

Condiciones gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados

A. R. Juárez-Roldán* y M. T. Jiménez-Munguía

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla.

Ex hacienda Sta. Catarina Mártir S/N, San Andrés, Cholula, Puebla. C.P. 72810. México.

RESUMEN

Los probióticos son bacterias benéficas para el hombre debido a los múltiples beneficios que aportan al consumidor. Se encapsulan para protegerlas de diferentes factores durante la elaboración, almacenamiento o transporte de los productos alimenticios, así como de las condiciones adversas del tracto digestivo. De esta manera, resulta importante comprobar la liberación y viabilidad de los probióticos encapsulados después de su paso por el tracto gastrointestinal. En este artículo de revisión se abordaron las condiciones gastrointestinales modelo, para evaluar la supervivencia de los probióticos encapsulados. La aplicación del modelo dinámico es mejor que el modelo convencional ya que presenta mayor similitud al tracto digestivo del humano.

Palabras clave: probióticos, encapsulación, modelos gastrointestinales.

ABSTRACT

The probiotics are beneficial bacteria for human due to health benefits. These are encapsulated to protect them from different factors during processing, storage and transportation of foodstuff besides the adverse conditions of the digestive pathway. Thus, it is important to verify the release and viability of encapsulated probiotics after the gastrointestinal pathway. In this review it will be presented the gastrointestinal model conditions, to evaluate the survival of encapsulated probiotics. The application of the dynamic model is better than the conventional model because it is similar to the human gastrointestinal tract.

Keywords: probiotics, encapsulation, gastrointestinal models.

* Programa de Maestría
en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126
Fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica:
alma.juarezrn@udlap.mx

Introducción

Los probióticos son bacterias que aportan diversos beneficios al ser humano, como prevención de enfermedades gastrointestinales, disminución de la intolerancia a la lactosa, estimulación del sistema inmune, entre otros, siendo su sitio de acción, específicamente, el intestino. Estos beneficios son atribuidos a la producción de ácido, bacteriocinas, competencia con bacterias patógenas y mejoras en el sistema inmune (Krasaekoopt, Bhandari, y Deeth, 2004). Para que ejerzan efectos benéficos en la salud, se requiere que estén presentes en el producto, en el momento de su consumo, en un nivel de al menos 10^7 UFC por gramo o mililitro de alimento (Özer, Uzun y Kirmaci, 2008; Ding y Shah, 2007; Nejati, Gheisari y Hosse, 2011).

Las bacterias que tienen actividad probiótica reportada son las pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2002), ya que cumplen con criterios de seguridad, estabilidad y funcionalidad. Estos géneros de bacterias presentan viabilidad en productos alimenticios debido a su resistencia ante la acidez (Gbassi y Vandamme, 2012).

La encapsulación de los probióticos a través de diversas técnicas como gelificación, secado por atomización o emulsión, puede mejorar la supervivencia de dichas bacterias, ya que a través de esta técnica se protegen de condiciones adversas, tanto de producción y almacenamiento de productos alimenticios como relacionada con el paso a través del tracto

gastrointestinal. Después del proceso de encapsulación, es importante comprobar la liberación y viabilidad de los probióticos en modelos experimentales que simulen las condiciones gastrointestinales, tanto en medios ácidos como en presencia de enzimas (Gbassi y Vandamme, 2012).

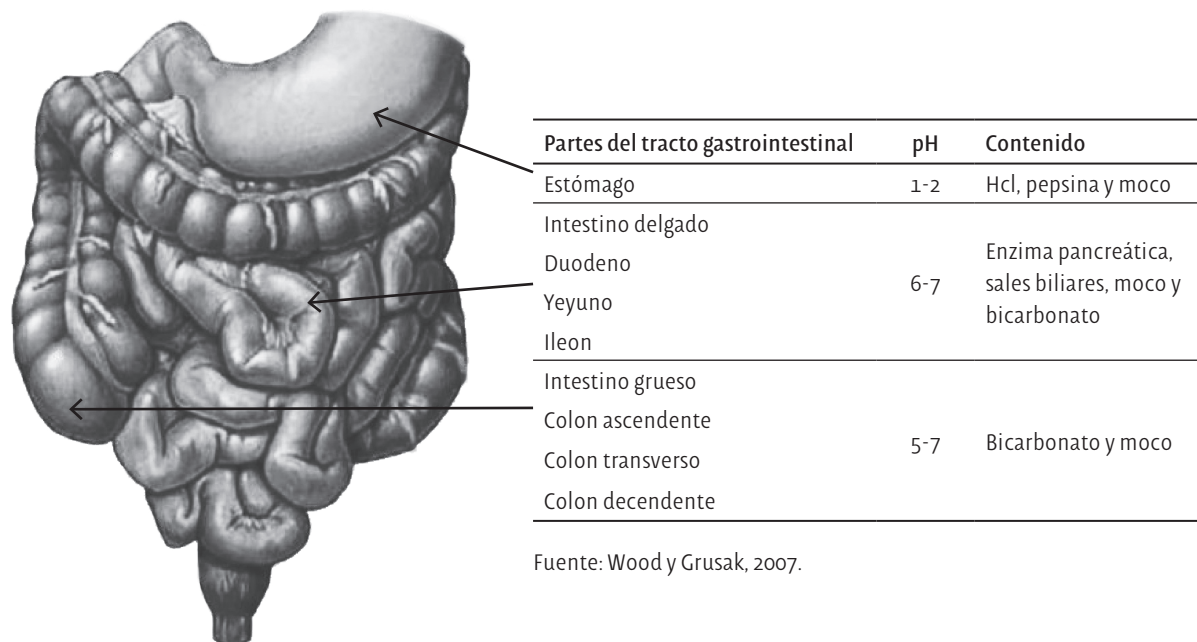
En este artículo se abordarán las condiciones gastrointestinales modelo, que simulan el tracto gastrointestinal, para evaluar la supervivencia de los probióticos encapsulados.

