



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y**  
**BIOTECNOLOGIA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

---

**Microencapsulación de levadura *Saccharomyces cerevisiae* como fuente de  
probióticos**

---

Trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación previa la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Esteban Emiliano Suárez Manzano

Tutor: PhD. Orestes Darío López Hernández

Ambato-Ecuador

Mayo-2019

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Orestes López Hernández

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de éste Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 01 de Abril de 2019



.....  
PhD. Orestes López Hernández

C.I. 175478486-4

TUTOR

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Esteban Emiliano Suárez Manzano, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales a excepción de las citas.



---

Sr. Esteban Emiliano Suárez Manzano

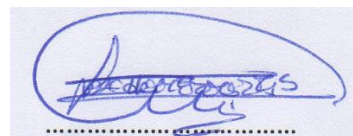
180407533-9

Autor

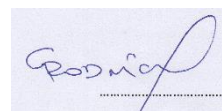
## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman



Presidente de Tribunal



.....  
PhD. Carlos Alberto Rodríguez Meza

C.I. 1802166502



Msc. Julio César Sosa Cárdenas

C.I.1716650849

Ambato, 09 de Mayo de 2019

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

Sr. Esteban Emiliano Suárez Manzano

C.I. 180407533-9

AUTOR

## **DEDICATORIA**

“Oh!, todos nosotros soñamos  
Con los ojos abiertos  
que volamos por los cielos”.

Tite Kubo

Este trabajo de titulación está dedicado a mis padres, mis abuelas y mi padrino que han sabido guiarme a lo largo de este tiempo con su paciencia y consejos. También a mi tutor que ha logrado impartirme sus conocimientos y con su guía me ayudó a conseguir culminar el trabajo de graduación y a mí, por perseverar hasta lograr llenar de orgullo a mi familia con este grado alcanzado

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco toda la ayuda a los docentes que me ayudaron con cada paso de mi investigación en especial a los PhD Orestes López y Diana Coello por la guía en los procesos de microencapsulación y lecturas SEM, también a los PhD Linda Guamán y Carlos Barba por confiar en mí para realizar un ensayo tan importante de su proyecto.

A mi padrino Arturo por todo el apoyo en mi vida estudiantil, padrino esta va por vos!

# ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

## PÁGINAS PRELIMINARES

PORTADA .....	I
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD .....	III
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	III
DERECHOS DE AUTOR .....	IV
DEDICATORIA .....	VI
AGRADECIMIENTOS .....	VII
ABSTRACT .....	XIV
INTRODUCCIÓN .....	XV

## CAPÍTULO I

<b>EL PROBLEMA</b> .....	XVII
1.1. Tema de investigación.....	XVII
1.2. Justificación .....	XVII
1.3. Objetivos .....	XIX
1.3.1. Objetivo general .....	XIX
1.3.2. Objetivos específicos.....	XIX

## CAPITULO II

<b>MARCO TEORICO</b> .....	XX
2. Antecedentes investigativos .....	XX
2.1.1. El porqué de microencapsular .....	XX
2.1.2. Formas de microencapsulación .....	XXI
2.1.3. Evaluación por métodos de disolución .....	XXII
2.1.4. Secado por aspersion.....	XXIII
2.1.5. Condiciones de operación .....	XXV
2.2. Hipótesis .....	XXVII
2.2.1. Hipótesis nula.....	XXVII
2.2.2. Hipótesis Alterativa.....	XXVII
2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis .....	XXVII
2.3.1. Variables dependientes.....	XXVII
2.3.2. Variables Independientes.....	XXVII



### CAPITULO III

<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	XXVIII
3.1. Materiales, equipos y reactivos .....	XXVIII
3.1.1. Materiales.....	XXVIII
3.1.2. Equipos .....	XXVIII
3.1.3. Reactivos.....	XXVIII
3.2. Métodos .....	XXIX
3.2.1. Preparación de la levadura.....	XXIX
Tabla 1: Matrices poliméricas y concentración polímero-levadura.....	XXX
3.2.2. Microencapsulación .....	XXX
3.2.3. Procedimiento de análisis de los resultados.....	XXXI
3.2.4. Escalado de la microencapsulación .....	XXXII
3.2.5. Evaluación morfológica del microencapsulado .....	XXXII
3.2.6. Ensayo de supervivencia en fluido intestinal simulado .....	XXXII

### CAPITULO IV

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	XXXIV
4. Análisis y discusión de resultados .....	XXXIV
4.1. Análisis del proceso de Microencapsulación de levadura <i>S. cerevisiae</i> mediante Secado por aspersión.....	XXXIV
4.1.1. Rendimiento de la microencapsulación de <i>S. cerevisiae</i> .....	XXXIV
Tabla 2: Rendimiento del proceso de microencapsulación.....	XXXV
4.1.2. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> por el método de secado por aspersión	XXXV
Figura 1. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> microencapsulada en diversas matrices poliméricas.....	XXXVI
4.1.3. Selección del polímero más viable para la microencapsulación de <i>S. cerevisiae</i> por el método de secado por aspersión .....	XXXVI
Figura 2. Diagrama de caja y bigotes obtenido del análisis de varianza para la concentración del microencapsulado.....	XXXVII
4.1.4. Evaluación cinética de crecimiento del polímero más viable viable para la microencapsulación de <i>S. cerevisiae</i> por el método de secado por aspersión .....	XXXVII
Figura 3. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> microencapsulada en la matriz polimérica más viable .....	XXXVIII
4.1.5. Descripción, tamaño y morfología de las microcápsulas .....	XXXVIII
Figura 4. Imagen SEM de microencapsulado de levadura <i>S. cerevisiae</i> con relación 50:50 matriz-levadura .....	XXXIX
Figura 5. Imagen SEM de microencapsulado de levadura <i>S. cerevisiae</i> con relación 60:40 matriz-levadura.....	XL

Figura 7. Imagen SEM de microencapsulado de levadura <i>S cerevisiae</i> en comparación de población de microencápsulas para relaciones de matriz-levadura de 50:50, 60:40 y 70:40 .....	XLII
4.1.6. Coeficiente de transferencia de masa.....	XLII
Tabla 3: Medidas tomadas para el cálculo del diámetro medio aproximado del microencapsulado con proporción matriz polimérica-levadura 60:40 .....	XLII
Tabla 4: Tiempo medido para la determinación de viscosidad de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1 mol/l ..	XLIII.
Tabla 5: Viscosidad de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1 mol/l .....	XLIII.
4.1.7. Prueba de disolución del microencapsulado .....	XLIV
Tabla 6: Prueba de disolución para microencapsulado con proporción matriz polimérica-levadura 60:40.....	XLV.

## CAPITULO V

<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	XLVI
5.1. Conclusiones .....	XLVI
5.2. Recomendaciones.....	XLVI
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	XLVII
<b>ANEXOS</b> .....	LII
Figura 9. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 .....	LII
Figura 8. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 .....	LII
Figura 11. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 .....	LII
Figura 10. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 .....	LII
Figura 13. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 70:30.....	LIII
Figura 12. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 70:30 .....	LIII
Figura 15. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 .....	LIII
Figura 14. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 con medidas .....	LIII
Figura 17. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 70:30 con medidas .....	LIV
Figura 16. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 con medidas .....	LIV

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Matrices poliméricas y concentración polímero-levadura .....	XXX
Tabla 2: Rendimiento del proceso de microencapsulación.....	XXXV
Tabla 3: Medidas tomadas para el cálculo del diámetro medio aproximado del microencapsulado con proporción matriz polimérica-levadura 60:40 .....	XLII
Tabla 4: Tiempo medido para la determinación de viscosidad de $K_2HPO_4$ 0,1 mol/l ...	XLIII
Tabla 5: Viscosidad de $K_2HPO_4$ 0,1 mol/l .....	XLIII.
Tabla 6: Prueba de disolución para microencapsulado con proporción matriz polimérica-levadura 60:40.....	XLV.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> microencapsulada en diversas matrices poliméricas .....	XXXVI
Figura 2. Diagrama de caja y bigotes obtenido del análisis de varianza para la concentración del microencapsulado.....	XXXVII
Figura 3. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> microencapsulada en la matriz polimérica más viable .....	XXXVIII
Figura 4. Imagen SEM de microencapsulado de levadura <i>S cerevisiae</i> con relación 50:50 matriz-levadura .....	XXXIX
Figura 5. Imagen SEM de microencapsulado de levadura <i>S cer evisiae</i> con relación 60:40 matriz-levadura.....	XL
Figura 7. Imagen SEM de microencapsulado de levadura <i>S cerevisiae</i> en comparación de población de microencápsulas para relaciones de matriz-levadura de 50:50, 60:40 y 70:40 .....	XLI
Figura 8. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 .....	LII
Figura 9. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40	LII
Figura 11. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40.....	LII
Figura 10. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 .....	LII
Figura 13. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 70:30 .....	LIII
Figura 12. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 70:30 .....	LIII
Figura 15. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 .....	LIII
Figura 14. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 con medidas .....	LIII
Figura 17. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 70:30 con medidas .....	LIV
Figura 16. Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 con medidas .....	LIV

## RESUMEN

Se realizó la microencapsulación de levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleando como polímeros maltodextrina DE 10, Proteína concentrada de suero y una combinación en proporciones iguales de maltodextrina DE 10 y goma arábica, de los cuales se determinó la viabilidad con una curva de crecimiento a las 6 semanas después de almacenarse las muestras, además se determinó el rendimiento de cada microencapsulado con su respectiva matriz polimérica. Estos análisis dieron a conocer que la mejor matriz de microencapsulación, la cual fue la combinación de maltodextrina DE 10 y goma arábica en una relación matriz de microencapsulación-levadura 60:40 misma que se observó bajo un microscopio de barrido electrónico para determinar su forma que es lisa y su tamaño que ronda una media aproximada de 5,08  $\mu\text{m}$  de diámetro. Con este diámetro se obtuvo el coeficiente de transferencia de masa para el microencapsulado el cual se determinó con el número adimensional de Sherwood cuyo valor resultante es 299,21 tras una disolución por prueba de jarras en una solución de fosfato ácido de potasio de concentración 0,1 mol/L la cual simula las condiciones presentes en la porción intestinal del duodeno.

La cinética de crecimiento se realizó haciendo uso de medio líquido de cultivo YPD esterilizado el cual también cuenta como blanco para la lectura espectrofotométrica.

La mezcla polimérica de relación polímero-levadura 60:40 consta de proporciones iguales tanto de maltodextrina DE 10 y Goma arábica según la cantidad de levadura lavada obtenida tras su cultivo.

La simulación se realizó para determinar el polímero capaz de disolverse en medio intestinal.

