología). El porcentaje de cristalinidad, el grado de organización, y la estabilidad térmica (DSC) confirman que la nueva matriz conformada es una

estructura más compacta y fuerte que la del ARet. Por medio de SEM se corroboró la poca flexibilidad en el sistema, la cual puede interferir con la encapsulación del probiótico.

Por lo antes expuesto se decide trabajar con la proporción 1:1 (ARet:PEC) para ambos sistemas.

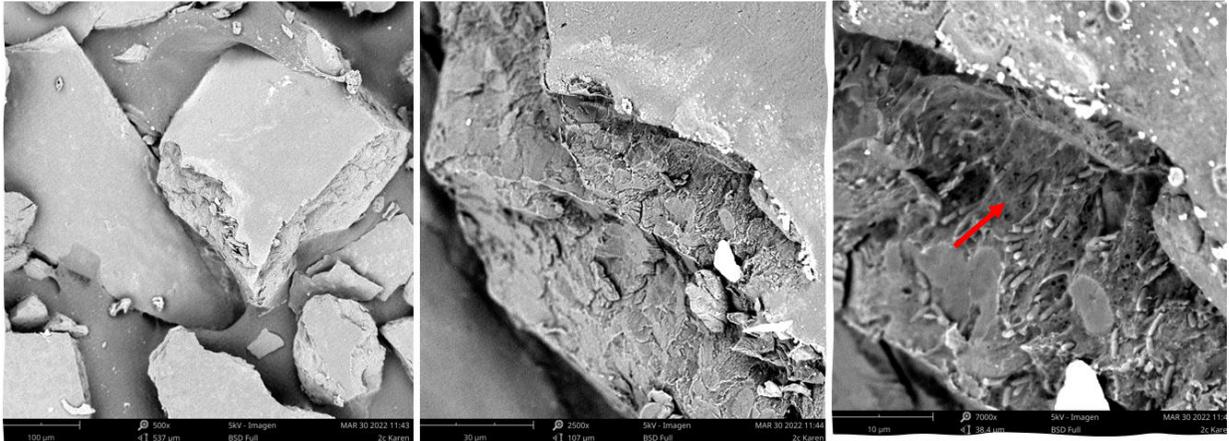


Figura 32. Sistema de encapsulación gelificación conjunta (GC) en una proporción de 1:1 ARet:PEC con el probiótico *Lactcaseibacillus rhamnosus* GG.

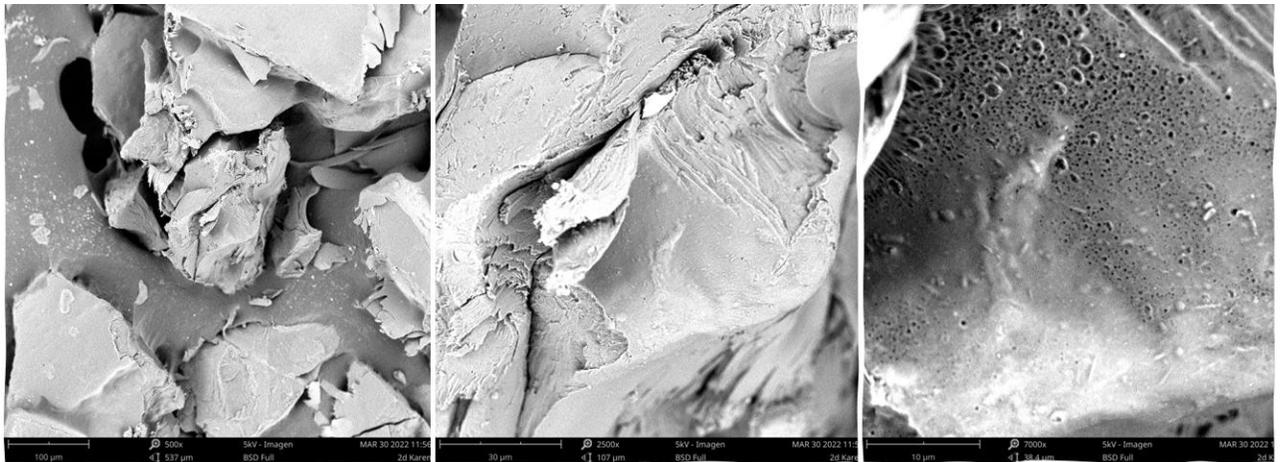


Figura 33. Sistema de encapsulación recubrimiento (REC) en una proporción de 1:1 ARet:PEC con el probiótico *Lactcaseibacillus rhamnosus* GG en el sistema.

La Figura 32 y la Figura 33 muestran el atrapamiento de las células probióticas en GC y REC de los sistemas que se eligieron para llevar a su evaluación. En el sistema por REC se observa el efecto de recubrimiento, mientras que para el sistema GC se puede observar que los probióticos si fueron encapsulados dentro de los materiales.

## Viabilidad en condiciones de almacenamiento

Una vez definidas las condiciones para el sistema GC y REC se evaluó la viabilidad del probiótico encapsulado. Los resultados se muestran en la Figura 34.

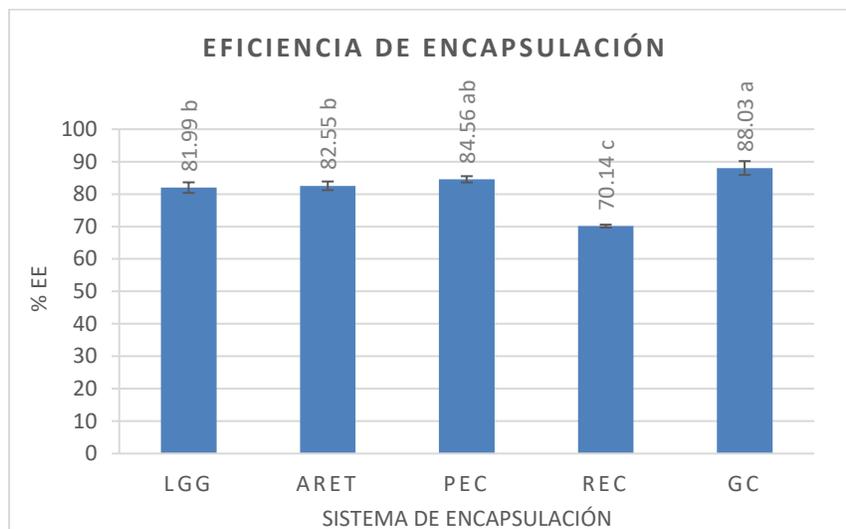


Figura 34. Eficiencia de encapsulación (%EE) de los sistemas GC y REC, así como los controles LGG, ARET y PEC. Los valores porcentuales marcados con las mismas letras no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Para este estudio se entenderá a LGG como el probiótico (*Lactiseibacillus rhamnosus GG*) expuesto a las mismas condiciones de agitación, secado y molienda de los sistemas y como células libres. El sistema ARET para estas pruebas se refiere al almidón retrogradado junto con el probiótico y PEC se refiere al probiótico con pectina.

La eficiencia de encapsulación (EE) está relacionada con el efecto en la viabilidad de las células probióticas por el método y condiciones de la encapsulación. Para este estudio se emplearon técnicas de secado y molienda. Es importante mencionar que no se empleó ninguna técnica para generar microcápsulas con morfología esférica como mayormente se reporta. En este sentido, al aplicar procesos sencillos como la deshidratación y molienda, le brinda al proyecto la característica de ser un proceso sencillo y económico.

De acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 34) se observa que el sistema GC presentó el más alto porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) con un valor de 88.03, seguido de la PEC y ARET. El sistema REC presentó el más bajo %EE con un valor de 70.14, mientras que LGG presentó un % 81.99 de supervivencia.

A pesar de tener %EE del 70.14 y 88.03% para los sistemas REC y GC es importante mencionar que las UFC/g son considerablemente altas (Tabla 16), pues el sistema GC contenía 9.63 log<sub>10</sub> UFC/g, para el almidón la viabilidad se encontró en 8.83 log<sub>10</sub> UFC/g la cual se redujo a 7.34 log<sub>10</sub> UFC/g en el sistema REC, que obtuvo una reducción de hasta 3.14 log<sub>10</sub> UFC/g. De acuerdo con la FAO & OMS (2006), un alimento con probióticos debe contener al menos 6 log<sub>10</sub> UFC/g, por lo que el proceso permite cumplir este criterio para ambos sistemas (REC y GC), sin embargo, de acuerdo a algunos autores, la recomendación es tener después del proceso de encapsulación 8.0 log<sub>10</sub> UFC/g, considerando la pérdida de viabilidad por efectos como almacenamiento y su paso por el tracto gastrointestinal (Nazzaro et al., 2009; Hill et al., 2014) por lo que para el sistema REC se puede incrementar el número de células en el inóculo. Una de las principales razones del porque se tiene una mayor pérdida en el sistema REC es debido al proceso de doble secado y molienda que se lleva a cabo para generar el sistema REC (Figura 4).

Tabla 16. Pérdida en la viabilidad del probiótico (log<sub>10</sub> UFC/g) por efecto del proceso de encapsulación.

<i>Sistema</i>	<i>Log 10 en el sistema (UFC/g) antes del proceso de encapsulación</i>	<i>Log 10 después del proceso de encapsulación (UFC/g)</i>	<i>Perdida Log 10 UFC/g</i>
<i>LGG</i>	12.79	10.48	2.31 ± 0.32
<i>ARet</i>	10.70	8.83	1.87 ± 0.18
<i>PEC</i>	11.17	9.44	1.73 ± 0.13
<i>REC</i>	10.47	7.34	3.14 ± 0.07
<i>GC</i>	10.94	9.63	1.31 ± 0.28

También se puede observar que el sistema GC presentó un mayor efecto protector del probiótico a las condiciones de encapsulación, seguido de la mezcla con pectina y por último con almidón retrogradado. Para las células libres de LGG se presentó una pérdida de 2.31 ± 0.32 log<sub>10</sub> UFC/g por lo que la adición de alguno de los compuestos si tuvo un efecto protector por la mejora en la viabilidad del probiótico.