Revisión bibliográfica

1. Modelos gastrointestinales

El tracto gastrointestinal (TGI) está integrado por las siguientes partes: boca, faringe, esófago, estómago, intestinos delgado y grueso, recto y ano, las cuales se presentan en la Fig. 1. El intestino delgado está compuesto por el duodeno, yeyuno e íleon y el intestino grueso está formado por el colon ascendente, colon transverso y colon descendente (Mataix-Verdú, 2009; Prakash, Tomaro-Duchesneau, Saha y Cantor, 2011).

Es importante mencionar la composición principal de las secreciones gástrica, intestinal, biliar y pancreática del TGI. La primera está constituida principalmente de HCl, pepsina (la cual se activa a un pH óptimo de 3) y electrolitos como K^+ , Na^+ , Mg^{++} , fosfato (PO_4^{3-}) y sulfato (SO_4^{2-}). La segunda está integrada por HCO_3^- y K^+ . La tercera secreción está constituida por Na^+ ,



Fuente: Wood y Grusak, 2007.

Fig. 1. Partes del tracto gastrointestinal, pH y contenido (Adaptado de Prakash et al., 2011)

K^+ , Cl^- , HCO_3^- y bilis (la cual está integrada por ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol). Por último, la secreción pancreática está compuesta mayoritariamente por Na^+ y HCO_3^- , aunque también en una cantidad mínima por K^+ y Cl^- , además de enzimas como tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas, proelastasas y lipasas (Mataix-Verdú, 2009).

Para poder valorar la liberación, viabilidad y resistencia de los probióticos encapsulados se han propuesto modelos gastrointestinales que simulan las condiciones del TGI, los cuales se clasifican en modelo convencional y modelos dinámicos. Estos últimos, se diferencian del primero por ser continuos.

1.1. Modelo convencional

El modelo convencional simula las condiciones del estómago o intestino, de manera independiente, y consiste de un sólo reactor o recipiente de vidrio con agitación y temperatura ($37^\circ C$) (Gbassi y Vandamme, 2012). Se le denomina convencional debido a que la gran mayoría de las investigaciones de resistencia de probióticos encapsulados lo utilizan e incluso es definido por la United States Pharmacopeial Convention (1989).

De manera más amplia, el modelo consiste en simular las condiciones de la digestión dividiéndola en tres fases, las cuales son la gástrica, entérica y entérica final.

En la primera fase, el medio que más se utiliza es NaCl (2 a 5 g/L), para tener un medio isotónico y así mantener la integridad y viabilidad de los microorganismos. Además de mantener un pH del fluido gástrico de 1 a 3, intervalo de pH en el estómago de los seres humanos (Gbassi y Vandamme, 2012); para el ajuste del pH se utiliza HCl 0.1 M. Con frecuencia, a este fluido se le adiciona pepsina (0.3 a 3 g/L) (Chávarri, Maraño, Ares e Ibáñez, 2010; Nejati *et al.*, 2011; Ortakci, Broadbent, McManus y McMahon, 2012; Soodbakhsh, Gheisari, Aminlari y Dehnavi, 2012; Zhao, Mutukumira, Lee, Maddox y Shu, 2012) y ocasionalmente se adiciona lipasa (0.9 mg/L) (Nejati *et al.*, 2011). Por último, el tiempo de exposición de los probióticos encapsulados en este medio es de hasta 120 minutos (Gbassi y Vandamme, 2012).

Para la fase entérica, el medio más utilizado contiene sales de sodio como Na_2HPO_4 (Gbassi y Vandamme, 2012). Otros autores, como Chávarri *et al.* (2010), sugieren utilizar una solución de NaCl (6.5 g/L), KCl (0.8 g/L), $CaCl_2$ (0.2 g/L) y $NaHCO_3$ (1.4 g/L), mientras que Krasaekoopt *et al.* (2004) sugieren una solución de KH_2PO_4 0.05 M y Zhao *et al.* (2012) una solución de glucosa (10 g/L) y extracto de levadura (5 g/L). El rango de pH utilizado para este fluido es de 6 a 8 y bilis (1 a 10 g/L) y algunos autores (Nejati *et al.*, 2011; Soodbakhsh *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012) sugieren adicionar enzimas pancreáticas (1 a 10 mg/L).

