



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

**Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* contra
Campylobacter jejuni de microencapsulados con simbióticos
obtenidos mediante secado por aspersión**

Que presenta para obtener el grado de
Licenciado en Química de Alimentos

José Ramón Díaz Sosa

Directora de tesis

Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés

Codirectora de Tesis

M. en C. Brenda Esmeralda Jiménez Villeda

Mineral de la Reforma Hidalgo a 07 de septiembre del 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
School of Engineering and Basic Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 7 de septiembre de 2023

Número de control: ICBI-D/1437/2023
 Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de la Licenciatura en Química de Alimentos **José Ramón Díaz Sosa**, quien presenta el trabajo de titulación "**Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Campylobacter jejuni* de microencapsulados con simbióticos obtenidos mediante secado por aspersión**", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente Dr. Javier Castro Rosas

Secretario: Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Vocal: Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés

Suplente: M. en C. Brenda Esmeralda Jiménez Villeda

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
 "Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
 Director del ICBI



OAAS/YCC

Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
 Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
 México, C.P. 42184
 Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

DEDICATORIAS

Mi tesis se la dedico principalmente a mi mamá. Quien siempre han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo a mi mamá, por darme la oportunidad de tener una carrera universitaria, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre ha estado apoyándome y brindándome su amor incondicional, por todo eso le estaré eternamente agradecido de corazón. Este trabajo que me llevo un año y medio en hacerlo y es para ti mamá.

A mis hermanas Mariana y Alexandra gracias por estar conmigo y apoyarme en todo momento, las quiero mucho. El apoyo conjunto de ellas ha sido calve de mi éxito, este logro es también de ustedes.

A mis amigos quienes fueron un enorme apoyo emocional, agradezco su amistad sincera y ayuda durante el tiempo que elaboré esta tesis, ellos también contribuyeron que este trabajo se volviera realidad.

Todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis les estaré eternamente agradecido.

A mi apreciada Alma Mater, a la Doctora Nallely, a mi Codirectora Brenda y a todas las personas que brindaron su apoyo. No hubiera logrado llegar hasta aquí sin su apoyo.

Para todos ellos es esta dedicatoria de tesis. Ya que, gracias a su apoyo incondicional logra culminar esta importante etapa de mi vida.

Y un agradecimiento especial para la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, la cual me abrió las puertas para continuar con mi formación académica de nivel superior.

Lo que conocemos es una gota, lo que no conocemos es un océano.

(Isaac Newton)

RESUMEN

Dentro de las infecciones intestinales de mayor preocupación se encuentran las causadas por *Campylobacter jejuni*. La eficacia de los antibióticos para combatir a *C. jejuni* están disminuyendo, debido a la aparición de cepas resistentes a estos, motivo por el cual es importante buscar tratamientos alternos. Para ello, los probióticos en combinación con prebióticos (simbióticos) han demostrado inhibir a *C. jejuni*. El objetivo de este trabajo fue microencapsular bacterias ácido lácticas (BAL) en mezcla con prebióticos y evaluar la actividad antimicrobiana contra *C. jejuni in vitro* y la viabilidad de las BAL durante el almacenamiento. Las cepas BAL empleadas fueron *Lacticaseibacillus paracasei* UAEH20 (L20), *Enterococcus lactis* UAEH 17 (L17), *Enterococcus lactis* UAEH 19 (L19) y *Enterococcus lactis* UAEH 25 (L25). Las cuatro BAL se cultivaron con y sin inulina y/o fructooligosacaridos (FOS) al 0.6%, su efecto inhibitorio *in vitro* contra *C. jejuni*. Los tratamientos que mostraron el mejor efecto fueron encapsulados empleando un secador por aspersión. Se encapsularon las BAL sin prebióticos como control. Las microcápsulas obtenidas fueron caracterizadas. Los tratamientos que presentaron el mejor efecto antibacteriano contra *C. jejuni* fueron L17 con 0.6% FOS, L19 sin prebiótico, L20 con 0.6% FOS y L25 con 0.6% inulina, estos tratamientos fueron posteriormente encapsulados. Se obtuvieron eficiencias de encapsulación entre 90.8 y 97.0%, la actividad de agua oscilo entre 0.2 y 0.3, mientras que el contenido de humedad varió entre 5.3 y 7.4 %. El tamaño de las microcápsulas obtenidas fue de $\approx 20 \mu\text{m}$. En general, las cuatro BAL mantuvieron efecto inhibitorio contra *C. jejuni* después ser encapsuladas. El proceso de encapsulación y la adición del prebiótico ayudo a las BAL a preservar su viabilidad ($\approx 6 \text{ Log UFC/g}$) al ser expuestas a pH 2 y sales biliares al 0.3% en comparación con las BAL libres. Los tratamientos microencapsulados con prebióticos ayudaron a mantener concentraciones superiores a 8 Log UFC/g después de 9 semanas de almacenamiento. Los tratamientos simbióticos encapsulados presentaron la mejor resistencia a condiciones adversas del tracto gastrointestinal simulado, durante el almacenamiento, manteniendo su actividad antimicrobiana contra *C. jejuni*.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	9
II.	MARCO TEÓRICO	10
	2.1 Campylobacter jejuni	10
	2.2 Tratamientos farmacológicos para combatir a C. jejuni	11
	2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)	12
	2.4 Metabolismo de las bacterias ácido lácticas	15
	2.5 Criterios que las BAL deben cumplir para ser consideradas como probióticas	16
	2.6 Actividad antimicrobiana de los probióticos	17
	2.7 Prebióticos	18
	2.8 Simbióticos	19
	2.9 Microencapsulación	19
	2.10 Estructura de las microcápsulas	20
	2.11 Secado por aspersión como técnica para encapsular bacterias y simbióticos	21
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
IV.	HIPÓTESIS	24
V.	OBJETIVOS	25
	5.1 Objetivo general	25
	5.2 Objetivos específicos	25
VI.	METODOLOGÍA	26
	6.1 Material biológico	26
	6.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de BAL con y sin prebióticos contra Campylobacter jejuni in vitro	26
	6.3 Encapsulación de BAL mediante secado por aspersión	27
	6.3.1 Preparación de la muestra	27