**Palabras clave:** Maltodextrina, Goma arábica, Levadura, Microencapsulación, secado por aspersión, transferencia de masa

## ABSTRACT

Microencapsulation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* was performed using polymers as maltodextrin DE 10, concentrated whey and a combination in equal proportions of maltodextrin DE 10 and gum arabic, of which viability was determined with a growth curve at 6 weeks. After the samples were stored, the performance of each microencapsulation was determined with its respective polymer matrix. These analyzes revealed that the best encapsulation matrix, which was the combination of maltodextrin DE 10 and gum arabic in a 60:40 yeast encapsulation-matrix relationship that was observed under an electron scanning microscope to determine its shape. It is smooth and its size is around an average of 5,08  $\mu\text{m}$  in diameter. With this diameter there was obtained the coefficient of transference of mass for the microencapsulated one which decided with the number adimensional of Sherwood whose resultant value is 299,21 after a dissolution for pitchers test in a solution of acidic phosphate of potassium of concentration 0,1 mol/L which simulates the present conditions in the intestinal portion of the duodenum.

The kinetics of growth was carried out using liquid medium of cultivation YPD sterilized which also counts as white for the spectrophotometric reading.

The mixture polymer relationship polymer-yeast 60:40 consists of equal proportions of both maltodextrin DE 10 and gum arabic according to the amount of yeast washed obtained after its cultivation.

The simulation was performed to determine the polymer capable of dissolving in the intestinal environment.

**Key words:** maltodextrin, gum arabic, yeast, microencapsulation, spray drying, mass transfer

## INTRODUCCIÓN:

La importancia de los probióticos en el cuerpo humano radica en los beneficios que estos pueden generar en su huésped siempre que se encuentren en cantidades adecuadas de modo que sus productos resulten nocivos para bacterias patógenas que pudiesen infectar al huésped y que a su vez, estos productos sean capaces de mantener la homeostasis del organismo anfitrión. Así fue como el primer probiótico conocido fue *Bacillus bulgaricus* aislado por Elie Metchnikoff e implementado en el yogurt popularizando desde entonces su característica como fuente de probióticos **(Vieira, Teixeira, & Martins, 2013)**.

En lo que al uso de levaduras se refiere como probióticos, la única especie que se conoce como un probiótico nato es *Scaccharomyces cerevisiae* en especial *Scaccharomyces cerevisiae var. boulardii* por lo que ha sido ampliamente estudiado sobre todo su mecanismo de acción en contra de organismos patógenos que puedan causar enfermedades o desórdenes en el Tracto Gastro Intestinal (TGI), el cual consiste en una neutralización por unión por parte de las variedades de *S cerevisiae* con las bacteria gastroentéricas y también con las toxinas que estas generan, siendo por estas funciones que a las cepas de *S. cerevisiae* se les aplica técnicas de ingeniería genética para modificar la expresión de proteínas que tengan aplicabilidad biotecnológica sobre todo en el ámbito del uso de probióticos **(Palma et al., 2015)**.

Entonces, sabiendo las ventajas que poseen los organismos probióticos, aprovechar su potencial al máximo es prioritario, en especial, lograr que lleguen al sitio de acción a salvo de la degradación que puedan sufrir por enzimas salivares o los ácidos estomacales. Es en ese momento en el cual entran las técnicas de microencapsulación, definiendo más precisamente la técnica de Secado por Aspersión o Spray Drying.

Las técnicas de microencapsulación tienen como principio el recubrimiento total de un material de interés, proceso que les confiere propiedades o retira aquellas que son poco útiles para el proceso que se lleva a cabo. En el caso del Secado por Aspersión se trata de un proceso de deshidratación que microencapsula un material determinado dentro de una matriz polimérica protectora generando diversas formas de microencapsulados según la mezcla que se haya sometido al proceso, siendo estas formas una simple esfera rellena, un multi-núcleo, multi-pared o una matriz sólida donde se reparte todo

el material de interés. El uso del Secado por Aspersión dentro del área farmacéutica y alimentaria se debe por su bajo costo y equipamiento accesible (**Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007**).



# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1. Tema de investigación

Microencapsulación de levadura *Saccharomyces cerevisiae* como fuente de probióticos

### 1.2. Justificación

Con el fin de ensayar preliminarmente la viabilidad de la microencapsulación de microorganismos probióticos se realiza este trabajo perteneciente al Proyecto de Investigación "Ingeniería de *Saccharomyces boulardii* para la producción de butirato y evaluación de su efecto in vitro en la estructura y función del epitelio intestinal y macrófagos" con código CEPRA XII-2018-10.

El consumo de probióticos, así como lo determinan **Broeckx, Vandenneuvel, Claes, Lebeer, & Kiekens (2016)**, mantiene al cuerpo saludable regulando y previniendo desbalances producidos por el microbioma o microbiota presente dentro del organismo humano, por lo que ha tomado gran impulso en el ámbito farmacéutico. Basado en esto es considerado que la elaboración de éste trabajo, aporta no solamente a la academia sino a un ámbito industrial teniendo como principal diferencia con el trabajo citado el microorganismo a microencapsular, pues por defecto es *Lactobacillus* debido a su capacidad probiótica y en este caso se desea usar *Saccharomyces* pero principalmente evaluar la viabilidad del microorganismo microencapsulado.

Se ha seleccionado el método de secado por aspersion debido a que si se considera una escala industrial es el método más eficiente y que somete a una cantidad reducida de estrés al organismo bacteriano microencapsulado además de ser un método barato, rápido y bastante versátil tal y como lo indican **Huang et al. (2017)** el proceso de secado induce a un estado de inactivación celular por la brusca pérdida de agua por lo que es necesario añadir un agente protector, por lo tanto la duración del producto secado será mayor. Durante el secado se usan matrices proteicas como el suero de leche o se realizan inmobilizaciones en matrices como el alginato de calcio, es por eso que en este proyecto las matrices de microencapsulación son polisacáridos asimilables

por el organismo humano y microbiano como por ejemplo la goma arábica y la maltodextrina pero siempre es necesario realizar una comparación con las matrices proteicas, en este caso proteína concentrada de suero.

El secado por aspersión no se limita únicamente a ingredientes farmacéuticos sino también en productos de uso diario no farmacéutico como bebidas funcionales o jugos deshidratados y es ese amplio uso para los microencapsulados que los convierte en elementos bastante versátiles, por lo que si se mantienen las condiciones óptimas al momento de la microencapsulación, tanto la actividad como la viabilidad del probiótico microencapsulado se verán adecuadas en su paso por el tracto gastrointestinal pero para lograr esto se debe tener especial cuidado con mantener la temperatura de salida en el proceso de secado entre 60 °C y 90 °C con el fin de que el conteo de células viables sea el mayor y se reitera que, el uso de una matriz protectora **(Broeckx et al., 2017)**.

La elaboración de probióticos microencapsulados constituye un gran avance en el área biotecnológica pues permite ofrecer un producto estable con impacto en la salud de los ciudadanos y que mejor que realizar investigaciones de esta índole en la academia cuyo compromiso es el generar conocimiento que mejore la calidad de vida. Este proyecto es novedoso en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos debido a que si bien se han realizado anteriormente estudios de microencapsulación ha sido únicamente de compuestos como por ejemplo aceites, extractos vegetales y componentes bioactivos pero no hasta el momento de un microorganismo vivo de por sí, por lo que sería la primera investigación realizada dentro de este ámbito de operación en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato. Así este proyecto es capaz de lograr que se formen las bases para que futuros estudiantes desarrollen nuevas tecnologías que complementen o mejoren el presente trabajo de investigación a través de diversas propuestas que puedan surgir una vez terminado el trabajo de investigación.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

- Microencapsular células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* para obtener un producto probiótico con alta viabilidad.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de diferentes matrices poliméricas sobre la viabilidad de levadura *Saccharomyces cerevisiae* microencapsulada mediante secado por aspersión.
- Caracterizar la morfología, calidad superficial y viabilidad del microencapsulado más eficiente.
- Medir la viabilidad del microencapsulado de levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante una curva de cinética de crecimiento.
- Determinar el coeficiente de transferencia de masa por parte de la matriz polimérica hacia el medio intestinal simulado.

## CAPITULO II

### MARCO TEORICO

#### 2. Antecedentes investigativos

##### 2.1.1. El porqué de microencapsular

El principal fin de la microencapsulación de microorganismos vivos es mantener su viabilidad y que de esta manera funcionen como probióticos pues este tipo de microorganismos mueren en pH inferiores a 2 en tiempos de exposición de una hora o más por lo que la tasa de efectividad se reduce a un 75 % y si son suministrados oralmente, se ve una recuperación menor al 1 %. Para esto se prepara una suspensión acuosa de la levadura y para las microesferas un copolímero de ácido acrílico y alginato de sodio (**Graff, Hussain, Chaumeil, & Charrueau, 2008**). Los polímeros para microencapsular o inmovilizar a los microorganismos deben tener propiedades biodegradables o alimenticias además de ser disponibles, baratas y si es posible ser insolubles a pH ácidos y temperaturas relativamente bajas como la corporal, generalmente se atrapa a las levaduras en matrices sólidas para conseguir con esto una gran concentración de biomasa en toda la esfera en materiales como alginato, el carragenato y el agar pues estos compuestos son polimerizables en condiciones suaves de pH y temperatura además de poseer las propiedades mencionadas anteriormente (**Fajardo, 2011**).

El microencapsulado debe sobrevivir el paso por el estómago para ello debe ser capaz de resistir condiciones ácidas, pues el jugo gástrico es una solución de HCl con cantidades mínimas de  $H^+$  y  $K^+$  en condiciones de ayuno mientras que al momento de la ingesta de comida la concentración de  $H^+$  aumenta considerablemente, lo que reduce el pH de la solución hasta un valor de 1, además debe ser resistente a la acción de proteasas como la pepsina y quimotripsina. Estos componentes aparte de la acción digestiva se encargan de esterilizar la comida presente en el organismo (**Cienfuegos, 2010**). Una vez preparado lo ingerido pasa en primer lugar hacia el intestino delgado donde ocurre la verdadera digestión y asimilación o absorción de los componentes, aquí participa la bilis, amilasa, tripsina, disacaridasas y lipasas en conjunto con el jugo gástrico, posteriormente en el intestino grueso se dará la absorción de electrolitos y agua en pequeñas cantidades. En el duodeno, el jugo gástrico se neutraliza al

mezclarse con bicarbonato presente en el jugo pancreático creando un ambiente ideal para la acción de enzimas como tripsina y quimotripsina. En el intestino grueso materiales como la fibra se ven fermentados por la acción de bacterias que habitan en esta porción del tracto digestivo conocidas como probióticos, dicha fermentación genera nutrientes para las células del colon (**Cascales & Doadrio, n.d.**).