La cuantificación de la viabilidad de las células en condiciones de almacenamiento a 4 °C se llevó a cabo para evaluar la estabilidad de los sistemas encapsulación REC y GC durante su almacenamiento.

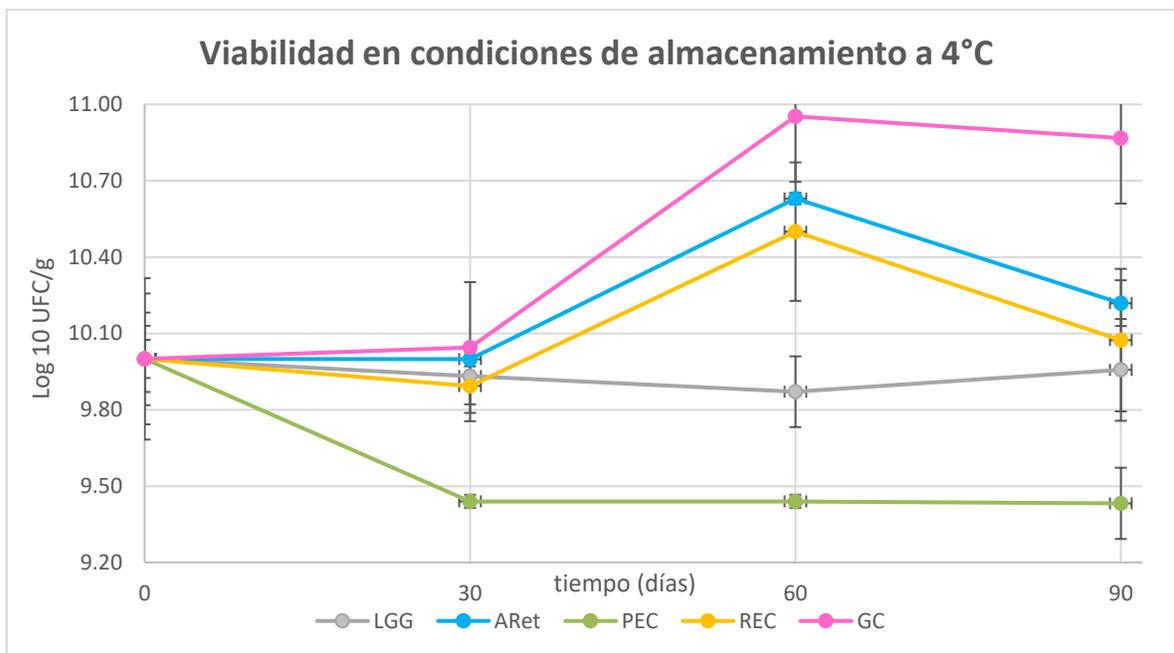


Figura 35. Viabilidad de las células probióticas en condiciones de almacenamiento (4 °C) durante un periodo de 3 meses.

Los resultados obtenidos (Figura 35) muestran un efecto interesante en los sistemas de encapsulación REC, GC y ARet en donde a los 30 días mantiene la viabilidad ya que no se encontró una reducción importante en su viabilidad, incluso con respecto al control LGG; sin embargo, a los 60 días de almacenamiento en los sistemas GC, REC y ARet la viabilidad incrementó 0.91, 0.59 y 0.61  $\log_{10}$  UFC/g para cada sistema, sin embargo, para el probiótico con pectina, se presentó una menor cantidad de células viables (con respecto a las células libres) con 9.44  $\log_{10}$  UFC/g desde los 30 días y se mantuvo hasta los 90 días, mientras que las células libres (LGG) obtuvieron 9.89  $\log_{10}$  UFC/g en viabilidad desde los 30 días y se mantuvo hasta los 90 días. Al respecto, se plantea la posibilidad de que no se estén liberando el total de las células encapsuladas cuando se tiene almidón retrogradado. Esto es lógico cuando se observa la caracterización de los sistemas mediante DSC, FTIR y Rayos X ya que estos estudios indican que la mezcla 1:1 posee un alto grado de reorganización y, lo más importante, un incremento en el porcentaje de cristalinidad la cual se relaciona con la cantidad del almidón resistente, y el almidón resistente se caracteriza por ser una estructura difícil de degradar. En este sentido, se plantea la posibilidad de que se tenga un problema de liberación del probiótico que podría disminuir la cantidad de células a entregar; sin embargo, también puede ser una ventaja, en donde se sabe que durante el almacenamiento será capaz de proteger a las células por periodos largos de tiempo lo cual es algo deseable para un sistema de encapsulación, además de que durante la digestión la

presencia de sales, enzimas, condiciones de pH y el movimiento peristáltico darían paso a la liberación del probiótico, generando un efecto probiótico y prebiótico a partir del consumo de este encapsulado.

A pesar de tener este incremento en la cantidad de células a los 60 días en los sistemas ARet, GC y REC para el día 90 de almacenamiento la viabilidad se redujo en GC  $0.1 \log_{10}$  UFC/g, REC  $0.41 \log_{10}$  UFC/g y ARet  $0.43 \log_{10}$  UFC/g.

Al respecto se puede entender que el sistema, a pesar de ser estable, presenta cierta movilidad y que la retrogradación del almidón tiene un impacto en la liberación, pues a los 90 días se tiene una menor cantidad de células viables que a los 60 pero una mayor cantidad de células viables que a los 30 días.

Durante este periodo de almacenamiento el sistema GC mostró tener una mejor protección de la viabilidad de *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG con  $10.87 \pm 0.12 \log_{10}$  UFC/g, REC presento una concentración de células viables de  $10.07 \pm 0.28 \log_{10}$  UFC/g y ARet de  $10.22 \pm 0.28 \log_{10}$  UFC/g

El sistema GC tiene la mayor viabilidad, ya que por ser un hidrogel muy suave (reología, FTIR y SEM) se favoreció la encapsulación de probióticos, contrario a lo que se reporta en otros estudios en donde se afirma que la conformación de geles duros y fuertes es lo ideal para la encapsulación de probióticos (X. Hu et al., 2021). En ese mismo estudio se establece que la cantidad de pectina en la conformación de redes de hidrogel con dos biopolímeros determina las características del hidrogel, lo cual se pudo confirmar en el presente estudio en la caracterización de las mezclas, sobre todo para el sistema GC.

La FAO & OMS (2006) establecen que para que un alimento se considere probiótico debe tener una concentración de  $10^6$  UFC/g, en este estudios se demostró que los sistemas protegen al probiótico en condiciones de almacenamiento ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y mejoran la viabilidad con respecto a las células libres, al conservar los probióticos en una concentración de al menos  $10^{10}$  UFC/g a los 90 días de almacenamiento.

En este contexto se espera que los dos sistemas puedan proteger al probiótico ante condiciones de digestión *in vitro* y demostrar la protección y entrega eficaz.

### **Viabilidad en condiciones de digestión *in vitro* (INFOGEST 2.0)**

De la evaluación de los sistemas de encapsulación en condiciones de digestión *in vitro* bajo el protocolo INFOGEST 2.0 se obtuvo lo siguiente.

Tabla 17. Pérdida celular Log<sub>10</sub> UFC/g de LGG en condiciones de digestión *in vitro* (INFOGEST 2.0) a los 0 días y 30 días de almacenamiento

<b>Sistema de Encapsulación</b>	<b>Pérdida Log<sub>10</sub> UFC/g 0 días de almacenamiento (INFOGEST 2.0)</b>	<b>Pérdida Log<sub>10</sub> UFC/g a los 30 días de almacenamiento (INFOGEST 2.0)</b>
LGG	1.93 ± 0.36	1.433 ± 0.23
REC	0.32 ± 0.29	2.372 ± 0.37
GC	0.66 ± 0.02	2.887 ± 0.04

De acuerdo con estos resultados (Tabla 17), las células libres LGG presentan una buena conservación en su viabilidad con respecto al tiempo de almacenamiento y a las condiciones de digestión *in vitro*. Esto coincide con lo que se reporta en bibliografía (Pitino et al., 2010), pues LGG se caracteriza por tener buena resistencia a las condiciones de digestión. En este sentido, valdría la pena evaluar el sistema con otro probiótico para tener una mayor ventaja del uso de los materiales.

Por otro lado, los resultados sugieren que el probiótico en los sistemas (REC y GC) presenta una mayor pérdida en condiciones de digestión *in vitro* a los 30 días, por lo que sería cuestionable su uso en beneficio de la conservación de la viabilidad. Bajo este supuesto es importante mencionar el efecto que se presentó en condiciones de almacenamiento se debe probablemente a que el probiótico no se liberó explicando la cuantificación de menos células (Log<sub>10</sub> UFC/g) dentro de los sistemas GC y REC. Esto tendría un sustento considerando que la pectina de alto metoxilo empleada conforma geles más fuertes en condiciones de pH ácidas de acuerdo con la información proporcionada en la ficha técnica del fabricante. Bajo este supuesto, la pectina estaría generando cambios en su estructura que de alguna manera limitan la liberación del probiótico. Otro aspecto para considerar es el porcentaje de cristalinidad que poseen los sistemas y que pudieran estar limitando la liberación. Estos supuestos son importantes ya que, de acuerdo con las características de resistencia a la digestión que poseen ambos componentes (ARet y PEC), es poco probable que no le brinden protección al probiótico considerando que las micrografías de SEM muestran un atrapamiento de probiótico con un efecto protector como lo muestran los datos de viabilidad en condiciones de almacenamiento. Así mismo, la pérdida solo se presentó a los 30 días de almacenamiento, mientras que en el tiempo 0 días se observó una mejora en la viabilidad bajo las condiciones de digestión. En este supuesto pudiera intervenir la retrogradación del almidón y el alto contenido de amilosa, ya que se sabe que el almidón retrogradado conforma una mayor cantidad de almidón resistente a una temperatura de

almacenamiento de 4 °C (Chang et al., 2021). Al respecto, en un estudio llevado a cabo por Ying et al. (2013) se encontraron resultados similares empleando almidón resistente y proteína como sistema de encapsulación, en donde, al evaluar la supervivencia del probiótico se observó que, cuando se tiene una mayor cantidad de almidón resistente, la viabilidad del probiótico se redujo y se obtuvo todavía una mayor reducción cuando el material se almacenó a 4 °C, en comparación con una temperatura de almacenamiento de 25 °C. Así mismo, en sus pruebas de microscopía de barrido láser confocal corroboraron que las bacterias se encontraban dentro de la matriz.