Por otra parte, otros autores sugieren que la fase entérica se lleve a cabo en una solución de leche descremada (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), cisteína (0.05 g/L) y 1 % de bilis (Pincin De Castro-Cislaghi, Dos Reis, Beddin Fritzen-Freire, Goulart-Lorenz y Sant'Anna, 2012; Fritzen-Freire, Prudêncio, Pinto, Muñoz y Amboni, 2013). El tiempo de exposición utilizado para esta fase es de 120 minutos.

Y en la fase entérica final, Nejati *et al.* (2011) y Soodbakhsh *et al.* (2012) proponen utilizar las mismas condiciones de la fase entérica pero ajustando el pH de 6.7 a 7.5 con un tiempo de exposición de 120 minutos. Sin embargo, Zhao *et al.* (2012) proponen utilizar pectina (4 g/L), glucosa (0.8 g/L), almidón (6 g/L), extracto de levadura (2 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L) y agua fecal esterilizada por filtración con un tamaño de poro de 0.22 mm y con un tiempo de exposición de 24 h.

1.2. Modelos dinámicos

Existen dos modelos dinámicos, los cuales son simuladores del TGI humano y consisten de un reactor para cada parte del tubo digestivo (estómago, intestino delgado, colon ascendente, colon transversal y colon descendente) (Afkhami, *et al.*, 2007), donde la temperatura ($37^\circ C$) es controlada al igual que el pH. El primer modelo consiste en tomar una alícuota de la fase gástrica y esta se adiciona a la fase entérica o se modifica el pH del vaso que contiene el fluido gástrico (Zhao *et al.*, 2012). En el segundo modelo, los reactores se mantienen con agitación y temperatura constante y el flujo se genera a través de una bomba peristáltica (semiautomatizada) (Gbassi y Vandamme, 2012). Ejemplos de este modelo son: a) simulador del ecosistema microbiano del intestino humano denominado SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) (el cual se abordará con más detenimiento debido a que se ha utilizado para determinar la liberación y resistencia de los probióticos encapsulados) y b) modelo gastrointestinal TIM por sus siglas en holandés. El primero fue desarrollado por Molly, Van de Woestyne y Verstraete en el año 1993, en Bélgica, mientras que el segundo fue desarrollado por la Organización Holandesa de Investigación Científica Aplicada, TNO por sus siglas en holandés, en específico por los investigadores Havenaar y Minekus en el año 1996 en Holanda.

El SHIME se desarrolló para estudiar la interacción de la microbiota intestinal con el colon. En un principio contaba con cinco reactores que simulaban las condiciones del intestino delgado y grueso; posteriormente De Boever, Wouters, Vermeirssen, Boon y Verstraete (2001) le adicionaron un reactor más que simula el estómago. En la Fig. 2 se puede observar cómo se encuentra conformado este modelo.

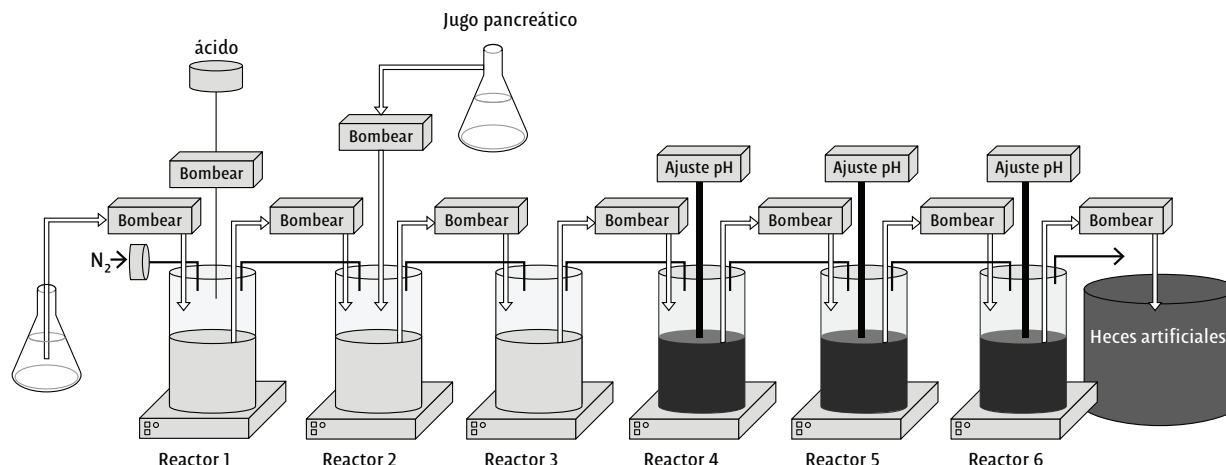


Fig. 2. Diagrama de modelo dinámico denominado SHIME (Adaptado de Yoo y Chen, 2006)

La principal característica del SHIME es la simulación del paso del quimo (al que se le adicionan los probióticos encapsulados) por el TGI, mediante la adición controlada de enzimas gástricas, pancreáticas e intestinales, así como también de bilis, el control de pH, temperatura, composición del alimento, ambiente anaeróbico, tiempo de tránsito por el TGI y adición de microbiota humana (Yoo y Chen, 2006).