### **2.1.2. Formas de microencapsulación**

Según **Mendoza, (2015)**, la microencapsulación tiene componentes como el material activo que es el material a microencapsular, mientras que el que lo recubre se denomina agente de microencapsulación, estos últimos son matrices homogéneas o heterogéneas capaces de proteger al material activo de otros compuestos que puedan degradarlo tal como la luz u oxígeno además de factores ambientales que alteran las propiedades nutricionales de los probióticos como es la intención de usar la levadura. Así puede realizarse una microencapsulación por diversos métodos, entre ellos se tienen al secado por aspersión que se conoce también como secado por atomización o pulverización, es un método físico en el que por medio de la atomización de la suspensión a secar en forma de finas gotas, la cual se seca instantáneamente al tener contacto con el aire caliente. También se tiene la polimerización interfacial donde un monómero contenido en la interface de dos sustancias inmiscibles se polimeriza y forma una membrana que será la matriz de la microcápsula. Primero debe obtener una dispersión en fase orgánica de una solución acuosa, luego se forma una membrana polimérica en la superficie de las gotas de agua formadas por la adición de una sustancia soluble en la fase orgánica, finalmente se centrifugan las microcápsulas formadas en la fase orgánica transferidas a la fase acuosa. Otra forma de realizar microencapsulación es la incompatibilidad polimérica la cual consiste en una separación de fases de dos polímeros incompatibles químicamente en un mismo disolvente por lo que el material a microencapsular reacciona únicamente con un polímero por procesos de adsorción lo que forma una membrana, generalmente se usa para agentes sólidos en disolventes orgánicos. Finalmente está la coacervación, que es capaz de formar microcápsulas de hasta 4  $\mu\text{m}$  por ser un método fisicoquímico donde se separan tres fases inmiscibles que son una líquida, otra que tiene el agente y la última es la cubierta. Tiene una efectividad de

encapsulación de un 90 % y es capaz de proteger las sustancias contra procesos de volatilización y de oxidación además de conferirle resistencia al microorganismo una resistencia a temperatura, pH, y determinados solventes que son capaces de dañar al organismo y que por lo general no puede ser expuesto, motivo por el cual el secado por aspersión es la alternativa adecuada para la microencapsulación de organismos vivos por sobre las otras técnicas mencionadas (**Martín, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales, 2015**).

### **2.1.3. Evaluación por métodos de disolución**

Para probar el comportamiento de las microcápsulas, es decir que esta cumple su propósito se realizan pruebas de disolución, dichas pruebas son generalmente usadas en el ámbito farmacológico para medicamentos de dosificación oral tal como microencapsulados. En este caso se usará con el fin de probar la viabilidad y resistencia del microencapsulado en condiciones similares a las presentes en el sistema digestivo y se pueda determinar la efectividad del polímero empleado en la microencapsulación de la levadura. Estas pruebas se realizan con diversos aparatos descritos en la USP (, denominados como aparatos: 1. Cesta giratoria, 2. Paleta rotativa, 3. Cilindro reciprocante, 4. Celda de flujo continuo, 5. Paleta sobre disco, 6. Cilindro giratorio 7. Varillas/holders reciprocantes (**Befumo, 2018**).

Los métodos más comúnmente utilizados son los aparatos de cesta y de paleta por ser los que se encuentran en su mayoría estandarizados y normalizados además de contar con una mayor robustez (**QuimiNet, 2006**), la FDA (Administración de alimentos y fármacos por sus siglas en inglés) indica que “Se deberán realizar las pruebas de disolución bajo condiciones de prueba suaves, método de cesta a 50/100 rpm o método de paleta a 50/75 rpm, en intervalos de 15 minutos, para generar un perfil de disolución” según el perfil que se genere se clasifica en: Prueba de disolución del producto medicinal del estándar de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) disponible, Prueba de disolución del producto medicinal de USP no disponible; prueba de disolución para el producto medicinal de Solicitud de nuevos fármacos (NDA por sus siglas en inglés) de referencia que figura en la lista disponible al público y Prueba

de disolución del producto medicinal de USP no disponible; prueba de disolución para el producto medicinal de NDA de referencia que figura en la lista no disponible al público, siendo esta última donde el rango de pH para el estudio varía de 1 a 6,8, se hace uso de los aparatos USP 1 y 2 con velocidades variables (**Center for Drug Evaluation and Research, 1997**). Sin embargo para medios ácidos las condiciones de operación son una agitación de hasta 120 rpm, con volúmenes de HCl 0,1 mol/l que van hasta los 500 mL durante un periodo de 30 minutos en los que se puede ir tomando una muestra cada determinado tiempo (**García et al., 2009**) mientras que si las condiciones de disolución son en agua destilada, el volumen puede llegar a los 1000 mL en un rango de hasta 200 rpm en periodos de 1 hora, en ambos aparatos la temperatura trata de simular la corporal siendo esta de 37 °C con un rango de  $\pm 5$  °C (**Rodríguez & Gil, 2012**).

#### **2.1.4. Secado por aspersion**

El método de secado por aspersion es una técnica capaz de mantener microorganismos viables sin afectar sus propiedades metabólicas gracias a los materiales de recubrimiento que han de formar la matriz, siempre y cuando la temperatura de salida no exceda la temperatura en la que la célula se mantenga viable como señalan **Paim, Costa, Walter, & Tonon (2016)** en su investigación de microencapsulación de probióticos de Jussara, donde se probaron formulaciones de dextrina ya sea sola o mezcladas en proporciones con inulina u oligofruktosa donde el mejor conteo de células viables se alcanzó en la mezcla de 50 % inulina y 50 % maltodextrina lo que la convierte también en una mezcla ideal gracias a su baja higroscopicidad y por su capacidad de mantener el pH estable en valores entre 6,4 y 6,9 lo que garantiza la supervivencia celular.

La razón para microencapsular probióticos radica en que estos son capaces de prevenir enfermedades infecciosas del aparato enterogástrico como la diarrea además de mejorar el sistema inmunológico contra carcinógenos bacterias y efectos mutagénicos y es por eso que una vez más se observa a la maltodextrina como matriz microencapsulante pero esta vez actúa en conjunto con goma arábica y proteína

concentrada de lactosuero estas se mezclan en agua destilada con un agitador magnético como lo indican **Arslan, Erbas, Tontul, & Topuz (2015)** donde la mejor matriz de microencapsulación es el lactosuero pues mantiene un mayor recuento de células viables y una humedad cercana a los parámetros de almacenamiento y del mismo modo uno de los menores diámetros de los microencapsulados además de sus rangos de supervivencia de 91,81 % en promedio más no en condiciones ácidas donde sobresale la matriz de gelatina.

Por su parte **Liao et al. (2017)** proporcionaron aislamiento de *Lactobacillus casei* por el método de secado por aspersión en regímenes de temperatura de 70 °C y una alimentación de 320 ml/h donde la mejor microencapsulación se dio con leche descremada por sus tiempos de supervivencia y diferentes temperaturas de almacenamiento a esto se añade la capacidad de la leche descremada de proteger a la bacteria del paso por el estómago lo que le permite llegar al intestino relativamente intacta y así aprovechar su función como probiótico.

Se determinó el tamaño de partículas de los productos obtenidos por diferentes métodos según **Martín, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales (2015)** la extrusión, gelación externa, lecho fluidizado, secado frío, secado por aspersión e impregnación de los cuales se nota un tamaño de partículas de 189 µm, 0,5-1 mm, 15-40 µm, 3-75 µm o 11,23 µm y 10-40 µm respectivamente a excepción del secado frío donde el tamaño no se ha determinado con exactitud. De todos los métodos estudiados el más sobresaliente para producción de probióticos es el del secado por aspersión por su rango según la aplicación además de ser económico, pues usa matrices simples aunque se ve con limitaciones por la temperatura ya que las bacterias pueden verse afectadas.

Continuando con la experimentación se tienen los trabajos de **Huang, Méjean, et al. (2017)** quienes trabajaron con bacterias del tipo *L casei* BL23 y *P. freundenreichii* ITG P20 las cuales fermentaron un medio de suero dulce inoculándose 1 % v/v con 72 h para *P. freundenreichii* y 32 h para *L. casei* para agitar 20 minutos y realizar 3 escalas de secado por aspersión para cada bacteria de los cuales el primero es un secado de escala simple o de laboratorio, la segunda escala pasa por un lecho fluidizado donde se almacena y acondiciona el microencapsulado mientras que la tercera pasa por un cinturón de secado con una temperatura mayor que la de salida de aire y posteriormente hasta un lecho fluidizado con una temperatura similar a la del aire de salida para



obtener finalmente el polvo, teniéndose una actividad de agua en el polvo generado, un promedio de 0,27 para *L. casei* y 0,28 para *P. freundenreichii*. Para ambos tipos de bacterias, la mayor viabilidad se ve en el tercer proceso esacalado de secado por aspersión lo que a su vez le confiere una resistencia a contaminación por coliformes pero no es capaz de eliminar organismos termófilos aunque si garantiza una supervivencia en su paso por el sistema gástrico.

Esto conduce a establecer algunos parámetros en el secado por aspersión detallados por **Huang, Vignolles, et al. (2017)** donde, al probarse en diferentes medios de crecimientos muchos tipos de bacterias para microencapsularlas en varias matrices se logró determinar que deben generarse condiciones de adaptación para las bacterias previo al proceso de secado por aspersión pues esto ayudará a que la bacteria se adapte al estrés generado por el proceso lo que hará que mejore su viabilidad y tiempo de almacenamiento y que se puede usar un medio protector para el microencapsulado como carbohidratos pues genera resistencia al secado y al transitar por el tracto gástrico. Mas existen algunas desventajas pues esto solo se ha probado a escala de laboratorio además que el secado por aspersión ocupa mucho más material que el secado por goteo y no contempla generaciones de probióticos que son más frágiles como *Akkermansia muciniphilia*.

Ahora bien, la levadura puede pasar de ser el agente microencapsulado a ser el agente microencapsulante como lo detallan **Nelson, Duckham, & Crothers (2006)** con sus dos experimentos; el uno muestra la elaboración de una goma de mascar de menta cuyo sabor se ve prolongado gracias al efecto de la microencapsulación en levaduras, mientras que el segundo experimento es la administración de dos fármacos a la especie Canina beagle en tres variedades de levadura lo que permitió que el fármaco se cargase en concentraciones de 100 a 200 mg por gramo de levadura. Aquí el fármaco A se carga mejor en las variedades de levadura 1 y 2 mientras que el fármaco B lo hace en la variedad 2.

#### **2.1.5. Condiciones de operación**

Una parte importante del secado por aspersión que se ha mencionado anteriormente pero de forma superficial son las temperaturas de operación, tanto de salida como de entrada con la cual se realice la microencapsulación y así se demuestra en la experiencia de **Díaz-Martínez, Serna-Jiménez, & Torres-Valenzuela (2016)** en la

que se probaron cinco temperaturas de secado para definir tamaño de partícula, rendimientos, actividad de agua y contenido de humedad. Las temperaturas fueron de 80 °C, 90 °C, 100 °C, 110 °C y 150 °C con una concentración del 50 % del material de recubrimiento (maltodextrina) para la enzima Proteasa alcalina. En cuanto al rendimiento, el mayor valor se obtuvo para el tratamiento de la temperatura de 100 °C, mientras que para el tamaño de partículas, todas las temperaturas contemplan un valor que oscila en el rango promedio y finalmente para la actividad de agua y humedad el mejor tratamiento es el de la temperatura de 90 °C por ser microbiológicamente estable según detalla, sin embargo también se menciona que deben tenerse en cuenta varios parámetros como la alimentación de aire y de solución, pues influyen directamente sobre la formación de las microcápsulas al igual que la presión del aire de alimentación y la concentración de la matriz microencapsulante, pues estos parámetros además influyen sobre la supervivencia celular y la humedad presente en el polvo resultante **(Shokri, Fazeli, Ardjmand, Mousavi, & Gilani (2015))**. Una vez elaborado el microencapsulado se somete al polvo a la prueba de simulación convencional la cual simula condiciones de pH y temperatura tanto del estómago como del intestino delgado siendo para este último un valor medio de 6,5 con concentraciones de enzimas pancreáticas en rangos de 1 a 10 g/L y fosfato ácido de potasio al 0,05 mol/L y un tiempo de exposición a esta solución de 120 minutos **(Juárez & Jiménez, 2013)**.