6.3.2	Proceso de encapsulación_____	27
6.4	Caracterización de las microcápsulas obtenidas por secado por aspersión __	28
6.4.1	Eficiencia de encapsulación (%) _____	28
6.4.3	Morfológica de las microcápsulas por MEB _____	29
6.4.4	Resistencia de bacterias ácido lácticas encapsuladas a pH 2 _____	29
6.4.5	Resistencia de bacterias ácido lácticas encapsuladas a sales biliares _____	30
6.4.6	Efecto inhibitorio contra C. jejuni después del proceso de encapsulación __	30
6.5	Estabilidad de las microcápsulas durante el almacenamiento _____	30
6.6	Análisis estadístico _____	31
VII.	RESULTADOS _____	32
7.1	Actividad antibacteriana de BAL con y sin prebióticos contra Campylobacter jejuni in vitro _____	32
7.2	Caracterización de los microencapsulados obtenidos por secado por aspersión _____	34
7.2.1	Eficiencia del proceso de encapsulación (EE%), contenido de humedad (%) y actividad de agua (aw) _____	34
7.2.2	Caracterización morfológica de las microcápsulas _____	35
7.2.3	Efecto inhibitorio de BAL con o sin prebióticos después de la encapsulación	39
7.2.4	Resistencia de BAL libres y encapsuladas a pH bajos y a sales biliares __	40
7.2.5	Viabilidad de las BAL microencapsuladas con y sin prebióticos durante el almacenamiento _____	44
7.2.6	Morfología de las BAL microencápsuladas con y sin prebióticos después del almacenamiento _____	45
VIII.	CONCLUSIONES _____	49
IX.	REFERENCIAS _____	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Vías principales de la transmisión de <i>C. jejuni</i> _____	11
Figura 2. Beneficios de las bacterias ácido lácticas _____	14
Figura 3. Principales rutas metabólicas de las BAL _____	16
Figura 4. Partes que integran el secador por aspersion _____	23
Figura 5. Efecto inhibitorio de BAL con y sin prebióticos contra <i>C. jejuni</i> _____	35
Figura 6. Comprobación del efecto inhibitorio de las BAL contra <i>C. jejuni</i> con o sin prebiótico después de la encapsulación _____	40
Figura 7. Supervivencia de a) L17, b) L19, c) L20 y d) L25, libres, encapsuladas con y sin prebióticos a pH 2 a tiempo 0, 1.5 y 3 h _____	43
Figura 8. Supervivencia de a) L17, b) L19, c) L20 y d) L25, libres, encapsuladas con y sin prebióticos a 0.3% de sales biliares a tiempo 0, 1.5 y 3 h _____	44
Figura 9. Gráficos de las BAL sin y con prebiótico después de 9 semana de almacenamiento a 25 ± 2 °C _____	47
Figura 10. Micrografías obtenidas por MEB (1500X) de microcápsulas después de nueve semanas de almacenamiento de a) L17 sin prebiótico b) L17+0.6% Inulina y c) L19 sin prebiótico _____	48
Figura 11. Micrografías obtenidas por SEM (1500X) de microcápsulas después de nueve semanas de almacenamiento de a) L20 sin prebiótico b) L20+0.6% fructooligosacáridos, c) L25 sin prebiótico y d) L25+0.6% Inulina _____	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico _____	15
Tabla 2. Características de las cepas probióticas _____	17
Tabla 3. Polisacáridos utilizados para la encapsulación de probióticos _____	21
Tabla 4. Tabla de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico empleadas en el presente trabajo _____	27
Tabla 5. Tratamientos de bacterias ácido lácticas con y sin probióticos encapsulados mediante secado por aspersion _____	28
Tabla 6. Eficiencia de encapsulación (% EE), contenido de humedad (%), actividad de agua, para los tratamientos de BAL con y sin prebióticos _____	35
Tabla 7. Micrografías de capsulas de BAL con y sin prebiótico a (1000X) obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido _____	36

I. INTRODUCCIÓN

Campylobacter es una especie de microorganismo patógeno causante de la gastroenteritis bacteriana más frecuente en humanos. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* representan alrededor del 90% de las infecciones por *Campylobacter* en humanos (Horrocks et al., 2009). Los pacientes infectados con *C. jejuni* presentan gastroenteritis de diversos grados, que van desde malestar leve y diarrea acuosa, hasta colitis ulcerosa grave con diarrea inflamatoria con sangre (Kist & Bereswill, 2001). Las infecciones por *C. jejuni* también pueden provocar trastornos neurológicos, como los síndromes de Guillain-Barré y Miller Fisher o artritis reactiva (Ekmekci et al., 2017). Por otro lado, el uso desmedido de antibiótico ha provocado la aparición de cepas de *C. jejuni* resistentes, generando graves problemas de salud pública (Helmy et al., 2021). Actualmente, como tratamientos alternos a los antibióticos se propone el uso de probióticos para combatir *C. jejuni* en humanos. Sin embargo, se ha comprobado que la adición de prebióticos a los probióticos (simbiótico) potencializan su efecto inhibitorio contra diversos patógenos. De acuerdo a la OMS/FAO, es importante mantener una concentración de por lo menos 8 Log UFC/mL de probióticos para que puedan ejercer un efecto benéfico en el huésped. Cabe resaltar que la mayoría de las bacterias probióticas no resisten el paso por el estómago. Motivo por el cual se hace uso de diferentes estrategias para protegerlas, entre estas destaca la microencapsulación. Las bacterias microencapsuladas puedan sobrevivir, durante el procesamiento, almacenamiento para que posteriormente sean liberadas en sitios que sean requeridas en el TGI (tracto gastrointestinal) (Villanueva-Castañeda et al., 2023). La microencapsulación llevada a cabo por el método de secado por aspersión genera grandes cantidades de material, es económico y eficaz. Se han utilizado varios materiales de pared para encapsular probióticos, con el fin de protegerlos y de resguardarlos de factores ambientales como el pH gástrico y la concentración de bilis. Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue microencapsular simbióticos mediante la técnica de secado por aspersión y evaluar la actividad antimicrobiana contra *Campylobacter jejuni in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni es una bacteria Gram negativa, microaerófila, aerobia, móvil (Hernández-Cortez et al., 2013). *C. jejuni* es el principal causante de la diarrea del viajero; ya que ingresa al huésped mediante la ingesta de alimentos contaminados o por medio de agua (Schrotz-King et al., 2007). Los factores ambientales como la temperatura, la humedad, la cantidad de luz solar y el pH del agua y del suelo son factores importantes para las etapas de colonización primaria y secundaria en animales que son destinados para el consumo humano, particularmente los pollos (Bronowski et al., 2014). En la Figura 1 se aprecian las principales vías de transmisión de *C. jejuni*.

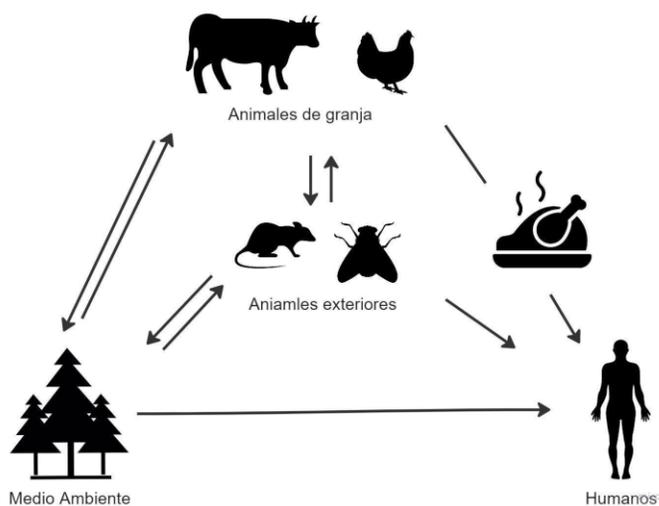


Figura 1. Vías principales de la transmisión de *C. jejuni*.

Fuente: (Casado-Salgado, 2021).

Cuando *C. jejuni* se incorpora al intestino del huésped, logra colonizar la capa mucosa que recubre el epitelio de íleon distal, hasta llegar al colon empleando sus flagelos polares (Ketley, 1997). El patógeno tiene varios factores de virulencia como es la quimiotaxis y las proteínas de choque térmico (Snelling et al., 2005). *C. jejuni* coloniza preferentemente la zona mucosa. Ya que, las tensiones de oxígeno son más altas que en el recto. Las caracterizaciones bioquímicas han demostrado la presencia de una cadena respiratoria compleja y altamente ramificada; en donde este patógeno usa una gran variedad de donantes y aceptores de electrones aparte del oxígeno (Hofreuter, 2014). Adicionalmente se ha reportado que el catabolismo de aminoácidos libres, derivados de la degradación de las proteínas del huésped y la composición de su microbiota intestinal; es de suma importancia durante el proceso de colonización del microorganismo (Ketley, 1997).

2.2 Tratamientos farmacológicos para combatir a *C. jejuni*

Actualmente la campilobacteriosis requiere de tratamientos con antibióticos como la azitromicina y la eritromicina, fármacos de elección para su tratamiento clínico (Wieczorek & Osek, 2013). En casos clínicos más graves, es posible que se requiera de una inyección intravenosa de aminoglucósidos (gentamicina) (Elhadidy et al., 2020). Con el paso de los años *C. jejuni* ha mostrado un incremento en la resistencia a los antibióticos (Hlashwayo et al., 2020). Uno de los factores a los que se les podría atribuir este incremento podría ser el uso desmedido de antibióticos en el ámbito veterinario (Marshall & Levy, 2011).