El primer reactor simula las condiciones del estómago y el segundo las del duodeno; ambos simulan las condiciones de digestión de alimentos. La función principal del primer reactor se basa en el llenado y drenaje de 300 mL de solución de leche en polvo (15 g/L), pectina (16 g/L), mucina (8 g/L), almidón (5 g/L), glucosa (1 g/L), y 10 mL de sobrenadante de una suspensión compuesta de una dieta occidental humana (20 g de una mezcla de comida normal en 80 mL de una solución fisiológica) a un pH de 2 (ajustado con HCl 1 M), con un tiempo de residencia de 2 a 3 h y agitación de 150 rpm con agitador magnético (De Boever *et al.*, 2001). El segundo reactor contiene la solución anterior y se le adiciona el jugo pancreático, con la finalidad de neutralizar la acidez de la solución contenida del primer reactor a un pH de 7.5 con un tiempo de residencia de 4 h. Este jugo contiene $NaHCO_3$ (12 g/L), pancreatina (0.9 g/compuesta por enzimas pancreáticas como tripsina, amilasa y lipasa) además de bilis de buey (constituida por colesterol, lecitina, ácido tourocólico y ácido glicólico) y es adicionado a este reactor a una velocidad de 100 mL/h (Alander *et al.*, 1999; De Boever *et al.*, 2001). El tercer reactor simula las condiciones del yeyuno contiene 300 mL de la mezcla anterior a un pH de 6.5 a 7, con un tiempo de residencia de 4 h. Por último, los tres reactores restantes simulan la microbiota del colon, ya que se les inocula una mezcla con 50 mL de una suspensión fecal al

20% con un amortiguador de fosfato de sodio se agita continuamente a 150 rpm por medio de agitadores magnéticos, en condiciones anaeróbicas mediante la inyección de N_2 en el espacio de cabeza de los reactores, dos veces al día durante 15 minutos. Para controlar el pH se utilizan HCl 0.1 M o NaOH 0.1 M y la temperatura a 37 °C es regulada por un termostato (Possemiers, Verthé, Uyttendaele, Verstraete, 2004). El cuarto reactor simula el colon ascendente, contiene una mezcla de 1000 mL con un pH de 5.5 a 6.0; el tiempo de exposición es de 20 h. El quinto reactor simula el colon transversal, con una mezcla de 1600 mL a un pH de 6.0 a 6.4, con un tiempo de residencia de 32 h. Y el sexto reactor simula el colon descendente, con una mezcla de 1200 mL a un pH de 6.4 a 6.8, con un tiempo de estancia de 24 h (Molly *et al.*, 1993; De Boever *et al.*, 2001; Van de Wiele, Boon, Possemiers, Jacobs y Verstraete, 2004).

Existen algunos estudios (Martoni *et al.*, 2007; Urbanska, Bhathena, y Prakash, 2007; Martoni, Bhathena, J., Urbanska y Prakash, 2008) en donde se reporta el uso de este modelo con modificaciones para las condiciones del estómago e intestino delgado. Para las condiciones del estómago simulado con un pH 2 (ajustado con HCl 1 M) y alimento en suspensión que contiene almidón (3 g/L), pectina (2 g/L), mucina (4 g/L), arabinogalactano (1 g/L), xilano (1g/L), extracto de levadura (3g/L), peptona (1g/L), glucosa (0.4 g/L) y cisteína (0.5g/L), con un tiempo de exposición de 1 h; las condiciones del intestino delgado (duodeno y yeyuno) simulado son $NaHCO_3$ (2.4 g/L), pancreatina (0.18 g/L) y sales biliares (0.5 g/L), con un tiempo de exposición de 10 h.

La principal ventaja del modelo dinámico es que tiene mejor simulación del TGI del humano ya que es continuo y las soluciones que se utilizan para este proceso contienen enzimas,

además los tiempos de residencia de un reactor a otro son mucho mayores que los de un modelo convencional

2. Supervivencia de probióticos encapsulados por diferentes técnicas a condiciones gastrointestinales

La encapsulación es una técnica que permite mejorar la supervivencia de los probióticos durante su paso por el TGI. Por lo anterior, en este apartado se abordará la supervivencia de los probióticos encapsulados por los métodos de gelificación, atomización y emulsión ante condiciones gastrointestinales modelo.