## **2.2. Hipótesis**

### **2.2.1. Hipótesis nula**

La matriz polimérica y su concentración no inciden sobre la viabilidad del microencapsulado de *Saccharomyces cerevisiae*.

### **2.2.2. Hipótesis Alterativa**

La matriz polimérica y su concentración inciden sobre la viabilidad del microencapsulado de *Saccharomyces cerevisiae*.

## **2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis**

### **2.3.1. Variables dependientes**

Viabilidad de *S. cerevisiae* frente al proceso de microencapsulación

### **2.3.2. Variables Independientes**

Concentración de matriz microencapsulante

## CAPITULO III

### MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Materiales, equipos y reactivos

##### 3.1.1. Materiales

La realización del proceso requirió materiales como: Pipetas graduadas estériles de 5 y 10 ml, vasos de precipitación de 500 ml, probetas graduadas de 100 ml, tubos de centrífuga (tubos Falcon) de 50 ml marca Boeco<sup>®</sup>, pera de succión, botellas de cristal borosilicato con tapa azul de 250 ml, microplaca de 96 pocillos para espectrofotómetro (Corning<sup>®</sup> Costar<sup>®</sup>), biorreactor de acero inoxidable, matraz Erlenmeyer de 250 y 1000 ml, micropipetas de 10 - 1000  $\mu$ l, espátulas, cucharillas, fundas de cierre hermético, papel de filtro, agitadores de núcleo magnético, tubos bacteriológicos de 15 ml, agitador de vidrio.

##### 3.1.2. Equipos

Para el cultivo de la levadura se empleó una plancha de calentamiento (Corning PC-620D), agitador de barras (Stuart), autoclave (Hirayama HICLAVE<sup>™</sup> HV-85). Para el proceso de preparación de la suspensión se utilizó una centrífuga (Rotina 380), balanza analítica (Ohaus Adventurer-Pro), balanza de humedad (MRC mb500), vórtex (Fisher Scientific), dispersor de alta velocidad, cámaras de flujo laminar (ESCO Opti.MAIR). La microencapsulación se realizó en un Secador por Aspersión (BÜCHI mini spray-dryer B-290). Finalmente las curvas de crecimiento se realizaron en un espectrofotómetro (Fisher Scientific accuSkan GO) y la caracterización de la forma y superficie de las micropartículas en un microscopio electrónico de barrido perteneciente a la facultad de Ingeniería Civil y Mecánica con sistema operativo VEGA3 TESCAN, mientras que para determinar la transferencia de masa se hizo uso de un viscosímetro Ostwald

Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico StatGraphics Centurion XVI.I y Software de espectrofotometría Skanlt RE5.0

##### 3.1.3. Reactivos

Para el cultivo de la levadura se empleó Levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* de Levapan y agua destilada estéril junto con el medio de cultivo YPD (Alpha Biosciences<sup>™</sup>).

La preparación de la suspensión para el proceso de microencapsulación se empleó los polímeros maltodextrina, goma arábica y proteína concentrada de suero (24,78 % de sólidos totales), agua destilada estéril, levadura lavada. Esta suspensión se usó en el proceso de microencapsulación.

Para la determinación de viabilidad se empleó el medio de cultivo como blanco para el espectrofotómetro, producto microencapsulado, solución de fosfato ácido de potasio 0,05 mol/l y para la lectura SEM cinta adhesiva de carbono.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Preparación de la levadura**

Se cultivó *Saccharomyces cerevisiae* a partir del producto comercial “Levapan” en medio líquido YPD (cuya composición consta de 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de dextrosa para dar un total de 50 g/L con pH de 6,5), el cual se disolvió en agua destilada y fue esterilizado en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Se pesaron 7 gramos de levadura y se inocularon en un volumen de 500 mL de medio de cultivo y se incubó por 18 horas a una temperatura de 37 °C. Se centrifugó la levadura obtenida a 5000 rpm durante 25 min. Se descartó el sobrenadante y se realizaron lavados en el pellet de biomasa con una cantidad igual del medio descartado hasta que no se logró evidenciar medio de cultivo en el sobrenadante.

Se determinó la cantidad de sólidos de la biomasa obtenida haciendo uso de una balanza de humedad, restando el resultado final del 100 %. Se mezclaron además las células de levadura en solución, con las matrices de microencapsulación homogeneizadas previamente con un dispersor de alta velocidad. Las matrices de microencapsulación fueron maltodextrina, mezcla de maltodextrina con goma arábica en diferentes proporciones, las cuales se detallan en la tabla 1 y proteína concentrada de suero con un contenido de sólidos totales de 24,78 %, con proporciones para cada polímero:

**Tabla 1***Matrices poliméricas y concentración polímero-levadura*

Polímero	Proporción polímero : levadura
Maltodextrina (MD)	50:50
	60:40
	70:30
Maltodextrina + Goma Arábica (MDGA)	25-25:50
	30-30:40
	35-35:30
Proteína concentrada de suero (PCS)	50:50
	60:40
	70:30
Maltodextrina (MD) sin lavado	70:30
Levadura sin recubierta polimérica	0:100

Se calculó su proporción respecto a la levadura lavada mediante una relación

$$\frac{g \text{ Levadura} * \text{proporción de polímero}}{\text{proporción de levadura}} \quad (1)$$

Se diluyó en 100 mL de agua destilada estéril o se completó el volumen si la levadura contenía agua tras el lavado.

### 3.2.2. Microencapsulación

Se alimentó la mezcla levadura-matriz al secador por aspersion a un flujo de aire de secado de 50 m<sup>3</sup>/h, flujo de aire de alimentación de 500 l/h, a una temperatura de entrada del aire de 130 °C, y a temperatura de salida del aire de 70 °C, ambas con un rango de ± 2 °C . Se agitó periódicamente la solución con una varilla de agitación de vidrio para evitar la acumulación de sólidos en el fondo del recipiente y asegurar que la solución alimentada permaneciera homogénea. Una vez colectado el microencapsulado, se almacenó en una funda de sello hermético con el fin de preservar en el tiempo e impedir la absorción de humedad. La funda se pesó con anterioridad para tener el peso neto del microencapsulado.

### 3.2.3. Procedimiento de análisis de los resultados

Se calculó el rendimiento en porcentaje peso/peso (% p/p) relacionando el peso inicial de levadura, con el del microencapsulado, medidos en una balanza analítica. Para definir el polímero más eficiente en el proceso de microencapsulación, se determinó la viabilidad de las células de levadura microencapsulada con una curva de crecimiento mediante datos de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro con lector de microplacas, también se calculó la velocidad de crecimiento de la levadura microencapsulada.

Para determinar el dato de absorbancia se preparó la muestra de cada microencapsulado mediante una dilución 1/10 guiándose en la siguiente fórmula para el respectivo cálculo:

$$\frac{1g \text{ Muestra}}{1g \text{ Muestra} + 9ml \text{ Diluyente}} \quad (2)$$

El diluyente fue una alícuota de medio de cultivo YPD con el cual se realizó el crecimiento inicial, también se tomó en cuenta la cantidad de levadura según la proporción microencapsulado-levadura, dicho procedimiento se realizó por triplicado. Una vez realizada la dilución se tomó una alícuota de 3  $\mu$ L y se colocó en la bandeja de micropocillos, en la cual la primera fila fue asignada para los blancos, para cada microencapsulado y las réplicas se colocaron en columna debajo de cada blanco.

En el caso de la velocidad de crecimiento se realizó una gráfica de las absorbancias medidas con el fin de obtener una representación visual donde se pudo identificar la zona de crecimiento exponencial y lograron determinarse pendiente y corte con las abscisas mediante una regresión lineal de la parte de crecimiento exponencial cuya variable independiente fue el tiempo de lectura. La velocidad de crecimiento se calculó despejando la variable x de la ecuación de la recta obtenida.

Tanto para la absorbancia y para la velocidad de crecimiento se determinaron sus valores a las 2 semanas y a las 6 semanas después de haber encapsulado la levadura y los datos se analizaron con el programa StatGraphics con la herramienta Análisis de Varianza (ANOVA) perteneciente a la sección Análisis de Datos para Datos Continuos

y se escogerá el microencapsulado que muestre una mayor media con respecto a los otros ensayos de microencapsulación.

#### **3.2.4. Escalado de la microencapsulación**

Una vez determinado el polímero más eficiente, se cultivaron 7 g de la levadura del producto comercial “Levapan” en un litro de medio YPD por lote discontinuo en un biorreactor de acero inoxidable con agitación constante en un agitador de barras (Stuart) por un periodo de 24 horas y se microencapsuló con el polímero más eficiente teniendo en cuenta la relación de masa de levadura y masa de polímero.

#### **3.2.5. Evaluación morfológica del microencapsulado**

Se analizó con un microscopio electrónico de barrido para determinar el diámetro medio de la microesfera, proceso en el cual se tomó una alícuota de la muestra la cual se fijó sobre un portamuestras de aluminio y una cinta conductora de carbono y se recubrió con oro por medio de un vaporizador de oro, con una corriente entre 24 y 27 mA, y 2 atm de vacío por 80 s por lo que produjo una capa de 20 nm de espesor aproximadamente. Los portamuestras se insertaron en el microscopio electrónico de barrido para observar las microesferas con un voltaje de 5 kV lo que generó varias imágenes en el software especializado VEGA3 TESCAN.

#### **3.2.6. Ensayo de supervivencia en fluido intestinal simulado**

Posteriormente el polvo recuperado se sometió a una solución de fosfato ácido de potasio al 0,05 mol/L, simulando el paso del microencapsulado por el estómago hasta el intestino con el fin de calcular un coeficiente de transferencia de masa del polímero en el medio intestinal simulado. El cálculo de transferencia de masa se realizó mediante la fórmula de flujo sobre una esfera (número de Sherwood) mediante la ecuación:

$$Sh_D = 2 + 0.4 \left( Re_D^{\frac{1}{2}} + 0.06 Re_D^{\frac{2}{3}} \right) Sc^{0.4} \quad (3)$$



Donde se determinó el flujo que genera la agitación y se tuvo en cuenta la densidad de la solución de fosfato ácido de potasio.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4. Análisis y discusión de resultados

##### 4.1. Análisis del proceso de Microencapsulación de levadura *S. cerevisiae* mediante Secado por aspersion.

Se presentan los resultados de rendimiento obtenido después del proceso de secado por aspersion al que se sometió el organismo de prueba *S. cerevisiae* el cual ha sido microencapsulado en diversas matrices poliméricas siendo estas maltodextrina DE 10 (M.D.), una combinación en iguales proporciones de maltodextrina DE 10 y goma arábica (M.D.+G.A.) y finalmente proteína concentrada de suero con un contenido de sólidos de 24,78 % (PCS).