La aparición de estas cepas resistentes en alimentos de origen animal se traduce en una importante amenaza de salud pública (Elhadidy et al., 2020). En algunas investigaciones se ha revelado que las personas infectadas con cepas de *C. jejuni*, resistentes a antibióticos sufren síntomas más severos, en comparación con infecciones causadas por el patógeno sin resistencia (Nelson et al., 2004). Derivado de ello, es importante buscar fuentes alternas de tratamiento a los antibióticos para combatir a este microorganismo en pacientes.

En los últimos años, las bacterias ácido lácticas (BAL) han demostrado tener actividad antibacteriana contra cepas de *C. jejuni*. Se ha evidenciado que la producción de ácido láctico suprime este patógeno (Neal-McKinney et al., 2012).

2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) cuando son introducidas en cantidades suficientes ($>1 \times 10^6$ UFC/g o ml), tienen efectos benéficos en el organismo humano (Huertas et al., 2010). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha definido a los probióticos como “microorganismos vivos, los cuales, sí son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio saludable en el huésped” (Díaz & Grandez, 2020). Estas bacterias son microorganismos con una morfología bacilar o cocoide, además no son formadoras de esporas, son consideradas anaerobias facultativas o microaerófilas, estas bacterias carecen de citocromos, no son patógenas ni toxigénicas y son bacterias Gram-positivas (Serna, 2012). Dentro de las BAL se encuentran varios microorganismos conocidos como probióticos; sin embargo, no todos realizan y ejercen los mismos mecanismos de acción (Ramírez et al., 2011).

Dentro del metabolismo de las BAL, se encuentra la producción de ácidos orgánicos, diacetil, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y la producción de bacteriocinas (Serna-Jiménez, 2012). Las BAL logran reducir el pH del ambiente, lo que causa un efecto inhibitorio de bacterias gram positivas y gram negativas, la forma pura del ácido láctico logra penetrar con mayor facilidad la pared celular microbiana, promoviendo la disociación de partículas lo que causa una liberación de iones de hidrógeno con su anión correspondiente. Con esta reacción se obtienen iones que interfieren con el metabolismo y a su vez, esto inhibe el crecimiento celular; además, cuando está presente el oxígeno, las BAL pueden producir peróxido de hidrógeno, lo que genera radicales hidroxilo, provocando la peroxidación de lípidos en la membrana de la célula microbiana (Ramírez et al., 2011). En la Figura 2 se citan algunos de los beneficios de las BAL cuando son administradas en humanos.

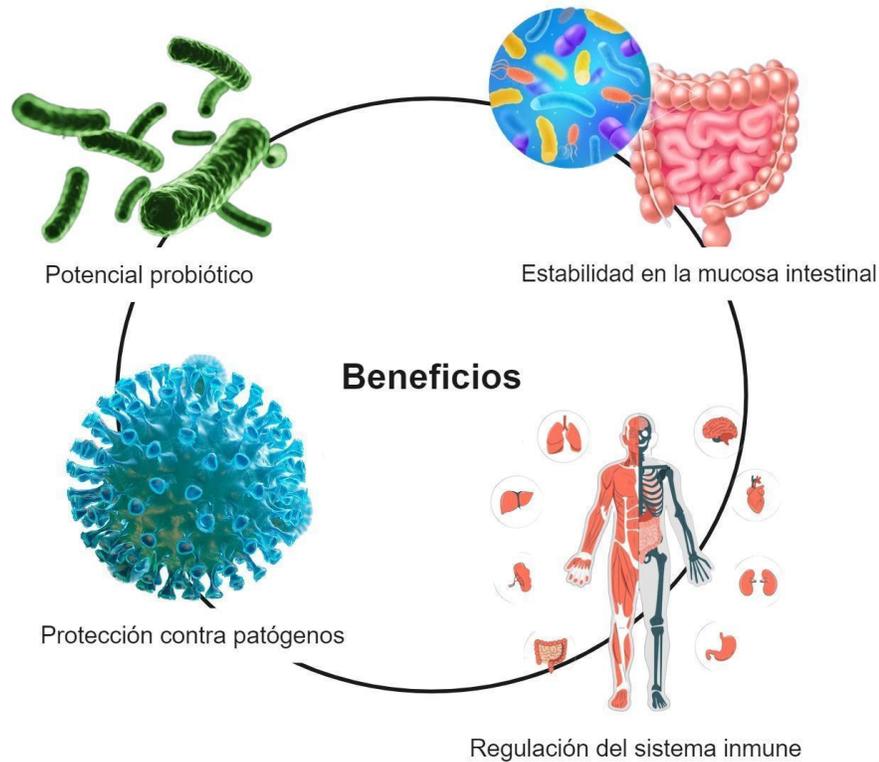


Figura 2. Beneficios de las bacterias ácido lácticas.

Fuente: (Cabeza-Herrera et al., 2018).

Industrialmente, la mayoría de las cepas del BAL implementadas como probióticos, son especies de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium*, sin embargo. Estudios recientes han utilizado cepas de levaduras. Generalmente se han utilizado bacterias del género *Lactobacillus* por sus cualidades como agentes fermentadores y conservantes, a su vez generadores de un descenso de pH (Doron & Snyderman, 2015). En la actualidad, se han empleado mezclas de probióticos y prebióticos en el campo alimenticio en diferentes formulaciones (Serna-Jiménez, 2012).

Para el aislamiento y la obtención de las BAL se deben seleccionar alimentos, en los cuales, durante su fermentación, puedan estar presentes dichos microorganismos, algunos de los alimentos pueden ser de origen vegetal o animal; frescos, precocidos o harinas (Parvez et al., 2006). La finalidad de seleccionar este tipo de alimentos es para poder determinar durante la fermentación cuál de los

microorganismos desarrollados pueda llegar a tener alguna propiedad probiótica. Para poder realizar la identificación de las BAL, es necesario realizar pruebas preliminares e identificar morfológicamente cuales microorganismos son viables como BAL (Cueto & Argón, 2012).

En la Tabla 1 se muestran las cepas de BAL mayormente identificadas con potencial probiótico, por lo general pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (clasificación anterior), *Bifidobacterium* y *Streptococcus* (Kechagia et al., 2013; Marco et al., 2006), no obstante se han aislado e identificado otros géneros de bacterias que poseen potencial probiótico, tales como *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Ashaolu & Reale, 2020; Ouwehand et al., 2002). Específicamente, algunas de las BAL mostradas en la Tabla 1 confirmadas como probióticas son: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis* y *L. plantarum*.

Tabla 1. Cepas de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>		<i>S. salivarius</i>
<i>Ent. Faecium</i>			
<i>L. delbrueckii</i> ssp. (<i>bulgaricus</i>)	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			

Fuente: Parvez et al., 2006.

2.4 Metabolismo de las bacterias ácido lácticas

Bioquímicamente, la fermentación bacteriana se puede definir como un proceso metabólico, en el cual ocurren varias reacciones de origen orgánico en el que los carbohidratos y a su vez, los compuestos afines, son oxidados y se logra la liberación de energía, sin tomar en cuenta los aceptores externos de electrones. Estos aceptores se pueden definir como compuestos de origen orgánico y son producidos por medio del desdoblamiento de los carbohidratos (Ulloa et al., 2011).