Por otro lado, de acuerdo con los resultados expresados en la Figura 35, a los 30 días se presenta una reducción en el conteo de las células mientras que a los 60 días esta cuenta se incrementa. Este comportamiento se relaciona a la estabilidad de los sistemas a los 30 días, que pudieran estar afectando el conteo de las células bajo las condiciones de digestión.

En este entendido, pruebas como el monitoreo de la viabilidad bajo condiciones de almacenamiento y digestión *in vitro*, la caracterización los sistemas y la cuantificación de almidón resistente en tiempos de almacenamiento prolongados, ayudarían a tener mayor certeza en estos supuestos. Por otro lado, no hay estudios en donde se evalúen las condiciones correctas para la liberación del probiótico ya que actualmente solo se reporta la liberación en citrato del sodio al 0.2% y PBS, con tiempos de agitación que van desde los 10 min hasta las 6 h y para este trabajo se estableció un tiempo de 20 min.

En la Figura 36 se muestra la predicción de la pérdida celular expresada en  $\text{Log}_{10}$  UFC/g, en donde 0) corresponde al inóculo inicial, 1) la viabilidad después del encapsulamiento (0 días de almacenamiento), 2) viabilidad en 0 días de almacenamiento en condiciones de digestión *in vitro*, 3) viabilidad a los 30 días de almacenamiento y 4) viabilidad a los 30 días de almacenamiento en condiciones de digestión *in vitro*. A partir de esta predicción, es posible identificar el sistema que brinda una mayor protección tanto en condiciones de almacenamiento y digestión *in vitro* y resulta ser el sistema gelificación conjunta GC el cual, al tener un inóculo inicial de  $12 \text{ Log}_{10}$  UFC/g, llega a tener una cantidad de  $7.19 \text{ Log}_{10}$  UFC/g, a diferencia del sistema REC que llega a tener una cantidad  $5.97 \text{ Log}_{10}$  UFC/g. Este sistema es el que tendría mayor problema al cumplir con la cantidad de  $6.19 \text{ Log}_{10}$  UFC/g que especifica la FAO y OMS.

Es importante mencionar que este estudio es de los pocos en donde se estudia la relación de las propiedades fisicoquímicas de los sistemas de encapsulación con la viabilidad en condiciones de almacenamiento y digestión *in vitro* con el protocolo INFOGEST 2.0.

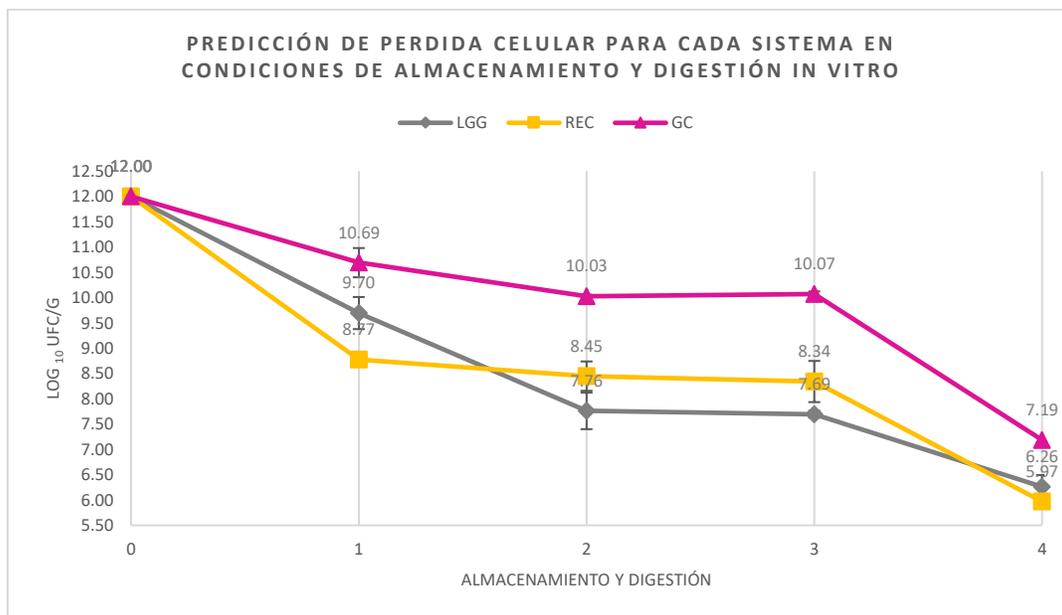


Figura 36. Predicción de la pérdida de viabilidad celular en los sistemas REC y GC en comparación con las células libre de LGG bajo condiciones de almacenamiento a 4°C y de digestión *in vitro*. 0) inóculo inicial, 1) viabilidad después del encapsulamiento (0 días de almacenamiento), 2) viabilidad en 0 días de almacenamiento en condiciones de digestión *in vitro*, 3) viabilidad a los 30 días de almacenamiento y 4) viabilidad a los 30 días de almacenamiento en condiciones de digestión *in vitro*.

## Almidón resistente

Diversos grupos de trabajo se han enfocado en el estudio de la interacción del almidón y la pectina y a pesar de tener una variación en los métodos de gelatinización del almidón y su incorporación con la pectina, todos han llegado a la misma conclusión “la presencia de pectina reduce la cantidad de amilosa y amilopectina lixiviada” en donde los mecanismos de interacción para la mezcla de almidón y pectina consisten en la fuerte interacción a través de puentes de hidrógeno entre las moléculas de pectina y amilosa/amilopectina (Chen et al., 2023; Zhang et al., 2021; Yin et al., 2021; Zheng et al., 2021; Yuliarti et al., 2021; Li et al., 2020; Xie et al., 2022).

De acuerdo con Chen et al. (2023), la pectina es adsorbida en la superficie del gránulo lo que limita la lixiviación de la amilosa por los poros del gránulo, este efecto tendrá una repercusión en la cantidad de almidón resistente que pueda formarse en el sistema.

De acuerdo con los valores obtenidos en la cuantificación de almidón resistente (% AR) y mostrados en la Tabla 18 para los sistemas de encapsulación GC y REC de los 0 a los 30 días

de almacenamiento ( $4^{\circ}\text{C}$ ), se observa que para el sistema REC a los 0 días se obtiene un valor del  $15.52 \pm 0.24$  % AR (peso total de la muestra ARet:PEC 1:1 v/v). Si se considera que en este sistema no ocurre una interacción molecular de los componentes y que la pectina funciona como recubrimiento, este valor puede compararse con el reportado por Soler et al. (2020), quienes obtuvieron un % AR del  $29.0 \pm 2.8$  para el almidón utilizando el mismo tratamiento de gelatinización. El resultado a los 0 días para el sistema REC es consistente considerando que la presencia de almidón representa el 62.5% (p/p) de la mezcla ARet:PEC y que la cuantificación de AR es del peso total de la muestra, por lo que el valor esperado es del 16 al 19 % aproximadamente mientras que para los 30 días de almacenamiento ( $4^{\circ}\text{C}$ ) del sistema REC, el valor de % AR se reduce a 13.86 . Esta reducción en el porcentaje se debe a la presencia de pectina, afectando el grado de retrogradación del almidón (Zhang et al., 2021) por lo que en el sistema REC, el contenido de AR se reduce alrededor del 1.66 % a los 30 días de almacenamiento.

Para el sistema GC se puede observar que, a los 0 días de almacenamiento, el % AR es mayor que en el sistema REC, esto coincide con los resultados obtenidos en DCS, Rayos X y FTIR-ATR, en donde se describe al sistema GC como un sistema mejor organizado, cristalino y térmicamente estable por lo que el obtener un % mayor de AR corresponde a las características del sistema. A este respecto, algunos autores también reportan una mejora en la matriz por la presencia de la pectina, por ejemplo, Chen et al. (2023) mencionan que existe un fortalecimiento del gránulo del almidón por la adhesión de las moléculas de pectina en sus superficie, limitando la lixiviación de la amilosa, lo cual puede ser responsable del incremento del %AR en el sistema con respecto a solo estar el almidón; sin embargo, en este estudio, a los 30 días hay una mayor reducción del % AR debido a la limitación en la retrogradación de las moléculas de amilosa en este sistema, por la interacción molecular que tienen con la pectina, pues se tuvo una disminución del 5 % aproximadamente.

Si se considera que la dosis recomendada de almidón resistente (AR) varía de 3 a 8 gramos diarios (Miketinas et al., 2020), se tendría que consumir alrededor de 30 gramos de los sistemas REC o GC, lo cual representa una ventaja sobre otro tipo de almidones que contienen menos del 10 % de AR. Aunado a esto se suma el efecto prebiótico de la pectina (fibra) y la entrega eficaz de los probióticos, por lo que se puede garantizar que los sistemas de encapsulación pueden aportar beneficios importantes en la salud.

Tabla 18. Contenido de almidón resistente (% AR) para los sistemas REC y GC a los 0 y 30 días de almacenamiento (4 °C)

Muestra	% AR	S
REC (0 días)	15.52 <sup>b</sup>	0.24
REC (30 días)	13.86 <sup>c</sup>	0.91
GC (0 días)	16.51 <sup>a</sup>	0.64
GC (30 días)	11.64 <sup>d</sup>	0.27

## Determinación de humedad

Los sistemas GC y REC presentan una humedad del 11.48 % para GC y 9.38 % para REC. Estos valores se pueden relacionar a la capacidad de retención de agua, en donde se entendería que GC presenta una mayor capacidad de absorción de agua que el sistema REC. La capacidad de absorción de agua es deseable y se relaciona con la capacidad de encapsulación de la matriz, por lo que nuevamente se confirma que el sistema GC presenta las mejores cualidades para generar el atrapamiento de los probióticos.