Además se representa gráficamente la cinética de crecimiento del organismo *Saccharomyces cerevisiae*, el cual ha sido microencapsulado para verificar la viabilidad del proceso de secado por aspersion y de este modo también, se ha logrado determinar el polímero más viable.

##### 4.1.1. Rendimiento de la microencapsulación de *S. cerevisiae*

En la Tabla 2 pueden apreciarse las diversas matrices poliméricas con las cuales se realizó la microencapsulación, el tratamiento empelado y el peso resultante antes y después de microencapsular. En el ensayo se tienen dos controles siendo estos la matriz maltodextrina de tratamiento lavadura Sin lavar y el uso de ninguna matriz con tratamiento de levadura lavada. Los resultados obtenidos de rendimiento son un criterio de selección secundario para la matriz más óptima en caso de no existir diferencias significativas en el crecimiento de *S. cerevisiae* microencapsulado.

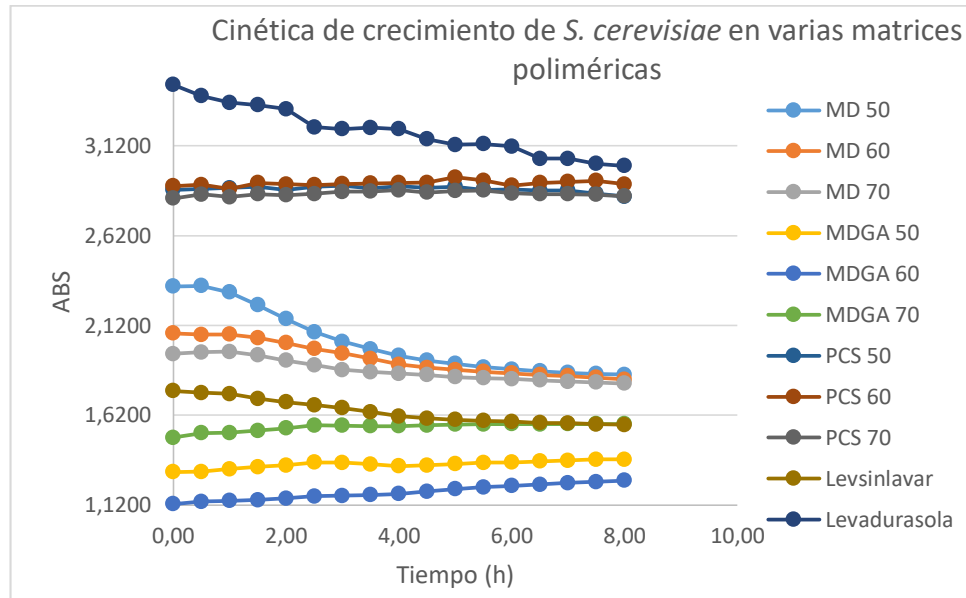
**Tabla 2***Rendimiento del proceso de Microencapsulación*

Matriz	Concentración	Tratamiento	Peso teórico (g)	Peso microencapsulado (g)	Rendimiento (%)
M.D.	(70:30)	Sin lavar	14,72	6,36	43,20
M.D.	(50:50)	Lavada	10,59	7,98	75,33
M.D.	(60:40)	Lavada	20,97	7,55	36,01
M.D.	(70:30)	Lavada	23,02	7,98	34,66
M.D.+G.A.	(50:50)	Lavada	19,44	9,72	50,00
M.D.+G.A.	(60:40)	Lavada	24,79	9,80	39,54
M.D.+G.A.	(70:30)	Lavada	27,91	12,25	43,89
Ninguna	(100:00)	Lavada	15,16	0,32	2,13
PCS	(50:50)	Lavada	20,06	7,57	37,75
PCS	(60:40)	Lavada	20,75	7,52	36,24
PCS	(70:30)	Lavada	100,00	13,10	13,10

Leyenda: M.D.: Maltodextrina, G.A.: Goma arábica, PCS: Proteína concentrada de suero lácteo.

#### 4.1.2. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* por el método de secado por aspersión

El uso de matrices microencapsulantes poliméricas provenientes de polisacáridos y sus combinaciones permiten la correcta conservación de la capa encapsulante, en este particular caso, la goma arábica al ser un compuesto electrolítico es capaz de mantener un pH ideal para la levadura además de formar cápsulas de diferentes tamaños a causa de las interacciones moleculares (**Pedroza, 2002**) con la Maltodextrina DE 10, esto se puede contrastar con la información representada en la figura 1, donde se observan los diferentes ensayos de cinética de crecimiento para las diferentes matrices poliméricas con sus diferentes concentraciones en relación matriz-levadura.



**Figura 1. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* microencapsulada en diversas matrices poliméricas**

La figura muestra ensayos que mantienen una buena viabilidad de la levadura tras ser encapsulada tales como la combinación de maltodextrina DE 10 y goma arábica (M.D.+G.A.) en proporciones iguales para dar un total de relación matriz encapsulante-levadura de 50:50, 60:40 y 70:30. Estas combinaciones muestran crecimiento tras la evaluación de su actividad después de 6 semanas de haber sido microencapsulada. Las matrices de únicamente maltodextrina DE 10 (M.D.) y proteína concentrada de suero (PCS) presentan fase de muerte celular o una fase estacionaria respectivamente, al igual que el control de levadura sin lavar y levadura sola sin matriz debido a que la proteína de suero no contiene azúcares que permitan el metabolismo celular.

#### **4.1.3. Selección del polímero más viable para la microencapsulación de *S. cerevisiae* por el método de secado por aspersión**

Para seleccionar el polímero más viable se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en el programa StatGraphics Centurion XVI.I usando los datos de concentración de microencapsulado de levadura, obtenidos por absorbancia tras un análisis de espectrofotometría. Este análisis representado como un diagrama de caja y bigotes (figura 2), muestra la media más alta como criterio de selección para el mejor polímero o la mejor combinación de matrices poliméricas.

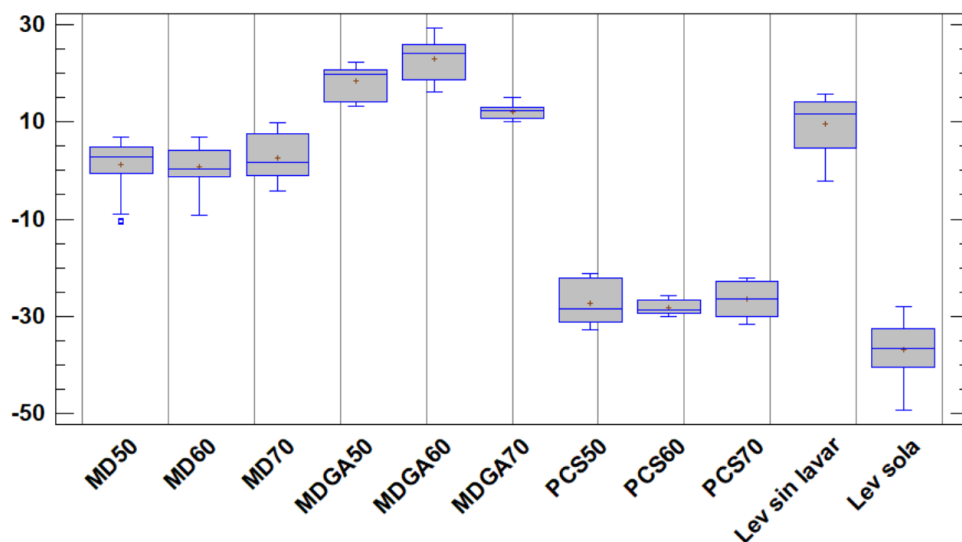


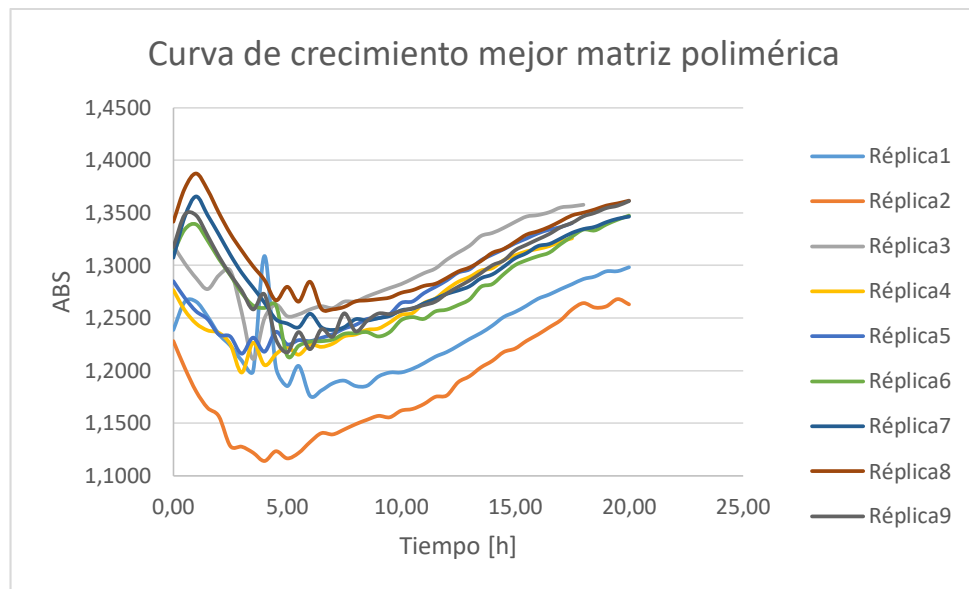
Figura 2. Diagrama de caja y bigotes obtenido del análisis de varianza para la concentración del microencapsulado

Se observa a la combinación M.D.+G.A. en proporción de matriz polimérica 60:40 de levadura contenida, seguida por M.D.+G.A. en proporción 50:50 y como tercera opción M.D.+G.A. en proporción 70:30. La selección del polímero más viable recae en la matriz polimérica de relación 60:40 debido a su contenido de maltodextrina DE 10, lo cual al igual que la goma arábiga, vuelve más estable la estructura del microencapsulado (**Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, 2011**), por lo que al juntar en mezcla y solución estas matrices la protección para el microorganismo es mucho más elevada que su acción por solitario y es incluso mayor que la proteína concentrada de suero.