2.1. Probióticos encapsulados por gelificación

La encapsulación por la técnica de gelificación consiste en preparar una mezcla hidrocoloide con probióticos, la cual se alimenta en un extrusor, que generalmente es una jeringa. La presión ejercida sobre el émbolo de la jeringa hace que caiga el contenido en una solución, la cual permite su gelificación. La forma y tamaño de las perlas son iguales y muy estables (Gbassi y Vandamme, 2012). Es el método de encapsulación más popular, ya que es fácil de aplicar, porque garantiza una alta viabilidad de las células y es de bajo costo (Krasaekoopt *et al.*, 2002).

El material más utilizado para la mezcla hidrocoloide es el alginato (Zomorodi, Asl, Rohani y Miraghaei, 2011), que es un heteropolisacárido lineal de ácido D- manurónico y de ácido L-gulurónico que es extraído de diversos tipos de algas. Las concentraciones de alginato que se utilizan varían de 0.6% a 2% y para la solución gelificante se utiliza CaCl_2 . El diámetro de las perlas es, aproximadamente, de 2-3 mm; la esfericidad y el tamaño de éstas depende de la viscosidad de la solución de alginato de sodio, la distancia entre la jeringa y la solución de CaCl_2 , así como también del diámetro del orificio de la jeringa (Krasaekoopt *et al.*, 2002).

Entre los probióticos encapsulados por gelificación cuya resistencia ha sido determinada ante condiciones gastrointestinales modelo, están el *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium bifidum*. Y los materiales que se utilizan son alginato y mezclas de éste con quitosano y poli-L- lisina (Krasaekoopt *et al.*, 2004; Urbanska *et al.*, 2007; Martoni *et al.*, 2007; Martoni *et al.*, 2008; Chávarrri *et al.*, 2010; Ortakci *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012) (Tabla I).

Krasaekoopt *et al.* (2004) encapsularon *L. acidophilus* y *L. casei*, utilizaron alginato para encapsular y realizaron doble encapsulamiento adicionando para la segunda cápsula el mismo alginato, quitosano o poli-L-lisina-alginato; sometieron a las bacterias encapsuladas a un modelo gastrointestinal

convencional, obteniendo la mejor supervivencia utilizando alginato con quitosano. Sin embargo, Urbanska *et al.* (2007), con un modelo dinámico, obtuvieron una mejor supervivencia que Krasaekoopt *et al.* (2004), ya que en la fase gástrica la reducción fue de 1.8 ciclos logarítmicos y en la entérica de 0.2 ciclos logarítmicos.

Zhao *et al.* (2012) y Martoni *et al.* (2008) encapsularon *Lactobacillus reuteri*; ambos utilizaron un modelo gastrointestinal dinámico, pero el segundo un modelo semiautomatizado. En la fase gástrica, Zhao *et al.* (2012) obtuvieron una mejor supervivencia del probiótico, ya que sólo tienen una reducción de un ciclo logarítmico, en comparación a los que obtuvieron Martoni *et al.* (2008). Esto es debido a que las características de la cepas no son iguales; es importante señalar que la cepa que utilizaron Zhao *et al.* (2012) es más resistente a niveles de pH bajos y a la acción de la pepsina. Sin embargo, en la fase entérica Martoni *et al.* (2008) obtuvieron un incremento de 0.88 ciclos logarítmicos; esto es debido a que el probiótico cuenta con una enzima que hidroliza las sales biliares, lo cual evita que dichas sales afecten al *Lactobacillus reuteri* BBS.

2.2. Probióticos encapsulados por atomización

Este método es eficaz en la protección de los probióticos, por lo que es muy utilizado en la industria alimentaria. Consiste en atomizar una suspensión acuosa que contenga células probióticas; este material se esparce en forma de gotas con aire en un medio a altas temperaturas, dando como resultado una rápida evaporación del agua. La desventaja de esta técnica es la alta temperatura del aire (temperatura de entrada 100-170°C; de salida 45-105 °C) (Rokka y Rantamäki, 2010; Gbassi y Vandamme, 2012).

En los estudios revisados (Tabla I), Picinin De Castro-Cislaghi *et al.* (2012) y Fritzen-Freire *et al.* (2013) encapsularon *Bifidobacterium* BB-12 por el método de atomización usando diferentes materiales: el primero con suero de leche y el segundo con leche en polvo descremada reconstituida. En ambos casos, la supervivencia fue evaluada en un modelo convencional y presentó un valor superior a 6.85 log UFC/g. Al comparar la reducción en ciclos logarítmicos, se observa que el suero de leche fue mejor encapsulante que la leche en polvo descremada reconstituida, ya que en la fase gástrica las bacterias encapsuladas con el primero presentaron una reducción de 0.73 ciclos logarítmicos, mientras que la reducción de las encapsuladas con la segunda fue de 1.87 ciclos logarítmicos; esto indica que la encapsulación con suero de leche ayuda con la supervivencia del probiótico, ya que esta bacteria es sensible a valores de pH bajos. Sin embargo, en la fase entérica la

Tabla I. Supervivencia a condiciones gastrointestinales modelo de probióticos encapsulados por diferentes técnicas.