Tabla 19. Humedad (%) de los sistemas de encapsulación GC y REC sin el probiótico.

SISTEMA	% HUMEDAD	S
GC	11.48	±0.36
REC	9.38	±0.20

Aunado a esto y por la cantidad de almidón resistente presente en los sistemas, se sabe que puede obtenerse un efecto probiótico y prebiótico que genere un efecto simbiótico.

## 9. Conclusiones

La encapsulación es una técnica empleada para la protección de los probióticos en condiciones de almacenamiento y digestión *in vitro*. En este estudio fue posible describir y caracterizar dos sistemas GC y REC en donde se tuvo una pérdida de  $1.31 \pm 0.28$  y  $3.14 \pm 0.73$   $\log_{10}$  UFC/g después del proceso de secado y molienda (encapsulación). Ambos sistemas conservaron la viabilidad en condiciones de almacenamiento a 4 °C; a los 60 y 90 días se contabilizó un mayor número de células. Es la primera vez que se reporta este comportamiento y se liga a la estabilidad y a la reorganización del almidón retrogradado que podría ser favorable para el probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG. Se determinó que el mejor sistema de encapsulación es el sistema GC en la proporción 1:1. Con base en

las propiedades reológicas se estableció una mezcla en donde se conformó una red doble de hidrogel suave con un porcentaje de cristalinidad del 16.99. Por otro lado, FTIR, DSC y SEM ayudaron a describir los sistemas, la mezcla 1:1 presentaba mayor estabilidad y era apropiada para la encapsulación del probiótico. Para el sistema REC FTIR y SEM confirmaron el efecto de recubrimiento. Ambos sistemas protegieron mejor al probiótico en comparación con las células libres en condiciones gastrointestinales, con una pérdida de  $0.32 \pm 0.29 \log_{10}$  UFC/g para REC y  $0.663 \pm 0.02 \log_{10}$  UFC/g para GC a los 0 días, mientras que a los 30 días de almacenamiento ambos sistemas mostraron una mayor pérdida que las células libres. Se plantea la posibilidad de que no se tenga una liberación completa de los probióticos. Los resultados permitieron establecer un sistema de encapsulación basado en almidón resistente tipo 3 y pectina que permitió mantener la viabilidad del microorganismo probiótico.

## 10. Referencias

- AACC. (1983). *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. Minneapolis, USA. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists* (10th ed.). [https://openlibrary.org/books/OL3506332M/Approved\\_methods\\_of\\_the\\_American\\_Association\\_of\\_Cereal\\_Chemists](https://openlibrary.org/books/OL3506332M/Approved_methods_of_the_American_Association_of_Cereal_Chemists)
- Adevale, P., Yancheshmeh, M. S., & Lam, E. (2022). Starch modification for non-food, industrial applications: Market intelligence and critical review. *Carbohydrate Polymers*, 291, 119590. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2022.119590>
- Afzaal, M., Saeed, F., Arshad, M. U., Nadeem, M. T., Saeed, M., & Tufail, T. (2018). The effect of encapsulation on the stability of probiotic bacteria in ice cream and simulated gastrointestinal conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 1348–1354.
- Alavi, N., Golmakani, M.-T., & Hosseini, S. M. H. (2022). Fabrication and characterization of phycocyanin-alginate-pregelatinized corn starch composite gel beads: Effects of carriers on kinetic stability of phycocyanin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 218, 665–678. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.07.111>
- Alemzadeh, I., Hajiabbas, M., Pakzad, H., Sajadi, S., & Dehkordi, V. A. (2020). Encapsulation of food components and bioactive ingredients and targeted release. *International Journal of Engineering*, 33 (1), 1–11.
- Alfaro-Galarza, O., López-Villegas, E. O., Rivero-Perez, N., Tapia- Maruri, D., Jiménez-

- Aparicio, A. R., Palma-Rodríguez, H. M., & Vargas-Torres, A. (2020). Protective effects of the use of taro and rice starch as wall material on the viability of encapsulated *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*. *Food Science and Technology*, *117*, 108686. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108686>
- AOAC. (1999). *Moisture content*.
- Arepally, D., & Goswami, T. K. (2019). Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *Food Science and Technology*, *99*, 583–593. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.10.022>
- Ashwar, B. A., Gani, A., Gani, A., Ahmad, M., & Shah, A. (2021). Encapsulating probiotics in novel resistant starch wall material for production of rice flour extrudates. *Food Science and Technology*, *140*, 110839. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110839>
- Assifaoui, A., Chambin, O., & Cayot, P. (2011). Composition, Drug release from calcium and zinc pectinate beads: Impact of dissolution medium. *Carbohydrate Polymers*, *85*, 388–393.
- Assifaoui, A., Loupiac, C., Chambin, O., & Cayot, P. (2010). Structure of calcium and zinc pectinate films investigated by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, *345* (7), 929–933.
- Atraki, R., & Azizkhani, M. (2021). Survival of probiotic bacteria nanoencapsulated within biopolymers in a simulated gastrointestinal model. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *72*, 102750. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2021.102750>
- Bai, Y., Atluri, S., Zhang, Z., Gidley, M. J., Li, E., & Gilbert, R. G. (2021). Structural reasons for inhibitory effects of pectin on  $\alpha$ -amylase enzyme activity and in-vitro digestibility of starch. *Food Hydrocolloids*, *114*, 106581. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106581>
- Ballini, A., Scacco, S., Boccellino, M., Santacroce, L., & Arrigoni, R. (2020). Microbiota y obesidad: ¿Dónde estamos ahora? *Biología (Basilea)*, *9*(12), 415. <https://doi.org/10.3390/biología9120415>.
- Barajas-Álvarez, P., González-Ávila, M., & Espinosa-Andrews, H. (2022). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 by spray drying and its evaluation under gastrointestinal and storage conditions. *Food Science and Technology*, *153*, 112485. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112485>
- Bello-Perez, L., Flores-Silva, P., Agama-Acevedo, E., & Tovar, J. (2020). Starch digestibility: past, present, and future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(14), 5009–5016. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8955>

- Bhattacharya, S., & Bozkurt, Y. (2018). Process, Cryoprotectants and Their usage in cryopreservation. *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*, 7–19. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80477>
- Błaszczak, W., Fornal, J., Kiseleva, V. I., Yuryev, V. P., Sergeev, A. I., & Sadowska, J. (2007). Effect of high pressure on thermal, structural and osmotic properties of waxy maize and Hylon VII starch blends. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 387–396. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2006.12.023>
- Bojarczuk, A., Skąpska, S., Mousavi Khaneghah, A., & Marszałek, K. (2022). Health benefits of resistant starch: A review of the literature. *Journal of Functional Foods*, 93, 105094. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2022.105094>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Brown-Esters, O., Mc Namara, P., & Savaiano, D. (2012). Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. *International Dairy Journal*, 22(2), 98–103. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2011.09.010>
- Calabuig-Jiménez, L., Betoret, E., Betoret, N., Patrignani, F., Barrera, C., Seguí, L., Lanciotti, R., & Dalla Rosa, M. (2019). High pressures homogenization (HPH) to microencapsulate *L. salivarius* spp. *salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and *in vitro* digestion. *Journal of Food Engineering*, 240, 43–48. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2018.07.012>
- Cao, H., Sun, R., Liu, Y., Wang, X., Guan, X., Huang, K., & Zhang, Y. (2022). Appropriate microwave improved the texture properties of quinoa due to starch gelatinization from the destructed cyptomere structure. *Food Chemistry: X*, 14, 100347. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2022.100347>
- Capron, I., Robert, P., Colonna, P., Brogly, M., & Planchot, V. (2007). Starch in rubbery and glassy states by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 68(2), 249–259. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2006.12.015>
- Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2017). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>
- Chang, Q., Zheng, B., Zhang, Y., & Zeng, H. (2021). A comprehensive review of the factors influencing the formation of retrograded starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 163–173. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.07.050>

- Chen, J., Wang, Q., Liu, C. M., & Gong, J. (2019). Problems deserve attention in probiotic encapsulation: Critical review of existing literature. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 57 (6) (20), págs. 1228-1238.
- Chen, R., Williams, P. A., Chong, D., Luo, S., Chen, J., & Liu, C. (2023). The interaction of pectin with wheat starch and its influence on gelatinization and rheology. *Food Hydrocolloids*, 136, 108288. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.108288>
- Chung, W. S. F., Meijerink, M., Zeuner, B., Holck, J., Louis, P., Meyer, A. S., Wells, J. M., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2017). Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. *FEMS Microbiology Ecology*, 93–127. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix127>
- Corrado, M., Zafeiriou, P., Ahn-Jarvis, J. H., Savva, G. M., Edwards, C. H., & Hazard, B. A. (2022). Impact of storage on starch digestibility and texture of a high-amylose wheat bread. *Food Hydrocolloids*, 108139. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.108139>
- Cui, C., Jia, Y., Sun, Q., Yu, M., Ji, N., Dai, L., Wang, Y., Qin, Y., Xiong, L., & Sun, Q. (2022). Recent advances in the preparation, characterization, and food application of starch-based hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 291, 119624. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2022.119624>
- Dafe, A., Etemadi, H., Dilmaghani, A., & Mahdavinia, G. R. (2017). Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.060>
- Dangi, N., Yadav, B. S., & Yadav, R. B. (2020). Pectin and its acid hydrolysate for the modification of hydration, pasting, thermal and rheological properties of barley starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.183>
- Das, T. K., Pradhan, S., Chakrabarti, S., Mondal, K. C., & Ghosh, K. (2022). Current status of probiotic and related health benefits. *Applied Food Research*, 2(2), 100185. <https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2022.100185>
- De Araújo, N. De, Gutiérrez Ramírez, L. A., Ruiz Villadiego, S. O., & Montoya Campuzano, O. I. (2015). Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: una revisión. *Alimentos Hoy*, 23(36), 112–126.
- de Araújo Etcheparea, M., Raddatza, G. C., Moraes Flores, É. M., Queiroz Zepka, L., Jacob-Lopes, E., Smanioto Barin, J., Ferreira Grosso, C. R., & de Menezesa, C. R. (2016). Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *Food Science and Technology*, 65, 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.039>