#### 4.1.4. Evaluación cinética del crecimiento con el polímero más efectivo para la microencapsulación de *S. cerevisiae* por el método de secado por aspersión

Una vez seleccionado el polímero más efectivo, que proporcionó mayor crecimiento, siendo este la matriz M.D.+G.A. en proporción 60:40, se realizó un recultivo del cual se obtuvo 35,21 g de levadura la cual se microencapsuló por el método de secado por aspersión y cuya actividad se evaluó por medio de una cinética de crecimiento con el fin de verificar el correcto proceso de microencapsulación. Dicho resultado se puede apreciar en la figura 3 donde se observa un comportamiento similar en las nueve réplicas con una fase de decrecimiento correspondiente a la disolución del medio polimérico y posterior adaptación al medio de cultivo. A esta fase le sigue una de crecimiento. Esta

cinética se evaluó en un período de 20 horas y la replicación antes mencionada con el fin de reducir el error experimental y observar un comportamiento casi completo del microorganismo al salir del encapsulado. En la gráfica se puede observar también que gran parte de las réplicas tienen la misma concentración de levadura.



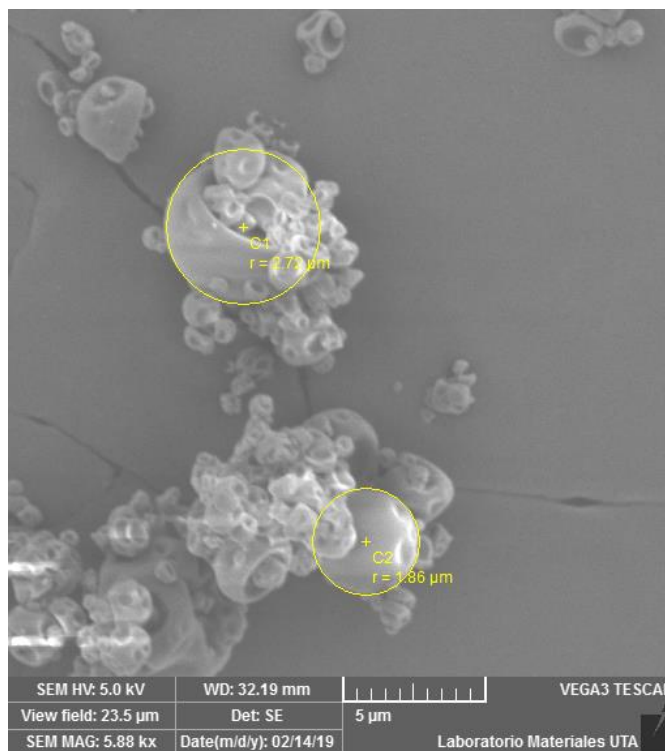
**Figura 3. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* microencapsulada en la matriz polimérica más viable**

Este comportamiento se debe a que la maltodextrina presente en la pared de la microcápsula al diluirse en el medio de cultivo, forme monómeros altamente digestibles asimilables por la levadura y también por el tracto gastrointestinal (TGI) humano (Plaza-Díaz, Augustín, & Hernández, 2013), es por eso que se nota un crecimiento a partir de la quinta hora de medición de cinética de crecimiento además de servir como nutrientes para el huésped y otros organismos habitantes del TGI aumentando así la efectividad de la propiedad probiótica.

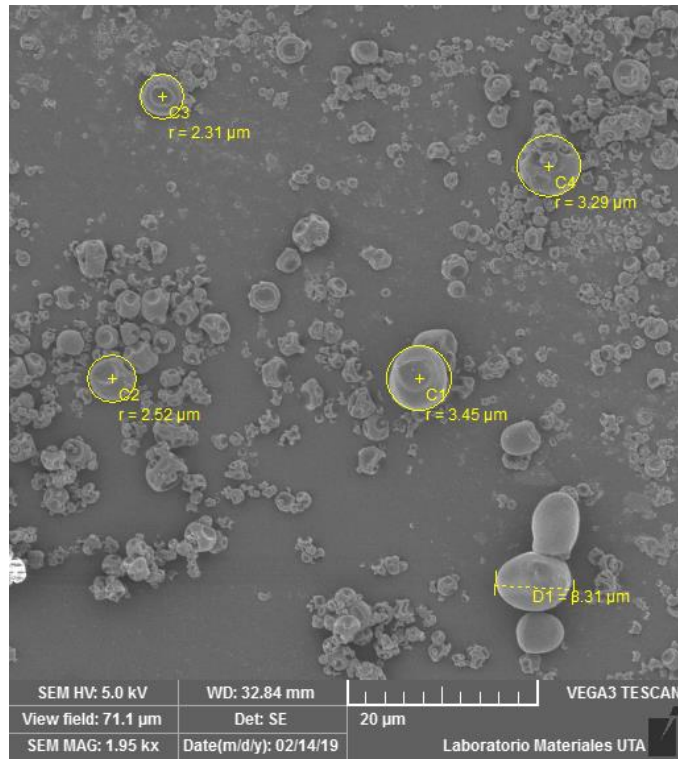
#### 4.1.5. Descripción, tamaño y morfología de las microcápsulas

Se observaron muestras de las microencapsulaciones en matrices poliméricas de relación polímero-levadura 50:50, 60:40 y 70:30 de la combinación Maltodextrina DE 10 y Goma arábiga por medio de microscopía electrónica de barrido (Swept electronic microscopy: SEM), con el fin de determinar la forma

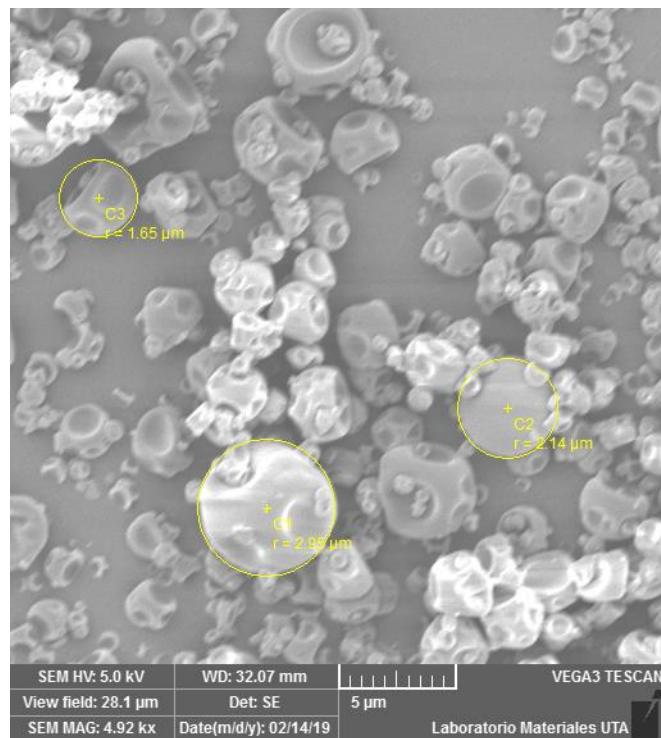
que toman las partículas después del proceso de microencapsulación y también tener una medida aproximada del radio de las partículas, estas medidas pueden apreciarse en las figuras 4,5 y 6 para las relaciones de concentración 50:50, 60:40 y 70:30 respectivamente, además, también se puede observar la forma para cada matriz donde la relación 60:40 (figura 5) tiene la mayor cantidad de esferas perfectamente formadas con una superficie lisa y menor cantidad de estructuras colapsadas a diferencia de las relaciones poliméricas 50:50 y 70:30 (figuras 4 y 6) las cuales presentan en su gran mayoría formas irregulares de superficies rugosas lo que representa un colapso en la microcápsula. De las relaciones poliméricas observadas por la técnica SEM se logra mirar en las imágenes obtenidas que, la mayor concentración de microencapsulados está presente en la relación 60:40 a diferencia de las relaciones poliméricas 50:50 y 70:30 las cuales en comparación, tienen una población menor de microencapsulados tal como se puede apreciar en la figura 7.



**Figura 4. Imagen SEM de microencapsulado de levadura *S cerevisiae* con relación 50:50 matriz-levadura**

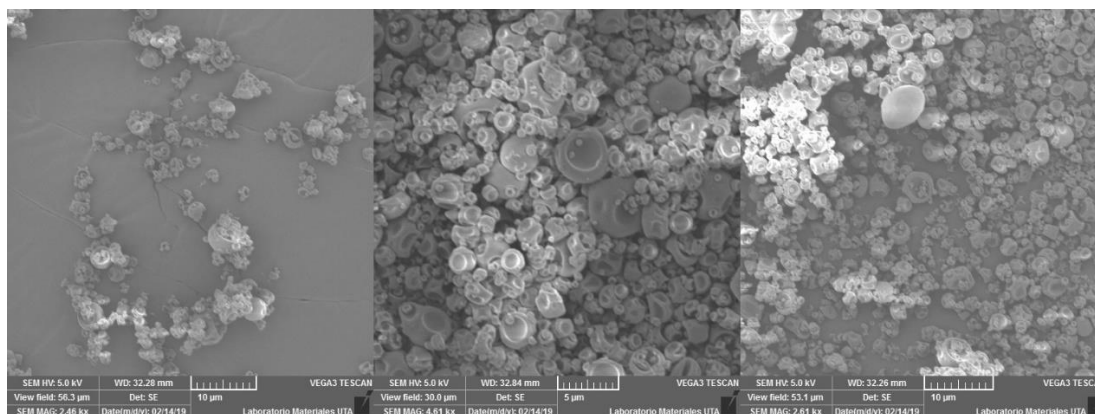


**Figura 5. Imagen SEM de microencapsulado de levadura *S cerevisiae* con relación 60:40 matriz-levadura**



**Figura 6. Imagen SEM de microencapsulado de levadura *S cerevisiae* con relación 70:30 matriz-levadura**





**Figura 7. Imagen SEM de microencapsulado de levadura *S cerevisiae* en comparación de población de microencápsulas para relaciones de matriz-levadura de 50:50, 60:40 y 70:40**

Las estructuras colapsadas en las figuras 4, 5, 6 y 7 se debe a la propia naturaleza de la matriz encapsulante, pues como lo reportan **Kagami et al., (2003)**, determinados carbohidratos no pueden cumplir los requisitos necesarios para la formación de la microcápsula como es la capacidad emulsificante, un ejemplo es el polímero maltodextrina DE 10 y es por eso que se le añade goma arábica como complemento por su gran actividad emulsificante.

Tras analizar la forma de la superficie de las microcápsulas se infiere que, las estructuras colapsadas (aquellas que tienen depresiones) tienen mayor cantidad de uno de los carbohidratos mencionados anteriormente en esas zonas, mientras que las partes más lisas y uniformes guardan relación entre las proporciones de las matrices poliméricas lo que convertiría a esta corteza en un protector del núcleo con grandes propiedades antioxidativas y estables ante el pH y la disociación en el medio (**Gallardo et al., 2013**).