Método de encapsulación	Modelo gastrointestinal	Probiótico	Materiales	Carga inicial (log UFC/g)	Supervivencia (log UFC/g)	Referencia		
Gelificación	Convencional	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alginato	9.20 ^a 8.90 ^b	5.93 ^a 5.48 ^b	Krasaekoopt <i>et al.</i> , 2004		
			Alginato-quitosano	9.00 ^a 9.04 ^b	6.76 ^a 6.20 ^b			
			Alginato-alginato	8.77 ^a 9.15 ^b	5.30 ^a 4.11 ^b			
			Alginato-poli-L-lisina-alginato	9.40 ^a 9.08 ^b	5.32 ^a 4.00 ^b			
			Sin encapsular	9.80 ^a 9.30 ^b	3.36 ^a 2.50 ^b			
			Dinámico	Alginato	8.25 ^a 8.25 ^b		5.80 ^a 8.24 ^b	Ortakci <i>et al.</i> , 2012
				Sin encapsular	9.01 ^a 9.08 ^b		<2.00 ^a 8.99 ^b	
				<i>Lactobacillus casei</i>	Alginato-quitosano		9.00 ^a 7.20 ^b	7.20 ^a 7.00 ^b
		Alginato			9.82 ^a 9.95 ^b	4.63 ^a 3.96 ^b		
		Alginato-quitosano			9.89 ^a 9.92 ^b	6.62 ^a 6.2 ^b	Krasaekoopt <i>et al.</i> , 2004	
		Alginato-alginato			10.00 ^a 9.89 ^b	4.34 ^a 3.83 ^b		
		Alginato-poli-L-lisina-alginato			9.90 ^a 10.23 ^b	4.20 ^a 3.85 ^b		
		Sin encapsular			10.04 ^a 9.82 ^b	4.04 ^a 2.36 ^b		
		<i>Lactobacillus gasseri</i>	Alginato-quitosano		>7.00 ^a 7.03 ^b	7.00 ^a 6.95 ^b		Chávarri <i>et al.</i> , 2010
			Sin encapsular		9.00 ^a 7.58 ^b	<1 ^a <1 ^b		
			<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Alginato-quitosano	>7.00 ^a 7.01 ^b	7.00 ^a 6.78 ^b	Chávarri <i>et al.</i> , 2010	
	Sin encapsular			9.00 ^a	<1 ^a			
	<i>Lactobacillus reuteri</i> DPC16	Alginato		8.70 ^a 7.70 ^b 6.00 ^c 9.00 ^a	7.70 ^a 6.00 ^b 4.00 ^c <1.00 ^a	Zhao <i>et al.</i> , 2012		
		Sin encapsular						
		<i>Lactobacillus reuteri</i> BSH	Alginato-poli-L-lisina-alginato	9.71 ^a 8.12 ^b	6.86 ^a 9.00 ^b		Martoni <i>et al.</i> , 2008	
			Alginato-poli-L-lisina-alginato	9.40 ^a 8.01 ^b	8.01 ^a 8.86 ^b			Martoni <i>et al.</i> , 2007

a Fase gástrica

b Fase entérica

c Fase colónica

Tabla I. (Continuación)

Método de encapsulación	Modelo gastrointestinal	Probiótico	Materiales	Carga inicial (log UFC/g)	Supervivencia (log UFC/g)	Referencia
Atomización	Convencional	<i>Bifidobacterium BB-12</i>	Suero de leche	8.20 ^a	7.47 ^a	Picinin De Castro-Cislaghi <i>et al.</i> , 2012
				11.00 ^b	6.87 ^b	
			Sin encapsular	9.00 ^a	7.49 ^a	
				9.50 ^b	9.20 ^b	
			Leche en polvo decremada	10.57 ^a	^a	Fritzen-Freire <i>et al.</i> , 2013
					8.7	
			Sin encapsular	10.57 ^b	8.5 ^b	
				11.20 ^a	7.2 ^a	
				11.20 ^b	8.2 ^b	
Emulsión	Convencional	<i>L. acidophilus</i>	Alginato, almidón de maíz, aceite de soya y tween 80 al 1%	9.13 ^a	7.42 ^a	Sabikhi <i>et al.</i> , 2010
				9.13 ^b	7.81 ^b	
			Sin encapsular	9.13 ^a	4.19 ^a	
				9.13 ^b	5.31 ^b	
	Dinámico	<i>L. acidophilus</i>	Alginato, aceite vegetal y tween 80 al 1%	10.75 ^a	7.43 ^a	Ding y Shah, 2007
		<i>L. rhamnosus</i>		10.49 ^a	7.11 ^a	
		<i>B. longum</i>		10.63 ^a	6.45 ^a	
		<i>La. salivarius</i>		10.86 ^a	6.14 ^a	
		<i>L. plantarum</i>		10.45 ^a	6.64 ^a	
		<i>L. paracasei</i>		10.34 ^a	6.41 ^a	
		<i>B. lactis BI-04</i>		10.46 ^a	6.27 ^a	
		<i>B. lactis BI-07</i>		10.88 ^a	6.93 ^a	
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Goma xantana, aceite vegetal y tween 80 al 1%	10.46 ^a	7.22 ^a	Ding y Shah, 2009
				10.50 ^b	6.30 ^b	
		<i>Bifidobacterium longum</i>		10.58 ^a	6.44 ^a	
				10.50 ^b	6.30 ^b	
		<i>Lactobacillus salivarius</i>		10.30 ^a	6.23 ^a	
				9.90 ^b	5.80 ^b	
		<i>L. plantarum</i>		10.42 ^a	6.93 ^a	
				10.50 ^b	6.50 ^b	
		<i>L. acidophilus</i>		10.45 ^a	7.32 ^a	
				10.30 ^b	5.90 ^b	
		<i>Lactobacillus paracasei</i>		10.55 ^a	6.44 ^a	
				9.90 ^b	6.10 ^b	
		<i>Bifidobacterium lactis BI-04</i>		10.53 ^a	6.28 ^a	
				10.20 ^b	5.90 ^b	
		<i>B. lactis BI-07</i>		10.42 ^a	6.96 ^a	