Por lo general, las BAL pueden hacer uso de dos rutas metabólicas (Figura 3) para emplear la glucosa (Serna, 2012). En la primera el producto principal obtenido es el ácido láctico, a este tipo de fermentación de la glucosa se le denomina homofermentativa. Las bacterias homolácticas poseen enzimas como la hexoisomerasa y la aldosa, pero estas carecen de fosfocetolasa. Es posible cambiar el carácter homofermentativo, modificando las condiciones de fermentación como el pH, propiciando una restricción de nutrientes y cambiando la concentración de glucosa. En la segunda ruta heterofermentativa, las bacterias son capaces de transformar la glucosa por medio de hexosas, en etanol, ácido fórmico, succinato, ácido láctico y dióxido de carbono, denominándose bacterias heterolácticas (Pérez et al., 2006).

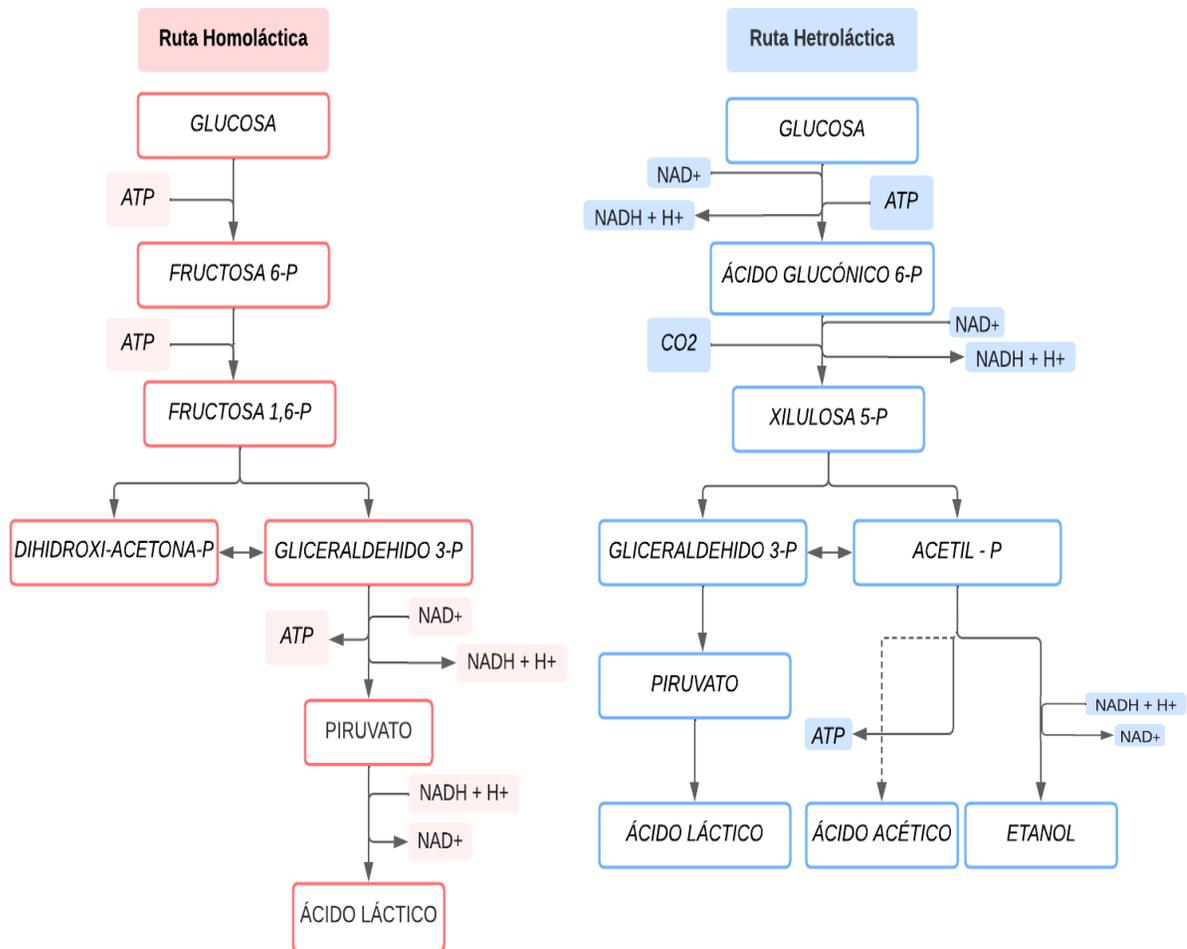


Figura 3. Principales rutas metabólicas de las BAL.

Fuente: (Tala Orrillo, 2023).

2.5 Criterios que las BAL deben cumplir para ser consideradas como probióticas

Es necesario que las BAL cumplan con ciertos criterios (Tabla 2) para que estas puedan ser consideradas como probióticos, estas deben tener una resistencia a la acidez estomacal, a las sales biliares, deben tener la capacidad para fijarse en el epitelio intestinal y que puedan lograr colonizar el intestino. También tienen que competir con otros microorganismos mediante competición por sitio de acción, deben de adaptarse a los cambios de pH intestinal o no verse afectadas fuertemente por la producción de proteínas antibacterianas llamadas bacteriocinas (Velázquez, 2018). Las bacterias probióticas se adicionan en alimentos y estas empiezan su

traslado hacia el tracto intestinal inferior por medio de la boca, algunas cepas como *Bifidobacterium* han mostrado ser más sensibles a condiciones ácidas y al jugo gástrico humano (Alvarado & Estrada, 2022).

Tabla 2. Características de las cepas probióticas.

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. Resistencia a los ácidos biliares.2. Resistencia a la acidez gástrica.3. Capacidad de adherencia al moco o a las células epiteliales humanas y líneas celulares.4. Capacidad para reducir la adhesión de patógenos a las superficies.5. Actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos.6. Actividad en la hidrolasa de sal biliar. |
|---|

Fuente: FAO/OMS, 2002.

2.6 Actividad antimicrobiana de los probióticos

La actividad antimicrobiana de los probióticos recae en las células y en los metabolitos producidos, se ha demostrado que los metabolitos producidos por los probióticos tienen un amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sanz et al., 2003). Debido a la presencia de una gran diversidad de compuestos sintetizados por las BAL, se supone que la actividad antimicrobiana no es específica de un mecanismo singular, si no. De efectos sinérgicos que son generados por distintos componentes de la célula. Algunos compuestos como el lactato y el acetato, logran disminuir el pH, sin embargo, el efecto primordial de los probióticos es la producción de ácido láctico, lo que logra reducir el pH en el intestino y sintetizar bacteriocinas extracelulares. Que a su vez, es un limitante para el crecimiento de microorganismos patógenos (Bian, 2008).

Las bacteriocinas se reconocen como metabolitos secundarios producidos por algunas bacterias probióticas, las cuales contribuyen a la inhibición de bacterias patógenas, algunos aspectos como el método de acción, el espectro de inhibición, el origen genético y sus propiedades bioquímicas pueden variar dependiendo del tipo de bacteria que las sintetiza (Beristaín et al., 2012).

Los metabolitos producidos por BAL, también incluyen agentes oxidantes fuertes como el peróxido de hidrógeno, el cual es generado por medio de la NADH oxidasa, el cual presenta actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos (Audisio et al., 2011). Por otro lado, para que los microorganismos probióticos puedan ejercer eficazmente su actividad antimicrobiana, es de importancia considerar la adición de ciertos micronutrientes que potencialicen dicha actividad, como lo son los prebióticos. La combinación de probióticos y de prebióticos puede superar algunas dificultades en la supervivencia de los mismos en el tracto gastrointestinal, además de combatir diversos enteropatógenos (Bian, 2008).