- de Kivit, S., Tobin, M., Forsyth, C., Keshavarzian, A., & Landay, A. (2014). Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics. *Frontiers in Immunology*, *18*;5:60. <https://doi.org/doi:10.3389/fimmu.2014.00060>.
- Deka, D., & Sit, N. (2016). Dual modification of taro starch by microwave and other heat moisture treatments. *International Journal of Biological Macromolecules*, *92*, 416–422. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.07.040>
- Delphine, M. A. S., Jennifer, K. S., Glenn, R. G., & James, V. (2009). Mechanisms of Probiosis and Prebiosis: Considerations for Enhanced Functional Foods. *Current Opinion in Biotechnology*, *20* (2), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.01.002>
- Dhalleine, C., Assifaoui, A., Moulari, B., Pellequer, Y., Cayot, P., Lamprecht, A., & Chambin, O. (2014). Delivery, Zinc-pectinate beads as an in vivo self-assembling system for pulsatile drug. *International Journal of Pharmaceutics*, *404*, 28–34.
- Dindhoria, K., Kumar, S., Baliyan, N., Raphel, S., Halami, P. M., & Kumar, R. (2022). Bacillus licheniformis MCC 2514 genome sequencing and functional annotation for providing genetic evidence for probiotic gut adhesion properties and its applicability as a bio-preservative agent. *Gene*, *840*, 146744. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2022.146744>
- Dinesh, K. D., Renuka, Puniya, M., Umesh, K. S., Tejpal, D., Nikhil, K., Sanjeev, K., Puniya, A. K., & Pratyosh, S. (2017). Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: a review. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 563. <https://doi.org/10.3389/fmicb>
- Dobranowski, P., & Stintzi, A. (2021). Resistant starch, microbiome, and precision modulation. *Gut Microbes.*, *13*(1):1926. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1926842>
- Echalier, C., Valot, L., Martinez, J., Mehdi, A., & Subra, G. (2019). Chemical cross-linking methods for cell encapsulation in hydrogels. *Materials Today Communications*, *20*, 100536. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.05.012>
- El-Gibaly, I. (2002). Delivery oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug. *International Journal of Pharmaceutics*, *232*, 199–211.
- Elshahed, M. S., Miron, A., Aprotosoie, A. C., & Farag, M. A. (2021). Pectin in diet: Interactions with the human microbiome, role in gut homeostasis, and nutrient-drug interactions. *Carbohydrate Polymers*, *255*, 117388. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117388>
- Endo, A., Teräsjärvi, J., & Salminen, S. (2014). Food matrices and cell conditions influence

- survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG under heat stresses and during storage. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 110–112. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2014.01.006>
- Eswaramma, S., Sivagangi Reddyb, N., & Krishna Raoa, K. S. V. (2017). Phosphate crosslinked pectin based dual responsive hydrogel networks and nanocomposites: Development, swelling dynamics and drug release characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1162–1172. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.160>
- FAO, & OMS. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. In *Estudios FAO alimentación y nutrición* (Vol. 85, p. 52). <https://www.fao.org/3/a0512s/a0512s.pdf>
- Fasuan, T. O., & Akanbi, C. T. (2018). Application of osmotic pressure in modification of *Amaranthus viridis* starch. *Food Science and Technology*, 96, 182–192. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.05.036>
- FDA. (2009). *Guidance for Industry: Evidence-based Review System for the Scientific Evaluation of Health Claims – Final*. (pp. 3059–3060). <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-evidence-based-review-system-scientific-evaluation-health-claims>
- Feldman, M. (2015). The probiotics market in the Americas: from Canada to Chile. *Euromonitor International Network*. <https://www.probiotaamericas.com/wpcontent/uploads/2015/06/Monica-FeldmanEuromonitorProbiota-Americas.pdf>
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Laursen, R. R., & Ouwehand, A. C. (2019). Approach, The production and delivery of probiotics: A review of a practical. *Microorganisms*, 7, 83.
- Flach, J., van der Waal, M. B., van den Nieuwboer, M., Claassen, E., & Larsen, O. (2018). The underexposed role of food matrices in probiotic products: Reviewing the relationship between carrier matrices and product parameters. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 2570–2584.
- Fonseca, L. M., Halal, S. L. M. El, Dias, A. R. G., & Zavareze, E. da R. (2021). Physical modification of starch by heat-moisture treatment and annealing and their applications: A review. *Carbohydrate Polymers*, 274, 118665. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118665>
- Gabriel, A. C., Correa, M. J., & Ferrero, C. (2021). Resistant starches: a smart alternative for the development of functional breads and other starch-based foods. *Food Hydrocolloids*, 106949. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106949>

- Gangopadhyay, A., Saha, R., Bose, A., Sahoo, R. N., Nandi, S., Swain, R., Paul, M., Biswas, S., & Mohapatra, R. (2022). Effect of annealing time on the applicability of potato starch as an excipient for the fast disintegrating propranolol hydrochloride tablet. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *67*, 103002. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2021.103002>
- Garcia-Mazcorro, J. F., Barcenas-Walls, J. R., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2017). Molecular assessment of the fecal microbiota in healthy cats and dogs before and during supplementation with fructo-oligosaccharides (FOS) and inulin using high-throughput 454-pyrosequencing. *PeerJ*, *5*. <https://doi.org/10.7717/peerj.3184>
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, *17*, 259–275. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, *125*, 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Goetze, O., Fruehauf, H., Pohl, D., Giarrè, M., Rochat, F., Ornstein, K., Menne, D., Fried, M., & Thumshirn, M. (2008). Effect of a prebiotic mixture on intestinal comfort and general wellbeing in health. *British Journal of Nutrition*, *100*(5). <https://doi.org/10.1017/S0007114508960918>.
- Gombotz, W. R., & Wee, S. F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*, 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.007>
- Grimshaw, K., Logan, K., O'Donovan, S., Kiely, M., Patient, K., Bilsen, J. van, Beyer, K., Campbell, D. E., Garcia-Larsen, V., Grabenhenrich, L., Lack, G., Mills, C., Wal, J., & Roberts, G. (2017). Modifying the infant's diet to prevent food allergy. *Arch Dis Child*, *102* (2), 179–186. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2015-309770>
- Guilherme, M. R., Aouada, F. A., Fajardo, A. R., Martins, A. F., Paulino, A. T., Davi, M. F. T., Rubira, A. F., & Muniz, E. C. (2015). Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. *European Polymer Journal*, *72*, 365–385. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2015.04.017>
- Health Canada. (2009). Guidance Document – The Use of Probiotic Microorganisms in Food. In *Government of Canada* (pp. 1–8).
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G., Merenstein, D., Pot, B., Morelli, L., Canani, RBF, Flint, H., Salminen, S., Calder, P., & Sanders, M. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews*

*Gastroenterology* & *Hepatology*, 11(8), 506–514.  
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

- Hojsak, I., Abdović, S., Szajewska, H., Milosević, M., Krznarić, Z., & Kolacek., S. (2010). *Lactobacillus G.G.* en la prevención de infecciones nosocomiales gastrointestinales y del tracto Respiratorio. *Pediatrics*, 125, e1171–e1177.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111(1), 50–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.036>
- Hu, S., Kuwabara, R., Beukema, M., Ferrari, M., de Haan, B. J., Walvoort, M. T. C., de Vos, P., & Smink, A. M. (2020). Low methyl-esterified pectin protects pancreatic  $\beta$ -cells against diabetes-induced oxidative and inflammatory stress via galectin-3. *Carbohydrate Polymers*, 249, 116863. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116863>
- Hu, X., Liu, C., Zhang, H., Hossen, M. A., Sameen, D. E., Dai, J., Qin, W., Liu, Y., & Li, S. (2021). *In vitro* digestion of sodium alginate/pectin co-encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* and its application in yogurt bilayer beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193(PB), 1050–1058.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.076>
- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 175–181. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2010.03.009>
- Kadyan, S., Sharma, A., Arjmandi, B., Singh, P., & Nagpal, R. (2022). Prebiotic Potential of Dietary Beans and Pulses and Their Resistant Starch for Aging-Associated Gut and Metabolic Health. *Nutrients*, 14 (9). <https://doi.org/10.3390/nu14091726>.
- Kelly, J., Ryan, S., McKinnon, H., Romero-Gonzalez, R., Louis, P., Bosscher, D., Bonnema, A., Gratz, S., Duncan, S., Johnstone, A., Flint, H., Harrold, J., Halford, J., & Shirazi-Beechey, S. (2015). Dietary supplementation with a type 3 resistant starch induces butyrate producing bacteria within the gut microbiota of human volunteers. *Appetite*, 91, 438.  
<https://doi.org/10.1016/J.APPET.2015.04.038>
- Kerlikowsky, F., Greupner, T., Müller, M., Mazo, J. E., Müller, H.-J., & Hahn, A. (2021). Probiotic formulation influences blood cholesterol levels: a randomized, controlled trial during the covid19 pandemic. *Clinical Nutrition ESPEN*, 46, S664–S665.  
<https://doi.org/10.1016/J.CLNESP.2021.09.345>
- Khangwal, I., & Shukla, P. (2019). Prospecting for prebiotics, innovative evaluation methods and their health applications: a review. *3 Biotech*, 9(85), 187.  
<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1716-6>