#### **4.1.6. Coeficiente de transferencia de masa**

Para el cálculo de este parámetro se tomó el diámetro medio del microencapsulado con proporción matriz polimérica-levadura 60:40 el cual tiene una media igual a 5,0775  $\mu\text{m}$  y cuyos valores individuales se pueden observar en la tabla 3 y también en las figuras que están colocadas en los anexos. Se hizo uso además de un densitómetro para calcular la densidad del fosfato monoácido de potasio que simula las condiciones intestinales, para determinar la densidad del fluido se hizo uso de un viscosímetro Ostwald del cual se

realizaron 10 réplicas para determinar la viscosidad de la solución de fosfato monoácido de potasio tomando el tiempo que tarda en cruzar las marcas de aforo el líquido en cuestión, registrado en la tabla 4. Además para la determinación de viscosidad de la solución 0,1 mol/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> se usó la expresión 4 donde se realiza una iteración para cada uno de los diez tiempos medidos y realizando un promedio de las viscosidades obtenidas siendo estas los valores registrados en la tabla 5, y para el cálculo la transferencia de masa se tomó el valor de viscosidad promedio.

$$\eta = \eta_{H_2O} \frac{\rho t'}{\rho_{H_2O} t} \quad (4)$$

**Tabla 3**

*Medidas tomadas para el cálculo del diámetro medio aproximado*

Radio aproximado medido	Diámetro aproximado (µm)
1,87	3,74
1,68	3,36
2,31	4,62
3,29	6,58
2,52	5,04
3,45	6,9
8,31	8,31
1,80	3,60
0,97	1,94
1,37	2,74
3,42	6,84
3,63	7,26
<b>Diámetro medio aproximado</b>	<b>5,0775</b>

Ensayo realizado para microencapsulado con proporción matriz polimérica-levadura 60:40

**Tabla 4**

***Tiempo medido para la determinación de viscosidad de  $K_2HPO_4$  0,1 mol/l***

Réplica	Tiempo registrado (s)
1	10,23
2	9,71
3	10,15
4	10,22
5	10,25
6	10,30
7	10,17
8	10,21
9	10,23
10	10,27
<b>Promedio</b>	<b>10,174</b>

**Tabla 5**

***Viscosidad de  $K_2HPO_4$  0,1 mol/l***

Réplica	Tiempo registrado (s)	Viscosidad (Pa.s)
1	10,23	0,00100161
2	9,71	0,00105525
3	10,15	0,0010095
4	10,22	0,00100259
5	10,25	0,00099965
6	10,30	0,0009948
7	10,17	0,00100752
8	10,21	0,00100357
9	10,23	0,00100161
10	10,27	0,00099771
<b>Promedio</b>	<b>10,174</b>	<b>0,00100738</b>

La difusión presentada es un movimiento individual de las moléculas hacia el fluido en contraste con su solubilidad (Voisin, 2005). Se realizó la determinación del coeficiente de transferencia de masa del microencapsulado separando los componentes de la ecuación (3) para calcular primero el número

adimensional de Reynolds para un flujo sobre una esfera con la ecuación (5) para tener un valor igual a 3,12E-02

$$Re_D = \frac{\rho v_s D}{\mu} \quad (5)$$

El siguiente número adimensional a calcular para conocer la transferencia de masa del microencapsulado de levadura a la solución, es el número de Schmid presente también en la ecuación (3) el cual viene definido por la expresión (6)

$$Sc = \frac{\mu}{\rho D_{AB}} \quad (6)$$

Para esto se definió la difusividad aproximada en el sistema biológico mediante la ecuación semiempírica de Polson para una temperatura y un peso molecular dado, en este caso, el peso molecular de la sustancia equivale a la suma de ambas matrices siendo de 1740 kg/kgmol para maltodextrina DE 10 y de 425000 kg/kgmol para goma arábica dando un total de 426740 kg/kgmol.

$$D_{AB} = \frac{9.40 \times 10^{-15} T}{\mu (M_A)^{1/3}} \quad (7)$$

Donde el valor obtenido para difusividad es igual a 3,59428E-11 m<sup>2</sup>/s, mientras que para el número de Schmid se obtuvo un valor de 5,51995E+12, a lo cual se reemplazó los valores calculados en la ecuación (3) para obtener un número de Sherwood (Sh) de 299,21 el cual se acerca al límite del número conforme el diámetro de la partícula se reduce en tamaño. Esto indica la difusividad de la masa del microencapsulado a través de la simulación de las condiciones del intestino.

#### 4.1.7. Prueba de disolución del microencapsulado

Para contrastar el coeficiente de transferencia de masa se realizó una prueba de disolución al microencapsulado con proporción 60:40 de matriz polimérica-levadura que corresponde a USP 2 a una velocidad de 60 RPM y probando 3 concentraciones de microencapsulado (tabla 6).

**Tabla 6***Prueba de disolución para microencapsulado*

Volumen de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)	Concentración de microencapsulados (g)	Tiempo de disolución (min)
500	2	65
500	3	105
500	5	213

Tras la evaluación de disolución se logró observar que, para una concentración de dos gramos de microencapsulado se da una disolución total en un tiempo de 65 minutos. El mismo resultado pero con una diferencia de 40 minutos se notó para la concentración de 3 g en la solución.

Para la concentración de 5 g en la solución se ve un tiempo mayor, de 213 minutos y que a su vez, presenta aglomeraciones en la superficie y en la profundidad del recipiente lo que indica una saturación completa de la solución.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Se definió la mejor matriz polimérica para el proceso de microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae* siendo esta la matriz formada por la combinación de Maltodextrina DE 10 y goma arábica en igual peso en proporción matriz-levadura 60:40.
- Mediante un escaneo por microscopía electrónica de barrido (SEM) se observó la morfología y el tamaño de las partículas, siendo la forma más lisa y esférica aquella observada para la matriz polimérica formada por la combinación de Maltodextrina DE 10 y goma arábica en proporción matriz-levadura 60:40.
- La mayor población de microencapsulado viable recuperado se mira por la herramienta de microscopía electrónica de barrido en la matriz polimérica formada por la combinación de Maltodextrina DE 10 y goma arábica en proporción matriz-levadura 60:40.
- Se determinó la concentración adecuada de microencapsulado capaz de disolverse en el tracto intestinal siendo ésta 3 gramos.

#### 5.2. Recomendaciones

- Se recomienda probar una modificación en los parámetros de microencapsulación para la temperatura de ingreso tanto como la de salida.
- Se recomienda realizar la microencapsulación en otras escalas como piloto o banco.
- Se recomienda realizar la microencapsulación en otra variedad de microorganismo probiótico.
- Se recomienda modificar genéticamente un microorganismo y microencapsularlo con las condiciones plantadas en este trabajo de investigación.
- Se recomienda probar el microorganismo genéticamente modificado microencapsulado en una fermentación para probar su efectividad.

## BIBLIOGRAFIA

(Center for Drug Evaluation and Research). (1997). Guidances (Drugs) Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata. Retrieved August 8, 2018, from <https://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm200707.htm>.

Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., & Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var: *Bouardii* with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 685–690. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034>.

Bakowska-Barczak, A. M., & Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1301–1309. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.002>

Befumo, M. (2018). *Ensayo de Disolución de Fármacos*. Retrieved from <http://www.safybi.org/cursos-on-line/ensayo-de-disolucion-de-farmacos/>.

Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I. J. J., Lebeer, S., & Kiekens, F. (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1–2), 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.002>.

Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Henkens, T., Kiekens, S., van den Broek, M. F. L., Lebeer, S., & Kiekens, F. (2017). Enhancing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after spray drying and during storage. *International Journal of Pharmaceutics*, 534(1–2), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.075>.

Cascales, M., & Doadrio, A. (n.d.). FISIOLÓGÍA DEL APARATO DIGESTIVO. Retrieved from <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1492/1555>.

Cheftel, J.-C., Cuq, J.-L., & Lorient, D. (1989). Proteínas de organismos unicelulares. In ACRIBIA (Ed.), *Proteínas Alimentarias* (pp. 284–285). Zaragoza: ACRIBIA.

Cienfuegos, A. (2010). Secreción gástrica e inhibidores de bomba de protones.

*Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia Digestiva, Coloproctología y Hepatología*, 1(25). Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v25n1/v25n1a18.pdf>.

Díaz-Martínez, Y. L., Serna-Jiménez, J. A., & Torres-Valenzuela, L. S. (2016). Determinación de la temperatura de secado para la encapsulación de proteasa mediante secado por atomización Determining drying temperature for protease encapsulation by spray drying Determinação da temperatura de secagem para a encapsulação de protease me.

Fajardo, R. (2011). INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS Y ENZIMAS. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(6), 42–52. Retrieved from <file:///C:/Users/Emiliano/Downloads/Fajardo-Ochoaetal.2011.pdf>.

Gallardo, G., Guida, L., Martínez, V., López, M. C., Bernhardt, D., Blasco, R., ... Hermida, L. G. (2013). Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52(2), 473–482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.020>

García, C., Lissette, M., Iraizoz, A., Martínez, V., Torres, M., & León, G. (2009). Método analítico para la cuantificación y ensayo de disolución de risperidona tabletas 3 mg. Retrieved August 8, 2018, from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152009000400004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152009000400004).

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>

Graff, S., Hussain, S., Chaumeil, J.-C., & Charrueau, C. (2008). Increased Intestinal Delivery of Viable *Saccharomyces boulardii* by Encapsulation in Microspheres. *Pharmaceutical Research*, 25(6), 1290–1296. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9528-5>.

Huang, S., Méjean, S., Rabah, H., Dolivet, A., Le Loir, Y., Chen, X. D., Schuck, P. (2017). Double use of concentrated sweet whey for growth and spray drying of probiotics: Towards maximal viability in pilot scale spray dryer. *Journal of Food*



*Engineering*, 196, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.10.017>

Huang, S., Vignolles, M. L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007>

Juárez, A. ., & Jiménez, M. T. (2013). Condiciones gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados. *Temas Selectos de Ingeniería En Alimentos*, 7(2), 15–24. Retrieved from <http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Juarez-Roldan-et-al-2013.pdf>

Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., & Matsumura, Y. (2003). Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of Food Science*, 68(7), 2248–2255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05755.x>

Liao, L. K., Wei, X. Y., Gong, X., Li, J. H., Huang, T., & Xiong, T. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.065>.

Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2000). Microorganismos y productos industriales. In D. Álvarez & P. Aguado (Eds.), *Biología de los Microorganismos* (8th ed., pp. 431–458). Madrid: Prentice Hall Iberia.

Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>

Mendoza, K. (2015). *Situación actual y perspectivas de las aplicaciones de los probióticos en la industria alimentaria y sus efectos en la salud humana*. Retrieved from <file:///C:/Users/Emiliano/Downloads/MARIAELENALEON-KAROLMENDOZAVILLANUEVA.pdf>

Nelson, G., Duckham, S. C., & Crothers, M. E. D. (2006). Microencapsulation in yeast cells and applications in drug delivery. *ACS Symposium Series*, 923, 268–281.

Paim, D. R. S. F., Costa, S. D. O., Walter, E. H. M., & Tonon, R. V. (2016).

Microencapsulation of probiotic jussara (*Euterpe edulis* M.) juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.022>.

Palma, M. L., Zamith-Miranda, D., Martins, F. S., Bozza, F. A., Nimrichter, L., Montero-Lomeli, M., ... Douradina, B. (2015). Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(16), 6563–6570. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6776-x>

Pedroza, R. (2002). Alimentos Microencapsulados : Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para Larvas de Especies Acuícolas. Memorias Del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, (May), 10. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.6.7047>

Petek, Z., Akar, C. , Turanlı-Yıldız, B., Alkım, C., & Lkü Yılmaz, U. ". (2011). Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. *Federation of European Microbiological Societies*. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00775.x>.