2.7 Prebióticos

Son nutrientes que llegan directamente al intestino grueso, que no pueden ser digeridos en el estómago ni en el intestino delgado, los cuales son fermentados por las BAL, aumentando el efecto benéfico de los probióticos en la salud del consumidor (Erginkaya et al., 2019). Los prebióticos se pueden definir como un ingrediente no digerible, que tiene un efecto benéfico para el huésped, al estimular selectivamente el crecimiento y la actividad de uno o de un número limitado de bacterias probióticas, por consiguiente, mejora la salud del huésped (Atia et al., 2016).

Los prebióticos se caracterizan, generalmente, por ser moléculas de gran tamaño, las cuales no pueden ser digeridas por las enzimas del tracto gastrointestinal, las cuales; una vez que llegan al intestino grueso, son metabolizados por la flora bacteriana. Esto se realiza principalmente por *Lactobacilos* y *Bifidobacterias* (Olagnero et al., 2007). Algunos productos de origen vegetal como: frutas, verduras, y otras plantas comestibles, son considerados una fuente importante de prebióticos, tales como: alcachofas, plátanos, tomates, espárragos, ajo, cebolla, bayas, legumbres, vegetales, así como linaza, cebada, avena y trigo (Markowiak & Ślizewska, 2017). Sin embargo, también hay prebióticos que asimismo pueden ser obtenidos de forma sintética, entre los que destacan:

lactosacarosa, maltooligosacáridos, ciclodextrinas, fructooligosacáridos, inulina, lactulosa y galactooligosacáridos (Fernández et al., 2018).

2.8 Simbióticos

Los alimentos que contienen probióticos y prebióticos se describen como simbióticos, esto se debe a la relación sinérgica que se genera entre ellos, de acuerdo a estudios *in vitro* previos en donde se ha demostrado que el suministro de un simbiótico presenta más ventajas que la de un prebiótico o un probiótico de forma aislada (Erginkaya et al., 2019). Sin embargo, en los últimos años a estos simbióticos se les ha añadido una barrera de protección adicional para garantizar su sobrevivencia a las condiciones adversas del TGI, mediante un proceso de microencapsulación.

2.9 Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica sumamente utilizada en varias ramas de la química, biología y microbiología (Dubey, 2009). Es un método el cual fundamentalmente permite obtener partículas pequeñas, ya sean gotículas de líquidos o de gases, que se envuelven en un material de cobertura, esto a su vez, da lugar a la formación de microcápsulas o de micropartículas. Generalmente la microencapsulación es utilizada para incorporar ingredientes alimentarios, células, enzimas o probióticos que pueden ser afectados por las condiciones ambientales. Los contenidos pueden ser liberados de manera controlada en distintas condiciones (Pérez et al., 2013).

Algunas de las principales razones por las cuales se procede a microencapsular microorganismos probióticos es para facilitar y mejorar el transporte durante el proceso de producción de los alimentos fortificados, para poder garantizar y proteger su resistencia y viabilidad durante el almacenamiento de estos, también para poder controlar su potencial en el momento y lugar adecuado, después de ingerir el alimento (Araujo et al., 2015). La selección de una técnica para la microencapsulación depende de la relación costo beneficio, el tamaño deseado de las cápsulas, de las propiedades tanto físicas como químicas, de su posible aplicación y del mecanismo de liberación deseado.

Las técnicas de encapsulación son de dos tipos: Físicas, que comprenden el secado por aspersión, el enfriamiento por aspersión, la liofilización, el recubrimiento por lecho fluidizado, la extrusión y la co-extrusión (Araujo et al., 2015). Y las fisicoquímicas, que engloban la coalescencia, la inclusión molecular, la encapsulación por liposomas (Villena et al., 2009).

Para poder llevar a cabo cualquier proceso de encapsulamiento se deben analizar varios factores físicos que pudieran afectar la supervivencia del probiótico, tales como la temperatura, la humedad y la agitación (Gouin, 2004). Adicionalmente, es necesario saber cuáles son las condiciones y el proceso de conservación del producto alimenticio que contendrá las cápsulas y a su vez, saber cuáles son los mecanismos de liberación de estas. Las técnicas más utilizadas para la microencapsulación bacteriana probiótica son: extrusión, emulsificación, liofilización y secado por aspersión (Araujo et al., 2015).

2.10 Estructura de las microcápsulas

Son partículas, en cuyo interior va el agente activo rodeado por una cobertura, que están constituidas por una pequeña membrana fuerte, delgada, esférica y semipermeable, que lo envuelve desde unas pocas micras hasta varios milímetros. El tamaño y la forma de las cápsulas depende de manera específica de cada método o técnica a utilizar (Araujo et al., 2015). Hay varios tipos de estructuras que pueden ser clasificadas como sistema capsular y a su vez, una gran cantidad de polisacáridos usados como material pared (Tabla 3). En esta estructura el material activo está reservado, su naturaleza puede ser líquida o sólida y está cubierta por una fina capa. Por último, se tiene el sistema matricial, en este sistema el material activo está disperso en la matriz polimérica. La superficie, puede ser lisa o irregular, con o sin presencia de poros, que son capaces de hacer que la microcápsula se vea afectada (Pérez et al., 2013).

Tabla 3. Polímeros utilizados para la encapsulación de probióticos.

Origen	Polisacáridos
Algas Marinas	k-carragenano, alginato

Plantas	Goma arábica, almidón y sus derivados, FOS e Inulina
Bacterias	Xantano, gelano
Animales	Quitosano
Proteínas de origen animal	Lactoalbúminas
Almidón	N-Lok

Fuente: (Pérez et al., 2013).

2.11 Secado por aspersion como técnica para encapsular bacterias y simbióticos

La técnica consiste en atomizar una suspensión o emulsión, que contenga los microorganismos a encapsular, es importante mencionar que el material que se vaya a ocupar debe ser polimérico (Encina et al. 2016). El proceso es conveniente en términos y requisitos de energía, costos operativos y presenta un alto rendimiento de proceso; usualmente se utiliza para la encapsulación de probióticos (Pinto et al., 2015).

Las microcápsulas obtenidas por esta técnica pueden proteger a los probióticos contra el efecto del ácido clorhídrico del estómago, lo que reduce de manera importante el daño a las células probióticas (Rodriguez, 2017). El material que se utiliza como recubrimiento no debe presentar citotoxicidad ni actividad antimicrobiana (Cook et al., 2012). Además, el probiótico microencapsulado debe mantener la viabilidad en el producto y su liberación en el intestino tiene que ocurrir de manera controlada (Corona-Hernandez et al., 2013). Es de destacar que las altas temperaturas empleadas en el proceso de secado por aspersion pueden estresar a las células probióticas, disminuyendo su viabilidad (Chen & Chen, 2007).

En la microencapsulación por secado por aspersion (Figura 4), algunos prebióticos, como la inulina, se han utilizado ampliamente como material de recubrimiento o material de pared, para proteger a las células probióticas durante el secado por aspersion (Bustamante et al., 2015). La inulina es térmicamente estable y poco soluble debido a su alto grado de polimerización (Wada et al., 2005).

Los probióticos a encapsular deben pasar por la cámara de secado con un flujo constante de aire caliente, el cual propicia la evaporación del agua, logrando que los microorganismos queden adheridos al material encapsulante y esto a su vez, da origen a la formación de micropartículas. La velocidad de secado es relativamente rápida, minimizando el daño térmico de los microorganismos. Es necesario que la cápsula proporcione una buena protección contra el ácido clorhídrico, que causa daño a las células probióticas (Rodríguez, 2012).

Durante el secado, es importante tomar en cuenta variables como el flujo de aire, el flujo de alimentación y las temperaturas de entrada para provocar el menor daño posible en los microorganismos. En algunas investigaciones proponen que la pre-adaptación de los probióticos frente a las condiciones de estrés puede ser controlada añadiendo polisacáridos protectores en los medios de cultivo, previo al proceso de secado, esto con el fin de aumentar la recolección de bacterias vivas (Araujo et al., 2015).