- Kim, H. S., Hwang, D. K., Kim, B. Y., & Baik, M. Y. (2012). Cross-linking of corn starch with phosphorus oxychloride under ultra high pressure. *Food Chemistry*, *130*(4), 977–980. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.07.104>
- Kim, S., Joung, J. Y., Kang, D., Oh, N. S., & Yoon, Y. (2021). Anti-obesity effects of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15, and its synergy with hydrolysed lactose skim milk powder. *International Dairy Journal*, *123*, 104997. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2021.104997>
- Kumar, A., & Kumar, D. (2015). Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. *Anaerobe*, *33*, 117–123. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2015.03.004>
- Kumar, B. V., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products – A Review. *Journal of Food Science and Technology*, *52* (10), 6112–6124. <https://doi.org/10.1007/S13197-015-1795-2> 52:10
- Kumar, M., Tomar, M., Saurabh, V., Mahajan, T., Punia, S., Contreras, M. del M., Rudra, S. G., Kaur, C., & Kennedy, J. F. (2020). Emerging trends in pectin extraction and its anti-microbial functionalization using natural bioactives for application in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, *105*, 223–237. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.09.009>
- Larsen, N., Cahú, T. B., Isay Saad, S. M., Blennow, A., & Jespersen, L. (2018). The effect of pectins on survival of probiotic *Lactobacillus spp.* in gastrointestinal juices is related to their structure and physical properties. *Food Microbiology*, *74*, 11–20. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.02.015>
- Lawson J. (2022). *Mercado global de Ingredientes Probióticos Análisis 2022-2029 Examinado En Un Nuevo Informe De Investigación De La Industria*. Slpnews. <https://www.slpnewsmx.com/ingredientes-probioticos-alcance-del-mercado-glo>
- Lee, Y. K., Margolles, A., & Mayo, B. (2009). *Microorganisms, Probiotic* (S. S. Y.K. Lee (ed.); Primera). <https://doi.org/10.1002/9780470432624.ch1>
- Leeman, A., Bårström, L., & Björck, I. (2005). *In vitro* availability of starch in heat-treated potatoes as related to genotype weight and storage time. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*, 751–756.
- Leong, S. Y., Roberts, R., Hu, Z., Bremer, P., Silcock, P., Toepfl, S., & Oey, I. (2022). Texture and *in vitro* starch digestion kinetics of French fries produced from potatoes (*Solanum tuberosum* L.) pre-treated with pulsed electric fields. *Applied Food Research*, *2*(2), 100194. <https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2022.100194>
- Li, E., Yang, X., & Li, C. (2022a). Combined effects of starch fine molecular structures and

- storage temperatures on long-term rice amylopectin retrogradation property. *International Journal of Biological Macromolecules*, 201, 458–467. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.01.092>
- Li, H., Dhital, S., Flanagan, B. M., Mata, J., Gilbert, E. P., Gilbert, R. G., & Gidley, M. J. (2022b). Amorphous packing of amylose and elongated branches linked to the enzymatic resistance of high-amylose wheat starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 295, 119871. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2022.119871>
- Li, R., Zhang, Y., Polk, D. B., Tomasula, P. M., Yan, F., & Liu, L. S. (2016). Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus GG* *in vitro* and *in vivo* by a new encapsulation system. *Journal of Controlled Release*, 230, 79–87. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.04.009>
- Li, W., Zhang, W., Gong, S., Gu, X., Yu, Y., Wu, J., & Wang, Z. (2020). Low and high methoxyl pectin lowers on structural change and digestibility of fried potato starch. *Food Science and Technology*, 132, 109853. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109853>
- Lilly, D., & Stillwell, R. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.
- Lim, L.-T., Mendes, A. C., & Chronakis, I. S. (2019). Electrospinning and electrospraying technologies for food applications. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 88). <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.005>
- Limpongsa, E., Soe, M. T., & Jaipakdee, N. (2021). Modification of release and penetration behavior of water-soluble active ingredient from ball-milled glutinous starch matrix via carboxymethylcellulose blending. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2271–2280. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.11.059>
- Linares, D. M., Ross, P., & Stanton, C. (2016). Gut, Beneficial Microbes: The pharmacy in the gut. *Bioengineered*, 7 (No 1), 11–20.
- Lisboa, F., Andrade, J. C., & Oliveira, M. B. (2009). Encapsulation of probiotic for food application – a Review. *New Biotechnology*, Volume 25(1871–6784), S186. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.737>
- Liu, H., Cui, S. W., Chen, M., Li, Y., Liang, R., Xu, F., & Zhong, F. (2019). Protective approaches and mechanisms of microencapsulation for the survival of probiotic bacteria during processing, storage, and gastrointestinal digestion: A review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 59 (17), págs. 2863-2878.
- Lu, H., Ma, R., Chang, R., & Tian, Y. (2021). Evaluation of starch retrogradation by infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 120, 106975. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.106975>

- Lu, H., Tian, Y., & Ma, R. (2023). Assessment of order of helical structures of retrograded starch by Raman spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, *134*, 108064. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.108064>
- Ma, T., Jin, H., Kwok, L. Y., Sun, Z., Liong, M. T., & Zhang, H. (2021). Probiotic consumption relieved human stress and anxiety symptoms possibly via modulating the neuroactive potential of the gut microbiota. *Neurobiology of Stress*, *14*, 100294. <https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2021.100294>
- Macías-Cortés, E., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., Moreno-Jiménez, M. R., Medina-Torres, L., & González-Laredo, R. F. (2020). Microencapsulation of phenolic compounds: Technologies and novel polymers. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, *19*(2), 491–521. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim642>
- Madsen, L., Stanley, S., Swann, P., & Oswald, J. (2017). A survey of commercially available Isomaltooligosaccharide-based food ingredients. *Journal of Food Science*, *82*, 401–408. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13623>
- Maity, C., & Gupta, A. K. (2021). Therapeutic efficacy of probiotic *Alkalihalobacillus clausii* 088AE in antibiotic-associated diarrhea: A randomized controlled trial. *Heliyon*, *7*(9). <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2021.E07993>
- Malik, J. K., Ahmad, A. H., Kalpana, S., Prakash, A., & Gupta, R. C. (2016). Synbiotics: Safety and Toxicity Considerations. In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00057-7>
- Mantegazza, C., Molinari, P., D’Auria, E., Sonnino, M., Morelli, L., & Zuccotti, G. V. (2018). Probiotics and antibiotic-associated diarrhea in children: A review and new evidence on *Lactobacillus rhamnosus* GG during and after antibiotic treatment. *Pharmacological Research*, *128*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2017.08.001>
- Market Research. (2020). Probiotic supplements market - global outlook and forecast 2020–2025. *Asesoría e Inteligencia de Arizton*. <https://www.marketresearch.com/Arizton-v4150/Probiotic-Supplements-Global-Outlook-Forecast-13297891/>.
- Martín-Ortiz, A., Barile, D., Salcedo, J., Moreno, F. J., Clemente, A., Ruiz-Matute, A. I., & Sanz, M. L. (2017). Changes in caprine milk oligosaccharides at different lactation stages analyzed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 3523–3531. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05104>
- Mei, J. Q., Zhou, D. N., Jin, Z. Y., Xu, X. M., & Chen, H. Q. (2015). Effects of citric acid esterification on digestibility, structural and physicochemical properties of cassava starch. *Food Chemistry*, *187*, 378–384. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.04.076>

- Mendes, A. C., & Chronakis, I. S. (2021). Electrohydrodynamic encapsulation of probiotics: A review. *Food Hydrocolloids*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106688>
- Menees, S., & Chey, W. (2018). The gut microbiome and irritable bowel syndrome. *F1000Res*, 7, 1029. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14592.1>
- Metchnikoff, E. (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: The prolongation of life: Optimistic studies. In P. Chalmers Mitchell (Ed.), *London: W. Heinemann*. <https://wellcomecollection.org/works/a5439955>
- Meybodi, N. M., Mortazavian, A. M., Arab, M., & Nematollahi, A. (2020). Probiotic viability in yoghurt: A review of influential factors. *International Dairy Journal*, 109, 104793. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2020.104793>
- Meybodi, N., & Mortazavian, A. (2017). Probiotic supplements and food products: a comparative approach. *Biochem Pharmacol.*, 6: 2. <https://doi.org/doi:10.4172/2167-0501.1000227>.
- Miketinas, D. C., Shankar, K., Maiya, M., & Patterson, M. A. (2020). Usual dietary intake of resistant starch in US adults from NHANES 2015–201. *The Journal of Nutrition*, 150 (10), 2738–2747. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa232>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Maclerzanka, A., MacKie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Misra, S., Pandey, P., & Mishra, H. N. (2021). Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 109, 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.039>
- Moayyedi, M., Eskandari, M. H., Rad, A. H. E., Ziaee, E., Khodaparast, M. H. H., & Golmakani, M. T. (2018). Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Functional Foods*, 40, 391–399. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.11.016>
- Mokhtari, S., Jafari, S. M., Khomeiri, M., Maghsoudlou, Y., & Ghorbani, M. (2017a). The cell wall compound of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel wall material for encapsulation of probiotics. *Food Research International*, 96, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.014>
- Mokhtari, S., Jomeiri, M., Jafari, S. M., Maghsoudlou, Y., & Ghorbani, M. (2017b). Descriptive

analysis of bacterial profile, physicochemical and sensory characteristics of grape juice containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall-coated probiotic microcapsules during storage. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología de Los Alimentos*. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13370>

Mordor-Intelligence. (2020). Industrial starches market – Growth, trends and forecast (2020-2025). In *GLOBE NEWSWIRE* (pp. 81–83). <https://www.researchandmarkets.com/reports/5157054/industrial-starch-market-forecast-2020-2025>

Mortazavian, A., Ehsani, M., Mousavi, S., Rezaei, K., Sohrabvandi, S., & Reinheimer, J. (2007). Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in Yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, *60*, 123–127.

Mudgil, D., Barak, S., Patel, A., & Shah, N. (2018). Partially hydrolyzed guar gum as a potential prebiotic source. *International Journal of Biological Macromolecules*, *112*, 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.164>.