a Fase gástrica

b Fase entérica

c Fase colónica

leche en polvo descremada reconstituida fue mejor encapsulante, ya que las bacterias presentaron una reducción de 2.07 ciclos logarítmicos, mientras que las encapsuladas con suero y leche tuvieron una reducción de 4.13 ciclos logarítmicos.

2.3 Probióticos encapsulados por emulsión

La encapsulación por emulsión está formada por dos fases: dispersa y continua. La primera generalmente es una suspensión que contiene un polímero (carragenina, goma de algarrobo, alginato, quitosano, gelatina, pectina o carboximetilcelulosa) con probióticos, y la segunda es un gran volumen de aceite vegetal que puede ser de soya, girasol, canola o maíz. Para estabilizar la emulsión se requiere adicionar un emulgente (por lo general Tween 80 al 0.2%), el cual reduce la tensión superficial entre las cápsulas. Para preparar la emulsión, la mezcla es homogenizada por medio de agitación continua; este paso es fundamental, ya que la velocidad de la agitación afecta la forma y el tamaño de las cápsulas (este último varía entre 25 μ m y 2 mm). Las cápsulas obtenidas presentan formas y tamaños desiguales, pero son 100 veces más pequeñas que las perlas obtenidas por el método de gelificación (Krasaekoopt *et al.*, 2002; Soccol *et al.*, 2010; Gbassi y Vandamme, 2012).

Las desventajas de este método son la inestabilidad de la emulsión y la necesidad de agitación vigorosa, la cual puede resultar perjudicial para la supervivencia de los probióticos (Gbassi y Vandamme, 2012).

Entre los probióticos encapsulados por emulsificación cuya resistencia ha sido determinada ante condiciones gastrointestinales modelo, están *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *B. lactis* BI-04 y *B. lactis* BI-07 (Ding y Shah, 2007; Ding y Shah, 2009; Sabikhi, Babu, Thompson y Kapila 2010) (Tabla I).

Los modelos gastrointestinales usados para evaluar la resistencia de los probióticos encapsulados por este método fueron el convencional (Ding y Shah, 2007, 2009) y el dinámico (Sabikhi *et al.* 2010). El probiótico encapsulado en los dos estudios referidos fue el *Lactobacillus acidophilus*. La mayor supervivencia en la fase gástrica se observó en el probiótico encapsulado con alginato y almidón de maíz. En la fase entérica, las condiciones que utilizadas por Ding y Shah (2007, 2009) para evaluar la supervivencia fueron 3% de bilis con un tiempo de exposición de 4 h y obtuvieron una reducción de 4.4 ciclos logarítmicos. En cambio, Sabikhi *et al.* (2010) proponen la utilización de 1% de bilis durante 3 h; bajo estas condiciones se observa que el probiótico encapsulado con alginato y almidón de maíz tiene una mayor supervivencia con respecto

a la obtenida por Ding y Shah (2007, 2009), ya que la reducción fue de 1.32 ciclo logarítmicos. Es importante destacar que la concentración de bilis que utilizaron Ding y Shah (2007, 2009) se aproxima a la que se requiere para la digestión en el sistema digestivo humano (2-3%) (Mataix-Verdú, 2009); sin embargo, Sabikhi *et al.* (2010) utilizaron un modelo dinámico y los resultados de supervivencia de los probióticos encapsulados son más representativos.