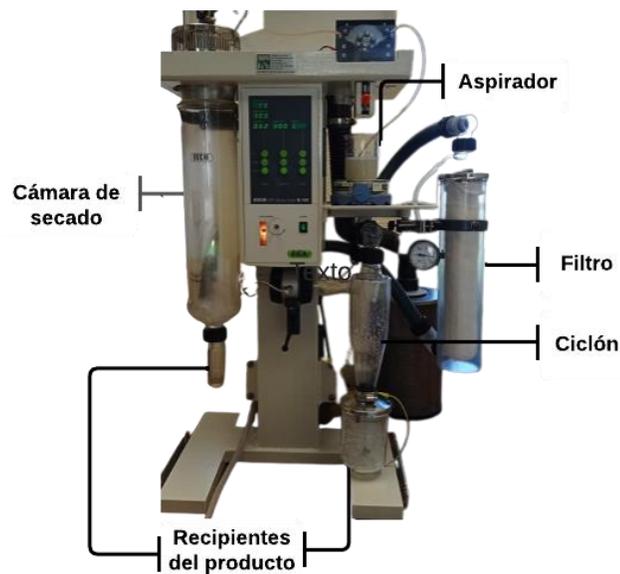


Figura 4. Partes que integran el secador por aspersion.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones ocasionadas por *C. jejuni* son una de las principales causas de gastroenteritis bacteriana en humanos a nivel mundial. Las personas infectadas con *C. jejuni* pueden presentar diversos grados de gastroenteritis, que van desde una diarrea acuosa hasta colitis ulcerosa grave con diarrea inflamatoria en presencia de sangre. En años recientes se ha asociado el síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Reiter/artritis, el síndrome del intestino irritable y el cáncer colorrectal con este enteropatógeno. Por otro lado, en las últimas décadas, en la población humana y animal, han aparecido cepas de *C. jejuni* resistentes a diversos antibióticos, ocasionando de esta forma, graves problemas de salud pública, ya que se cuenta con opciones limitadas para su tratamiento. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos mecanismos de inhibición en contra de estas bacterias. Investigaciones recientes han demostrado el potencial de las (BAL) como método de inhibición contra microorganismos patógenos. Las BAL son capaces de producir compuestos antimicrobianos, los cuales son útiles para inhibir el crecimiento exponencial de bacterias patógenas como *C. jejuni*. Sin embargo, las condiciones adversas del (TGI) provocan que no se alcance la concentración mínima establecida por la FAO ($>1 \times 10^6$ UFC/g o ml) para generar un beneficio en la salud del huésped, por lo que es de suma importancia conferir una barrera de protección a estas bacterias, empleando alguna técnica de encapsulación. Asociado a ello la adición de micronutrientes como los prebióticos provocan que la viabilidad de las BAL sea conservada por tiempos prolongados. Al implementar la microencapsulación de probióticos y prebióticos se puede favorecer la supervivencia de los microorganismos, por tal razón el objetivo de este trabajo es microencapsular bacterias ácido lácticas en mezcla con prebióticos (simbióticos) y evaluar la actividad antimicrobiana contra *C. jejuni* y la viabilidad de las bacterias lácticas durante el almacenamiento.

IV. HIPÓTESIS

Microencapsulados de BAL tendrán actividad antimicrobiana contra *C. jejuni* *in vitro* y la viabilidad de las bacterias ácido lácticas será mayor durante el almacenamiento con el uso de prebióticos.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Microencapsular bacterias ácido lácticas en mezcla con prebióticos y evaluar la actividad antimicrobiana contra *C. jejuni in vitro* y la viabilidad de las bacterias lácticas durante el almacenamiento.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de bacterias ácido lácticas libres y en mezcla con prebióticos contra *C. jejuni*.
2. Microencapsular bacterias ácidas lácticas en mezcla con prebióticos usando el secado por aspersión.
3. Caracterizar los microencapsulados (morfología, viabilidad (%), resistencia a pH y a sales biliares similar al del estómago, actividad de agua, humedad, actividad antimicrobiana contra *C. jejuni in vitro*).
4. Evaluar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas encapsuladas con y sin prebióticos después de nueve semanas de almacenamiento a temperatura ambiente.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Material biológico

La cepa *Lacticaseibacillus paracasei* UAEH20 (L20) que se utilizó en este trabajo se aisló de un queso tenate del estado de Hidalgo, México. Además, se emplearon tres cepas más de BAL pertenecientes al género *Enterococcus lactis* UAEH 17 (L17), UAEH 19 (L19) y UAEH 25 (L25) aisladas e identificadas previamente de diversos quesos del mismo estado (Falfán-Cortés et al., 2021). Por otro lado, la cepa de *C. jejuni* subsp. *jejuni* se adquirió en ATCC con el código 33560. Como prebióticos se utilizó inulina de achicoria (Sigma-Aldrich, Toluca, Mex) y fructooligosacáridos de achicoria (FOS) (Sigma-Aldrich, Toluca, Mex).

Tabla 4. Tabla de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico empleadas en el presente trabajo.

Microorganismo	Abreviatura
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> UAEH20	L20
<i>Enterococcus lactis</i> UAEH 17	L17
<i>Enterococcus lactis</i> UAEH 19	L19
<i>Enterococcus lactis</i> UAEH 25	L25

6.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de BAL con y sin prebióticos contra *Campylobacter jejuni in vitro*

La actividad antibacteriana de las diferentes cepas L17, L19, L20 y L25 contra *C. jejuni* se evaluó usando la técnica de difusión en pozos como lo describe (Sgouras et al., 2004) con algunas modificaciones. Se utilizó un cultivo de 24 h de *C. jejuni* (10^6 UFC por placa), se sembró por vertido en placa en agar BHI (BD Bioxon, México) al 1.2% sin antibióticos. Posterior a la solidificación del agar, con una pipeta pasteur previamente esterilizada con etanol, se perforaron 4 pozos de 6 mm de diámetro sobre el agar, el residuo del pozo fue retirado con ayuda de un asa bacteriológica estéril. En los pozos se colocaron alícuotas de 50 μ L de cultivos de

las cepas L17, L19, L20 y L25 de 24 h de incubación en caldo MRS adicionado con inulina o FOS al 0.6%. Se dejó difundir el contenido líquido en el agar durante 2 h. Las placas fueron incubadas durante 24 h en condiciones microaerófilas, se utilizaron paquetes de gas Container Systems (BD GasPak® EZ), en un sistema de GasPak® System durante 24 h a 37 °C, posteriormente se midieron los diámetros de las zonas de inhibición (milímetros) formados alrededor de los pozos con ayuda de un vernier.

6.3 Encapsulación de BAL mediante secado por aspersion

6.3.1 Preparación de la muestra

Los cultivos de las cepas L17, L19, L20 y L25 se obtuvieron después de la activación mediante dos transferencias sucesivas en caldo a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 3500 rpm durante 15 min. El almidón modificado comercial (N-lok) se mezcló con 90 mL de agua destilada estéril y se homogeneizó con ayuda de un Ultra-Turrax T-Homogenizer 25-SI a 6000 rpm durante 1 min. Se añadió el paquete celular a la mezcla de almidón. Finalmente, la mezcla fue homogeneizada a 3600 rpm durante 5 s en un homogeneizador. El proceso de microencapsulación se realizó de acuerdo a lo descrito por Hernández-López et al, 2018).