Naissinger da Silva, M., Tagliapietra, B. L., Flores, V. do A., & Pereira dos Santos Richards, N. S. (2021). *In vitro* test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. *Current Research in Food Science*, *4*, 320–325. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.006>

Nasir, M., Ahmad, S., Usman, M., Farooq, U., Naz, A., Murtaza, M. A., Shehzad, Q., Mehmood, A., & Mueen ud din, G. (2021). Influence of pregelatinized starch on rheology of composite flour, *in vitro* enzyme digestibility and textural properties of millet-based Chapatti. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, *2*, 100108. <https://doi.org/10.1016/J.CARPTA.2021.100108>

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A., & Orlando, P. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, *1*(3), 319–323. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2009.02.001>

Ningtyas, D. W., Bhandari, B., Bansal, N., & Prakash, S. (2019). The viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (non-encapsulated and encapsulated) in functional reduced-fat cream cheese and its textural properties during storage. *Food Control*, *100*, 8–16. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.12.048>

Pedroso, D. L., Dogenski, M., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Microencapsulación de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* y *Lactobacillus acidophilus* en manteca de cacao utilizando tecnología de enfriamiento por pulverización. *Revista Brasileira de Microbiología*, *44* (3), 777–783.

Pinto, S. S., Fritzen-Freire, C. B., Benedetti, S., Murakami, F. S. C., Petrus, J. C., Prudêncio, E.

- S., & Amboni, R. D. M. C. (2015). Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium-BB-12* microencapsulated by spray drying. *Food Research International*, 400–408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.038>
- Pitino, I., Randazzo, C. L., Mandalari, G., Lo Curto, A., Faulks, R. M., Le Marc, Y., Bisignano, C., Caggia, C., & Wickham, M. S. J. (2010). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiology*, 27(8), 1121–1127. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.07.019>
- Qi, X., Simsek, S., Chen, B., & Rao, J. (2020). Alginate-based double-network hydrogel improves the viability of encapsulated probiotics during simulated sequential gastrointestinal digestion: Effect of biopolymer type and concentrations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 1675–1685. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.028>
- Rabek, J. F. (1980). *Experimental Methods in Polymer Chemistry: Applications of Wide-Angle X-Ray Diffraction (WAXD) to the Study of the Structure of Polymers*. In Chichester: Wiley Interscience.
- Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). An overview of the encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76–83.
- Razavi, S., Janfaza, S., Tasnim, N., Gibson, D. L., & Hoorfar, M. (2021). Microencapsulating Polymers for Probiotics Delivery Systems: Preparation, Characterization, and Applications. *Food Hydrocolloids*, 120, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106882>
- Reale, A., Di Renzo, T., Rossi, F., Zotta, T., Iacumin, L., Preziuso, M., Parente, E., Sorrentino, E., & Coppola, R. (2015). Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *Food Science and Technology*, 60(2), 721–728. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.10.022>
- Reid, G., Cook, R. L., & Bruce, A. W. (1987). Examination of *Lactobacillus* strains for properties that may influence bacterial interference in the Urinary tract. *J. Urol.*, 138, 330–335.
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review. *Food Research International*, 137, 109682. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>
- Romero-Gonzalez, R., Fyfe, C. ., McKinnon, H. E. M., Duncan, S. H., Gratz, S., Halford, J. C.,

- Harrold, J. A., Bosscher, D., Bonnema, A., Horgan, G., Flint, H. J., & Johnstone, A. M. (2015). Resistant starch type 3. Effect on body weight, body composition and appetite. *Appetite*, *91*, 436. <https://doi.org/10.1016/J.APPET.2015.04.033>
- Sahhaf, E. F., Homayouni, R. A., Mosen, M., Abbasalizadeh, F., Tabrizi, A., & Khalili, L. (2019). Effect of *L. acidophilus* and *B. lactis* on blood glucose in women with gestational diabetes mellitus: a randomized placebo-controlled trial. *Diabetol Metab Syndr.*, *11*. <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0471-5>.
- Sanborn, V. E., Azcarate-Peril, M. A., & Gunstad, J. (2020). *Lactobacillus rhamnosus GG* and *HbA1c* in middle age and older adults without type 2 diabetes mellitus: A preliminary randomized study. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, *14*(5), 907–909. <https://doi.org/10.1016/J.DSX.2020.05.034>
- Sánchez-Guillén, J. L. (2016). *Hialopasmas* (p. 9). <https://docplayer.es/22592525-J-l-sanchez-guillen-ies-pando-oviedo-departamento-de-biologia-y-geologia-1.html>
- Santos, D. X., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Bedani, R., Saad, S. M. I., & Perego, P. (2019). Improved probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in a mousse containing *Lactobacillus acidophilus La-5* microencapsulated with inulin by spray drying. *Food Science and Technology*, *99*, 404–410.
- Santos, E., Andrade, R., & Gouveia, E. (2017). Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. *Food Bioscience*, *20*, 56–61. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2017.08.005>
- Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(2), 344–371. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>
- Sasaki, T., Yasui, T., Matsuki, J., & Satake, T. (2002). Comparison of physical properties of wheat starch gels with different amylose content. *Cereal Chemistry*, *79* (6), 861–866.
- Sazawal, S., Dhingra, U., Hiremath, G., Sarkar, A., Dhingra, P., Dutta, A., Verma, P., Menon, V. P., & Black, R. E. (2010). Prebiotic and probiotic fortified milk in prevention of morbidities among children: Community-based, randomized, double-blind, controlled trial. *PLoS ONE*, *5*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012164>
- Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*, *43*(1), 193–202.
- Sevenou, O., Hill, S. E., Farhat, I. A., & Mitchell, J. R. (2002). Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, *31*(1–3), 79–85. <https://doi.org/10.1016/S0141->

- Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocolloids*, *21*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2006.02.006>
- Sireswar, S., Dey, G., & Biswas, S. (2021). Influence of fruit-based beverages on efficacy of *Lactocaseibacillus rhamnosus GG* (*Lactobacillus rhamnosus GG*) against DSS-induced intestinal inflammation. *Food Research International*, *149*, 110661. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110661>
- Skonieczna-Żydeck, K., Kaźmierczak-Siedlecka, K., Kaczmarczyk, M., Śliwa-Dominiak, J., Maciejewska, D., Janda, K., Stachowska, E., Łoniewska, B., Malinowski, D., & Borecki, K. (2020). The effect of probiotics and synbiotics on risk factors associated with cardiometabolic diseases in healthy people—a systematic review and meta-analysis with meta-regression of randomized controlled. *J. Clin. Med.*, *9*, 1788.
- Slykerman, R. F., Hood, F., Wickens, K., Thompson, J. M. D., Barthow, C., Murphy, R., Kang, J., Rowden, J., Stone, P., Crane, J., Stanley, T., Abels, P., Purdie, G., Maude, R., & Mitchell, E. A. (2017). Effect of *Lactobacillus rhamnosus HN001* in Pregnancy on Postpartum Symptoms of Depression and Anxiety: A Randomised Double-blind Placebo-controlled Trial. *EBioMedicine*, *24*, 159–165. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2017.09.013>
- Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, *8*, 71–78.
- Snelson, M., Kellow, N., & Coughlan, MT. (2019). Modulation of the Gut Microbiota by Resistant Starch as a Treatment of Chronic Kidney Diseases: Evidence of Efficacy and Mechanistic Insights. *Adv Nutr.*, *10*(2):303-. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy068>
- Soler, A., Velazquez, G., Velazquez-Castillo, R., Morales-Sanchez, E., Osorio-Diaz, P., & Mendez-Montealvo, G. (2020). Retrogradation of autoclaved corn starches: Effect of water content on the resistant starch formation and structure. *Carbohydrate Research*, *497*, 108137. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108137>
- Subhedar, A., Bhaduria, S., Ahankari, S., & Kargarzadeh, H. (2021). Nanocellulose in biomedical and biosensing applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *166*, 587–600. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.088>
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal*

of *Food Microbiology*, 62(1–2), 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00380-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00380-9)

- Sun, X., Saleh, A. S. M., Lu, Y., Sun, Z., Zhang, X., Ge, X., Shen, H., Yu, X., & Li, W. (2022). Effects of ultra-high pressure combined with cold plasma on structural, physicochemical, and digestive properties of proso millet starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 212, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2022.05.128>
- Ta, L. P., Bujna, E., Antal, O., Ladányi, M., Juhász, R., Szécsi, A., Kun, S., Sudheer, S., Gupta, V. K., & Nguyen, Q. D. (2021). Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1136–1144. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.170>
- Takeda, C., Takeda, Y., & Hizukuri, S. (1989). Structure of amylo maize amylase. *Cereal Chemistry*, 66, 5–22.
- Tarifa, M. C., Piqueras, C. M., Genovese, D. B., & Brugnoli, L. I. (2021). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* in pectin and pectin-inulin microgel particles: Effect on bacterial survival under storage conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 179, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.038>
- That, L. F. M. L. N., Xu, B., & Pandohee, J. (2022). Could foodomics hold the key to unlocking the role of prebiotics in gut microbiota and immunity? *Current Opinion in Food Science*, 100920. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2022.100920>
- Thompson, M. S., Hui Yan, T., Saari, N., & Sarbini, S. R. (2022). A review: Resistant starch, a promising prebiotic for obesity and weight management. *Food Bioscience*, 50, 101965. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101965>
- Tissier, H. (1906). Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *CR.Soc Biol*, 60, 359-361.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2015). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241.
- Tyutkov, N., Zhernyakova, A., Birchenko, A., Eminova, E., Nadtochii, L., & Baranenko, D. (2022). Probiotics viability in frozen food products. *Food Bioscience*, 50, 101996. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101996>
- Valero-Cases, E., & Frutos, M. J. (2015). Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and *in vitro* digestion.