Conclusiones

En este artículo se abordaron las condiciones gastrointestinales modelo, que simulan el tracto gastrointestinal, para evaluar la supervivencia de los probióticos encapsulados. La aplicación del modelo dinámico es mejor que el modelo convencional, ya que tiene mayor similitud con el tracto digestivo del humano obteniendo resultados válidos sin utilizar modelos *in vivo*, por tal motivo se recomienda su uso. Sin embargo, el modelo dinámico (SHIME) es difícil de aplicar debido a su complejidad con respecto a un modelo convencional.

Agradecimientos

A. R. Juárez-Roldán agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP), por el apoyo y financiamiento de sus estudios de posgrado.

REFERENCIAS

- Afkhami, F., Ouyang, W., Chen, H., Lawuyi, B., Lim, T. y Prakash, S. (2007). Impact of orally administered microcapsules on gastrointestinal microbial flora: in-vitro investigation using computer controlled dynamic human gastrointestinal model. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 35, 359-375.
- Alander, M., De Smet, I., Nollet, L., Verstraete, W., Von Wright, A. y Mattila-Sandholm, T. (1999). The effect of probiotic strains on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *International Journal of Food Microbiology*, 46, 71-79

- Chávarri, M., Maraño, I., Ares, R. e Ibáñez, C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 185-189.
- De Boever, P., Wouters, R., Vermeirssen, V., Boon, N. y Verstraete, W. (2001). Development of a six-stage culture system for simulating the gastrointestinal microbiota of weaned infants. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13, 111-123.
- Ding, W. y Shah, N. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72 (9), M446-M450.
- Ding, W. y Shah, N. (2009). Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 74(2), M100-M107.
- Fritzen-Freire, C., Prudêncio, E., Pinto, S., Muñoz, I. y Amboni, R. (2013). Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium BB-12* exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 39-44.
- Gbassi, G. y Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4(1), 149-163.
- Havenaar, R. y Minekus, M. (1996). Simulated Assimilation. *Dairy Industries International*, 6(9), 17-24.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. (2002). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. Review. *International Dairy Journal*, 13, 3-13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 737-743.
- Mataix-Verdú, J. (2009). *Tratado de Nutrición y Alimentación* (Vol. 1). Barcelona: OCEANO/ergon.
- Martoni, C., Bhathena, J., Jones, M., Urbanska, A., Chen, H. y Prakash, S. (2007). Investigation of microencapsulated BSH active *Lactobacillus* in the simulated human GI tract. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2007(7), 1-9.
- Martoni, C., Bhathena, J., Urbanska, A. y Prakash, S. (2008). Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 225-233.
- Molly, K., Van de Woestyne, M. y Verstraete, W. (1993). Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 254-258.
- Nejati, R., Gheisari, H. y Hosse, S. (2011). Viability of encapsulated *Bifidobacterium lactis* (BB-12) in symbiotic uf cheese and it's survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 6 (3/4), 197-204.
- Ortakci, F., Broadbent, J., McManus, W. y McMahon, J. (2012). Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6274-6281.
- Özer, B., Uzun, Y. y Kirmaci, H. (2008). Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during Kasar cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 61 (3), 237-244.
- Picinin De Castro-Cislaghi, F., Dos Reis E. Silva, C., Beddin Fritzen-Freire, C., Goulart-Lorenz, J. y Sant'Anna, E. (2012). *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, 113, 186-193.
- Possemiers, S., Verthé, K., Uyttendaele, S. y Verstraete, W. (2004). PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 495-507.
- Prakash, S., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., y Cantor, A. (2011). The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, Article ID 981214, 1-12.
- Rokka, S. y Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231, 1-12.
- Sabikhi, L., Babu, R., Thompson, D. y Kapila, S. (2010). Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 586-593.
- Socol, C., Vandenberghe, L., Spier, M., Medeiros, A., Yamaguchi, C., Lindner, J., Pandey, A. y Thomaz-Socol, V. (2010). The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413-434.

- Soodbakhsh, S., Gheisari, H., Aminlari, M. y Dehnavi, T. (2012). Viability of encapsulated *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* in symbiotic frozen yogurt and their survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Probiotics*, 7(3/4), 121-128.
- United States Pharmacopeial Convention. (1989). *U.S. pharmacopeia. by authority of the United States Pharmacopeial convention, Inc.* (22a. ed.) Washington: Committee of revision and published by the board of Trustees.
- Urbanska, A. M., Bhathena, J. y Prakash, S. (2007). Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yogurt for therapeutic oral delivery: preparation and in vitro analysis of alginate-chitosan microcapsules. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85, 884-893.
- Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., Verstraete, W. (2004). Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 143-153.
- Yoo, J. y Chen, X. (2006). GIT physicochemical modeling a critical review. *International Journal of Food Engineering*, 2(4), 1-10.
- Zhao, Q., Mutukumira, A., Lee, S., Maddox, I. y Shu, Q. (2012). Functional properties of free and encapsulated *Lactobacillus reuteri* DPC16 during and after passage through a simulated gastrointestinal tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 61-70.
- Zomorodi, S., Asl, A., Rohani, S. y Miraghaei, S. (2011). Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. *International Journal of Dairy Technology*, 64 (1), 84-91.