6.3.2 Proceso de encapsulación

El proceso de microencapsulación se realizó con un secador escala laboratorio marca Buchi modelo B 191 Labortechnik AG (Flawil, Suiza). La temperatura de entrada se fijó en 100 °C, y la de salida en 62 °C. El flujo de alimentación del líquido fue de 4 mL/min y el diámetro de la boquilla de 0.5 mm (Hernández-López et al., 2018). En la Tabla 5 se muestran los tratamientos de bacterias ácido lácticas con y sin probióticos encapsulados mediante secado por aspersion.

Tabla 5. Tratamientos de bacterias ácido lácticas con y sin probióticos encapsulados mediante secado por aspersión

TRATAMIENTOS
L17 sin prebiótico
L17 + 0.6% FOS
L19 sin prebiótico
L20 sin prebiótico
L20 + 0.6% FOS
L25 sin prebiótico
L25 + 0.6% inulina

6.4 Caracterización de las microcápsulas obtenidas por secado por aspersión

6.4.1 Eficiencia de encapsulación (%)

El recuento bacteriano de las BAL en las microcápsulas se realizó por triplicado empleando el método de vertido en placa. Se tomó 1 g de microcápsulas y se colocó en 9.0 mL de diluyente de citrato de sodio al 2% (dilución 1), con la ayuda de un vortex, estas fueron solubilizadas. De esta solución se prepararon 8 diluciones decimales más en tubos con 9 mL de agua de peptona. Se tomó una alícuota de 1 mL de las diluciones 10^{-5} a 10^{-9} y se colocó en cajas Petri, para luego agregarles agar MRS y homogeneizarlas. A continuación, las cajas fueron incubadas en posición invertida a 37 °C durante 48 h y se realizó el recuento de colonias. Todo este procedimiento se realizó el mismo día en que se obtuvieron las microcápsulas. La eficiencia de microencapsulación, es decir, el porcentaje de viabilidad de las bacterias encapsuladas, fue calculado empleando la siguiente fórmula (Behboudi-Jobbehdar et al., 2013):

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{N}{N_0} \times 100$$

Donde N representa el número de bacterias viables en las cápsulas después del secado por aspersión y N_0 es el logaritmo de células viables antes del secado.

6.4.2 Determinación de la humedad (%) y la actividad de agua (a_w) de los encapsulados

Para la determinación del porcentaje de humedad de las microcápsulas se pesó 1 g y se colocaron en una termobalanza (OHAUS, Switzerland). Para la actividad de agua (a_w) se utilizó el equipo Aqua LAB V. 2.2 (Mod. 3TE, Decagon Devices, Inc., EE. UU.), utilizándose 1 g de muestra, ambas pruebas se realizaron por triplicado.

6.4.3 Morfológica de las microcápsulas por MEB

Las microencápsulas obtenidas se observaron empleando un microscopio electrónico de barrido (MEB) (modelo JEOL IT-300). Las muestras secas se colocaron sobre un portamuestras, con cinta electroconductiva de carbón de doble cara, para posteriormente recubrirlas con oro. Las muestras se analizaron a 15 A y 15 KV.

6.4.4 Resistencia de bacterias ácido lácticas encapsuladas a pH 2

Las cepas libres se cultivaron en caldo MRS y fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se tomó 1 mL de cada cultivo o 1 g de cápsulas, con una concentración aproximada de 10^9 UFC/mL y se añadieron en un tubo con caldo MRS ajustado a pH 2 con HCl 0.1 N (Conway et al., 1987). Las muestras se incubaron a 37 °C por 0, 1.5 y 3 h. Como control, se tomó 1 mL del cultivo de BAL de 24 h o 1 g de cápsulas y se inoculó en tubos que contenían caldo MRS ajustados a pH 6.5, se efectuó el conteo de bacterias sobrevivientes por la técnica de vertido en placa a los tiempos de 0, 1.5, y 3 h.

6.4.5 Resistencia de bacterias ácido lácticas encapsuladas a sales biliares

Un gramo de microcápsulas o 1 mL de suspensión de células libres fueron transferidos a tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio apropiado con 0.3 g/100 mL de sal biliar y se incubaron a 37 °C. El conteo de células viables se llevó a cabo a las 0, 1.5 y 3 h.

6.4.6 Efecto inhibitorio contra *C. jejuni* después del proceso de encapsulación

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó mediante la técnica de difusión en pozo (Sgouras et al., 2004). Un gramo de cápsulas de cada uno de los tratamientos simbióticos se disolvió en 9 mL de citrato de sodio al 2%, agitando durante 5 min, hasta disolver las cápsulas completamente. Luego 100 µL de la suspensión (cápsula y simbiótico) fueron inoculados en tubos que contenían 3 mL de caldo MRS e incubados de 18 a 24 h a 37 °C. Se usaron cepas de L17, L19, L20 y L25 libres como control (100% de viabilidad). Como microorganismos indicadores se emplearon cultivos de 24 h de *C. jejuni* con una concentración final de 10⁸ UFC por caja de cultivo, se sembró por vertido en placa en agar BHI (BD Bioxon, México) suplementado con 5% de SFB y conteniendo sólo 1.2% de agar-agar. El medio de cultivo inoculado se dejó solidificar y sobre el agar se perforaron pozos de 6 mm de diámetro. Por separado, en cada uno de los pozos se colocaron alícuotas de 50 µL de los cultivos de los diferentes tratamientos simbióticos desencapsulados crecidos en caldo MRS. Después de que el líquido de los cultivos se absorbió, las placas se incubaron 24 h en microaerofilia (BD GasPak® EZ) a 37 °C. La actividad antibacteriana se registró como la zona de inhibición (milímetros) libre de crecimiento alrededor de cada pozo. El estudio se realizó por triplicado.

6.5 Estabilidad de las microcápsulas durante el almacenamiento

Se colocó 1 gramo por separado de microcápsulas con y sin prebióticos en bolsas de plástico herméticamente selladas, que fueron almacenadas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Posteriormente se determinó la sobrevivencia de las bacterias,

utilizando la metodología de vertido en placa antes mencionada, se realizó el muestreo inicial y después de nueve semanas.

6.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el Software statistica versión 8.0 (StatSoft, 2007). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, las diferencias entre medidas se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon con empleando la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95%.

VII. RESULTADOS

7.1 Actividad antibacteriana de BAL con y sin prebióticos contra *Campylobacter jejuni* in vitro

Al analizar el efecto antimicrobiano de las cuatro cepas de BAL libres y con prebióticos contra *C. jejuni*, todas las combinaciones presentaron efecto inhibitorio. Los diámetros de las zonas de inhibición de las BAL sin prebióticos oscilaron entre 6 y 11 mm (Figura 5). En el caso de L17, el mayor efecto inhibitorio se presentó cuando se adiciono FOS al 0.6%. Por otro lado, L19 libre presentó mayor efecto inhibitorio que con la adición de los prebióticos, esto se puede atribuir a que al metabolizar los prebióticos, esta cepa no produce algún metabolito que pudiera producir cuando se encuentra de forma libre, permitiendo la inhibición del patógeno.

La cepa L20 presentó un efecto sinérgico contra *C. jejuni*, ya que el efecto inhibitorio fue mayor cuando se le adicionó 0.6% de FOS (Figura 5). En el caso de L25, la presencia de inulina favoreció su efecto inhibitorio en comparación con la BAL libre o con FOS. De todas las cepas, L17, L19 y L25 mostraron mayor efecto antibacteriano y la cepa L20 mostró el mínimo (Figura 5). En algunos casos se observó un aumento significativo del efecto inhibitorio de las cepas de BAL contra el patógeno evaluado, esto se debe a la presencia de alguno de los prebióticos utilizados. De acuerdo a los resultados obtenidos, la actividad antimicrobiana determinó las combinaciones de cepas y de prebióticos a encapsular, siendo excluida la mezcla L19 adicionada con prebióticos (Tabla 5).