Plaza-Díaz, J., Augustín, O. M., & Hernández, Á. G. (2013). Los alimentos como fuente de mono y disacáridos: Aspectos bioquímicos y metabólicos. *Nutricion Hospitalaria*, 28(SUPPL.4), 5–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5064-5081.2002>

QuimiNet. (2006). Métodos de prueba de disolución más utilizados. Retrieved from <https://www.quiminet.com/articulos/metodos-de-prueba-de-disolucion-mas-utilizados-2702410.htm>.

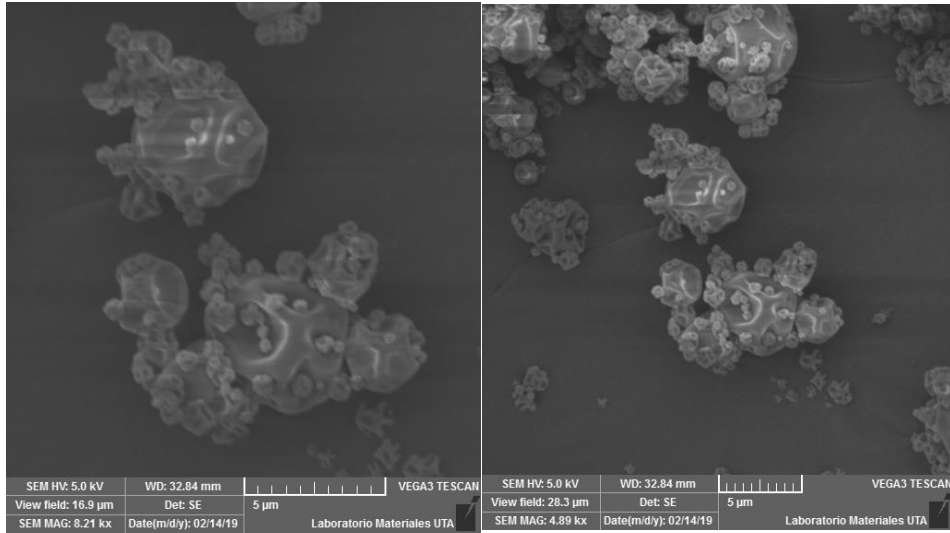
Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 369–381. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022>.

Rodríguez, J., & Gil, J. (2012). Ensayo de disolución para las tabletas de Tilo elaboradas con extracto seco de *Justicia pectoralis* Jacq. Retrieved August 8, 2018, from [http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol47\\_1\\_13/far13113.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol47_1_13/far13113.htm).

Shokri, Z., Fazeli, M. R., Ardjmand, M., Mousavi, S. M., & Gilani, K. (2015). Factors affecting viability of *Bifidobacterium bifidum* during spray drying. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s40199-014-0088-z>.

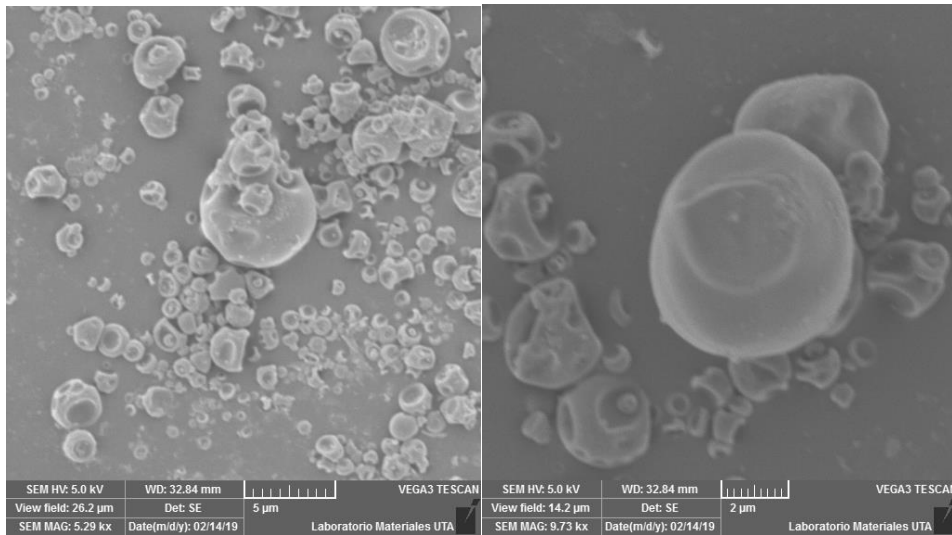
Vieira, A. T., Teixeira, M. M., & Martins, F. S. (2013). The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Frontiers in Immunology*, 4(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00445>

## ANEXOS



*Figura 8:* Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40

*Figura 9:* Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40



*Figura 10:* Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40

*Figura 11:* Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40

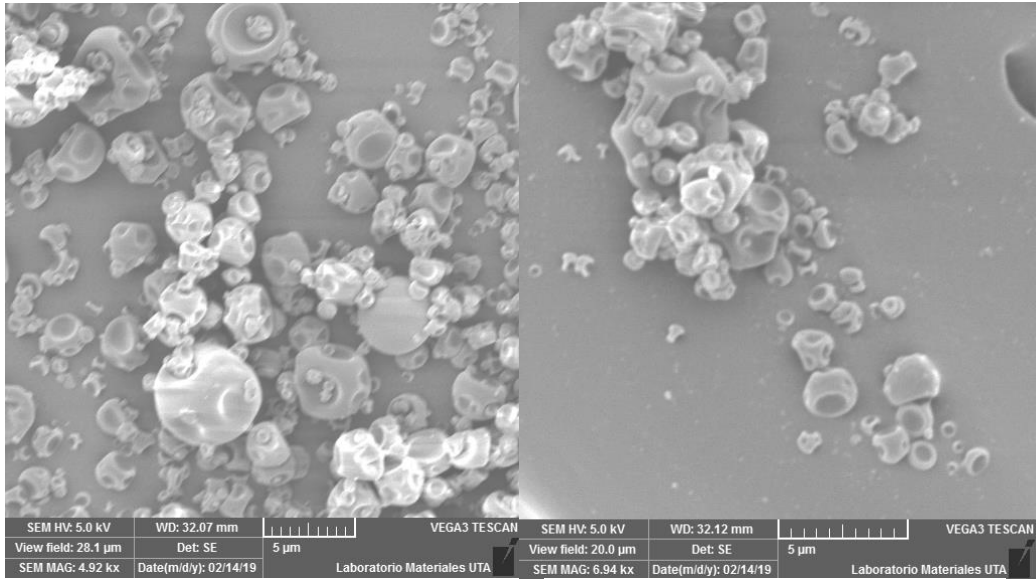


Figura 12: Imagen SEM de microencapsulado en proporción 70:30

Figura 13: Imagen SEM de microencapsulado en proporción 70:30

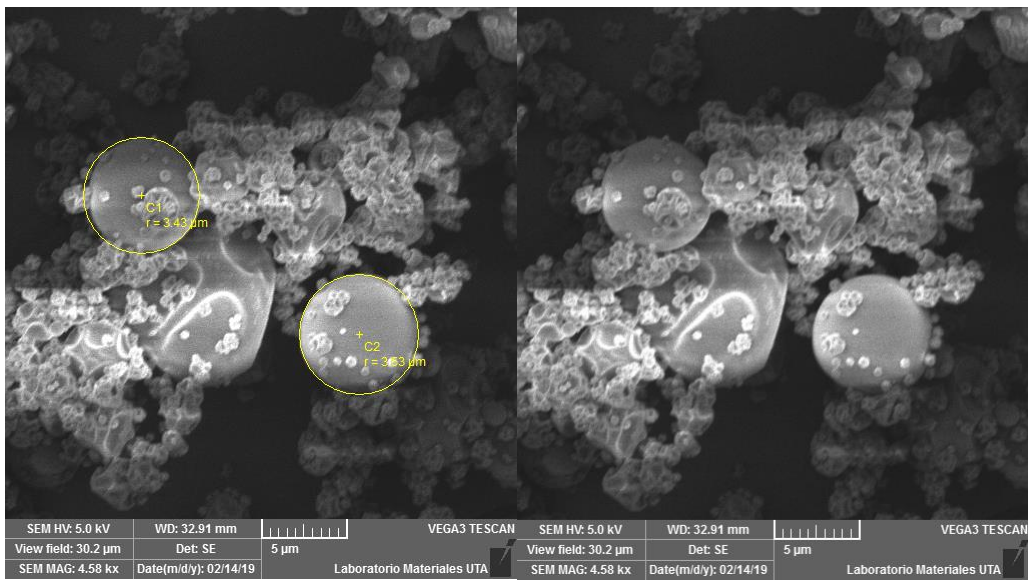


Figura 14: Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 con medidas

Figura 15: Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40

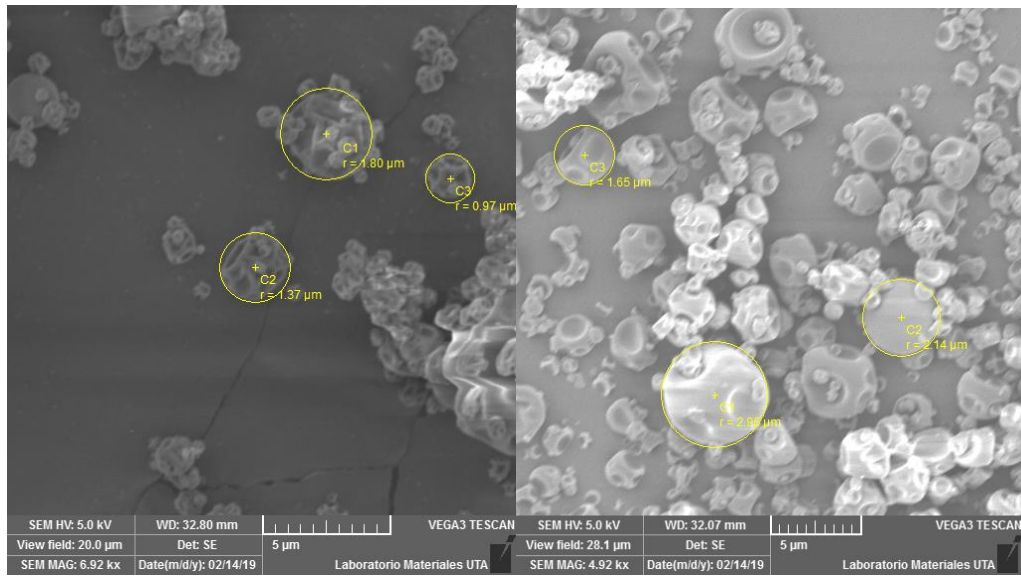


Figura 16: Imagen SEM de microencapsulado en proporción 60:40 con medidas

Figura 17: Imagen SEM de microencapsulado en proporción 70:30 con medidas