*Food Science and Technology*, 64(2), 824–828.  
<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.06.049>

- Vesterlund, S., Salminen, K., & Salminen, S. (2012). Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 319–321. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2012.05.016>
- Wan, S., Liu, Q., Yang, D., Guo, P., Gao, Y., Mo, R., & Zhang, Y. (2022). Characterization of high amylose corn starch-cinnamaldehyde inclusion films for food packaging. *Food Chemistry*, 134219. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.134219>
- Wang, L., Song, M., Zhao, Z., Chen, X., Cai, J., Cao, Y., & Xiao, J. (2020). *Lactobacillus acidophilus* loaded double pickering emulsion with higher viability and colon adhesion efficiency. *LWT-Food Science and Technology*, 108928.
- Wang, L., Wang, M., Zhou, Y., Wu, Y., & Ouyang, J. (2022). Influence of ultrasound and microwave treatments on the structural and thermal properties of normal maize starch and potato starch: A comparative study. *Food Chemistry*, 377, 131990. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131990>
- Wang, M., Sun, M., Zhang, Y., Chen, Y., Wu, Y., & Ouyang, J. (2019). Effect of microwave irradiation-retrogradation treatment on the digestive and physicochemical properties of starches with different crystallinity. *Food Chemistry*, 298, 125015.
- Wang, S. J., Blazek, J., Gilbert, E. P., & Copeland, L. (2012). New insights into the mechanism of acid degradation of pea starch. *Carbohydr. Polym.*, 87(10.1016/j.carbpol.2011.09.093), 1941–1949.
- Warren, F. J., Gidley, M. J., & Flanagan, B. M. (2016). Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure—a joint FTIR–ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydrate Polymers*, 139, 35–42. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.11.066>
- Wilson, R. H., Kalichevsky, M. T., Ring, S. G., & Belton, P. S. (1987). A fourier-transform infrared study of the gelation and retrogradation of waxy-maize starch. *Carbohydrate Research*, 166(1), 162–165. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(87\)80053-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(87)80053-8)
- Wu, B. cheng, & McClements, D. J. (2015). Functional hydrogel microspheres: Parameters affecting electrostatic assembly of biopolymer particles fabricated from gelatin and pectin. *Food Research International*, 72, 231–240. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.02.028>
- Xie, F., Gu, B. J., Saunders, S. R., & Ganjyal, G. M. (2021). High methoxyl pectin enhances the expansion characteristics of the cornstarch relative to the low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 110, 106131. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2020.106131>

- Xie, F., Ren, X., Wu, H., Zhang, H., Wu, Y., Song, Z., & Ai, L. (2022). Pectins of different resources influences cold storage properties of corn starch gels: Structure-property relationships. *Food Hydrocolloids*, *124*, 107287. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.107287>
- Xu, E., Campanella, O. H., Ye, X., Jin, Z., Liu, D., & BeMiller, J. N. (2020). Advances in conversion of natural biopolymers: A reactive extrusion (REX)–enzyme-combined strategy for starch/protein-based food processing. *Trends in Food Science & Technology*, *99*, 167–180. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.02.018>
- Yang, S., Dhital, S., Shan, C. S., Zhang, M. N., & Chen, Z. G. (2021). Ordered structural changes of retrograded starch gel over long-term storage in wet starch noodles. *Carbohydrate Polymers*, *270*, 118367. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118367>
- Yang, Z., McClements, D. J., Li, C., Sang, S., Chen, L., Long, J., Qiu, C., & Jin, Z. (2023). Targeted delivery of hydrogels in human gastrointestinal tract: A review. *Food Hydrocolloids*, *134*, 108013. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.108013>
- Yener, S., Akbulut, K. G., Karakuş, R., Erdoğan, D., & Acartürk, F. (2022). Development of melatonin loaded pectin nanoparticles for the treatment of inflammatory bowel disease: *In vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *67*, 102861. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2021.102861>
- Yin, X., Zheng, Y., Kong, X., Cao, S., Chen, S., Liu, D., Ye, X., & Tian, J. (2021). RG- I pectin affects the physicochemical properties and digestibility of potato starch. *Food Hydrocolloids*, *117*, 106687. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.106687>
- Ying, D. Y., Schwander, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C., & Augustin, M. A. (2013). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods*, *5*(1), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.08.009>
- Yoha, K. S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2020). Effect of encapsulation methods on the physicochemical properties and the stability of *Lactobacillus plantarum* (NCIM 2083) in synbiotic powders and *in-vitro* digestion conditions. *Journal of Food Engineering*, *283*, 110033. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2020.110033>
- Yoshimoto, Y., Takeda, Y., & Takenouchi, T. (2002). Molecular structure and some physicochemical properties of waxy and low-amylose barley starches. *Polymers Carbohydrate*, *47*, 159–167.
- You, H., Liang, C., Zhang, O., Xu, H., Xu, L., Chen, Y., & Xiang, X. (2022). Variation of resistant starch content in different processing types and their starch granules properties in rice. *Carbohydrate Polymers*, *276*, 118742. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118742>

- Yu, Y., Wang, Y. nan, Ding, W., Zhou, J., & Shi, B. (2017). Preparation of highly-oxidized starch using hydrogen peroxide and its application as a novel ligand for zirconium tanning of leather. *Carbohydrate Polymers*, 174, 823–829. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.06.114>
- Yuliarti, O., Gusti, E., Chiang, J. H., Teo, P. X., & Ng, J. Y. (2021). Rheological and microstructural properties of native cassava starch-low methoxyl pectin in a fruit filling gel system. *Food Science and Technology*, 146. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111568>
- Zeng, X., Zheng, B., Li, T., & Chen, L. (2022). How to synchronously slow down starch digestion and retrogradation: A structural analysis study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 212, 43–53. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.05.099>
- Zhang, B., Bai, B., Pan, Y., Li, X. M., Cheng, J. S., & Chen, H. Q. (2018). Effects of pectin with different molecular weight on gelatinization behavior, textural properties, retrogradation and *in vitro* digestibility of corn starch. *Food Chemistry*, 264, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.011>
- Zhang, J., Zhu, X. F., Lu, F., Yang, Z., Tao, H., Xu, Y., & Wang, H. L. (2022a). Physical modification of waxy maize starch: Combining SDS and freezing/thawing treatments to modify starch structure and functionality. *Food Structure*, 32, 100263. <https://doi.org/10.1016/J.FOOSTR.2022.100263>
- Zhang, Y., Junejo, S. A., Zhang, B., Fu, X., & Huang, Q. (2022b). Multi-scale structures and physicochemical properties of waxy starches from different botanical origins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 220, 692–702. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.08.133>
- Zhang, Y., Lin, J., & Zhong, Q. (2015). The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International*, 71, 9–15. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.02.017>
- Zhang, Y., Zhao, X., Bao, X., Xiao, J., & Liu, H. (2021). Effects of pectin and heat-moisture treatment on structural characteristics and physicochemical properties of corn starch. *Food Hydrocolloids*, 117, 106664. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106664>
- Zheng, J., Wang, N., Huang, S., Kan, J., & Zhang, F. (2021). *In vitro* digestion and structural properties of rice starch modified by high methoxyl pectin and dynamic high-pressure microfluidization. *Carbohydrate Polymers*, 274, 118649. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118649>

Zhou, D., Ma, Z., Yin, X., Hu, X., & Boye, J. I. (2019). Structural characteristics and physicochemical properties of field pea starch modified by physical, enzymatic, and acid treatments. *Food Hydrocolloids*, *93*, 386–394. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2019.02.048>

Zhou, M., Hu, Q., Wang, T., Xue, J., & Luo, Y. (2018). Alginate hydrogel beads as a carrier of low density lipoprotein/pectin nanogels for potential oral delivery applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *120*, 859–864. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.135>

## 11. Anexo 1

A continuación, se presenta la cinéticas de crecimiento de *Lacticasei bacillus rhamnosus GG*, la cual se llevó a una temperatura de 37°C y 40°C con el propósito de saber si la temperatura de secado tenía un efecto importante en la supervivencia del microorganismo y se encontró que no había un efecto negativo en la supervivencia del probiótico, además la cinética mostro en que tiempo el cultivo se encontraba en fase estacionaria, la cual es de interés para llevar al microencapsulado, el uso del cultivo en esta fase de crecimiento se debe a que se considera que en fase exponencial podía tener un efecto en los resultados, así se estableció un tiempo de incubación de 30 a 36 horas para tomar el inóculo inicial.

De acuerdo con la información mostrada en la Figura 28, se definen las condiciones de incubación para la obtención de inóculos. *Lacticaseibacillus rhamnosus GG*: Medio MRS pH 6.2, temperatura de incubación 37 °C, tiempo de incubación 30-36 h.

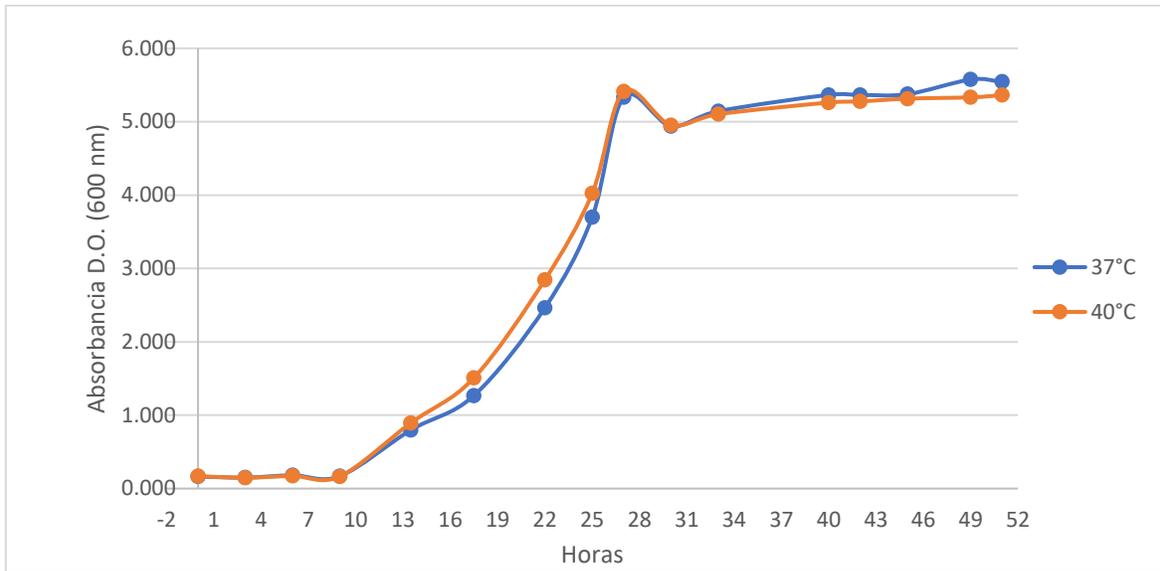


Figura 28. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* GG