Recientemente se reportó un estudio donde se evaluó la actividad antimicrobiana de estas mismas cepas (L17, L19, L20, L25 libres) contra *Escherichia Coli* O157:H7, *Listeria Monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus Aureus*; obteniéndose zonas de inhibición entre 9 y 19 mm. Para los patógenos ensayados, la cepa L20 fue la que presentó un mayor efecto inhibitorio en comparación con las otras (Falfán-Cortés et al. 2022). Sin embargo, en el presente estudio no se encontró que esta cepa tuviera el mejor efecto inhibitorio contra *C. jejuni*. En varios estudios se ha demostrado que algunos

compuestos como las bacteriocinas y los ácidos orgánicos, han logran inhibir algunas especies similares o algunos tipos de microorganismos grampositivos (Helander et al., 1997).

Las bacteriocinas son metabolitos con una gran actividad antimicrobiana producidos generalmente por bacterias, tienen la capacidad de formar poros en la membrana celular de microorganismos patógenos. De igual forma otros compuestos como los ácidos orgánicos (ácido acético y ácido láctico) productos del proceso metabólico fermentativo de las BAL pueden inhibir a estos microorganismos. Por su naturaleza lipofílica los ácidos orgánicos pueden atravesar la membrana celular, disminuyendo considerablemente las reservas de energía, descendiendo el pH interno y ocasionando la desnaturalización de proteínas en los patógenos (Sardoy, 2016).

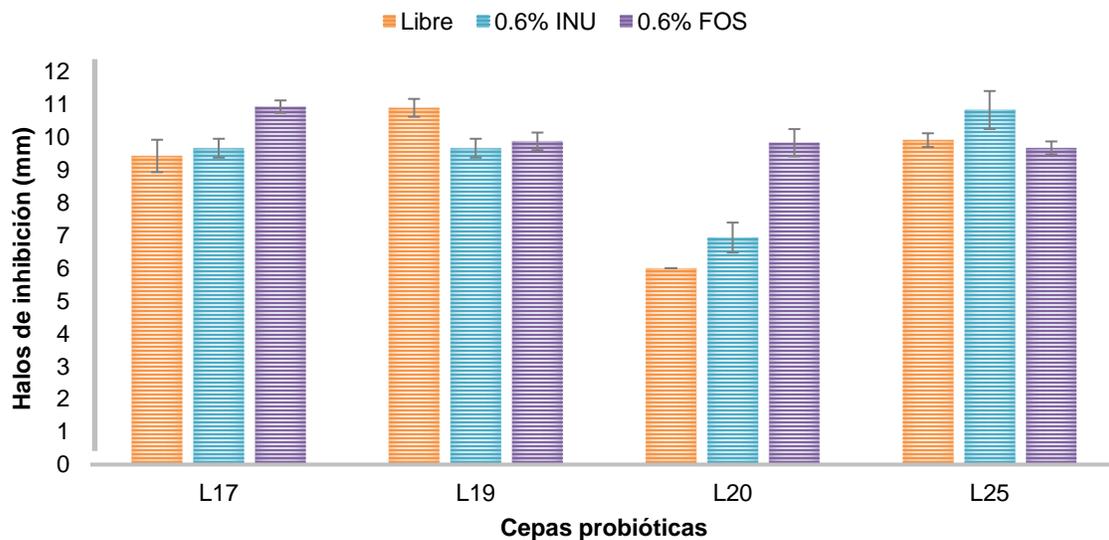


Figura 5. Efecto inhibitorio de BAL con y sin prebióticos contra *C. jejuni*.

Algunos autores como Fooks & Gibson (2002), evaluaron el efecto inhibitorio de *Lactiplantibacillus Plantarum* y *Lactobacillus Pentosus* contra *C. jejuni* utilizando como única opción de prebiótico FOS; en dicho estudio se observó que las zonas de inhibición oscilaron entre 5 y 8 mm. Sin embargo, en el presente estudio, las

zonas de inhibición contra *C. jejuni* alcanzaron hasta 11 mm, valores superiores a lo reportado por los investigadores anteriores.

7.2 Caracterización de los microencapsulados obtenidos por secado por aspersion

7.2.1 Eficiencia del proceso de encapsulación (EE%), contenido de humedad (%) y actividad de agua (a_w)

Posterior al encapsulado, los polvos obtenidos mediante el secado por aspersion fueron evaluados para determinar algunas propiedades fisicoquímicas, como la eficiencia de encapsulación (EE%), la actividad de agua (a_w), y el contenido de humedad (%). Estas propiedades fueron evaluadas para todos los tratamientos mostrados en la Tabla 6. En la eficiencia de encapsulación se quería comprobar si el prebiótico aportaba algún beneficio extra de protección al momento de realizar la microencapsulación. Para el caso de L17, el prebiótico demostró que no ofrecía una mejor protección en comparación con L17 sin prebiótico. Por otro lado, cuando L20 fue adicionada con FOS al 0.6%, mostró tener un incremento significativo ($p < 0.05$) en la eficiencia de encapsulación (EE%), lo cual nos indica que el prebiótico podría estar otorgando una mayor protección durante el proceso de encapsulación. Por último, L25 no mostró un incremento en la eficiencia de encapsulación cuando se le adiciono inulina (Tabla 6). En todos los tratamientos se obtuvieron altas eficiencias de encapsulación mayores al 90%.

En cuanto a la actividad de agua de las microcápsulas secadas por aspersion se obtuvieron valores entre 0.2 y 0.3, mientras que en el contenido de humedad se obtuvieron valores entre 5.3 y 7.4%. De acuerdo con Tonon et al. (2009), las microcápsulas con una actividad de agua por debajo de 0.3 presentan mejor estabilidad durante el almacenamiento. Por otro lado, el contenido de humedad en las microcápsulas estuvo significativamente influenciado por la temperatura del aire de secado de entrada y de salida, la composición y la concentración de la solución de alimentación (Anandharamakrishnan et al., 2008). Los resultados muestran que la adición de FOS exhibió un aumento significativo ($p < 0.05$) en el contenido de humedad en comparación con las BAL encapsuladas solo con N-lok.

Tabla 6. Eficiencia de encapsulación (% EE), contenido de humedad (%), actividad de agua, para los tratamientos de BAL con y sin prebióticos.

Tratamiento	% Eficiencia de encapsulado	Actividad de agua	% Contenido de humedad
L17	^a 93.9 ± 2.7 ^A	0.3 ± 0.0 ^A	5.7 ± 0.9 ^A
L17+0.6% FOS	95.3 ± 1.1 ^{AB}	0.3 ± 0.0 ^A	7.4 ± 0.2 ^B
L19	90.8 ± 0.7 ^A	0.3 ± 0.0 ^a	5.8 ± 0.3 ^B
L20	97.0 ± 1.8 ^A	0.3 ± 0.0 ^A	5.3 ± 0.4 ^A
L20+0.6% FOS	99.7 ± 0.7 ^B	0.3 ± 0.0 ^A	6.9 ± 0.0 ^B
L25	90.9 ± 2.9 ^A	0.3 ± 0.0 ^B	5.5 ± 0.1 ^A
L25+0.6% inulina	91.9 ± 0.4 ^A	0.2 ± 0.0 ^A	5.3 ± 0.2 ^A

^a Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar *Las distintas letras mayúsculas en cada columna denotan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

De acuerdo con lo reportado por Isuiza et al. (2018), los valores del contenido de humedad y de actividad de agua de los polvos, nos indican que estos encapsulados pueden ser implementados en alimentos secos como galletas tipo “saladas” ya que, los valores de estos factores fisicoquímicos son muy similares a los obtenidos en este estudio.

7.2.2 Caracterización morfológica de las microcápsulas

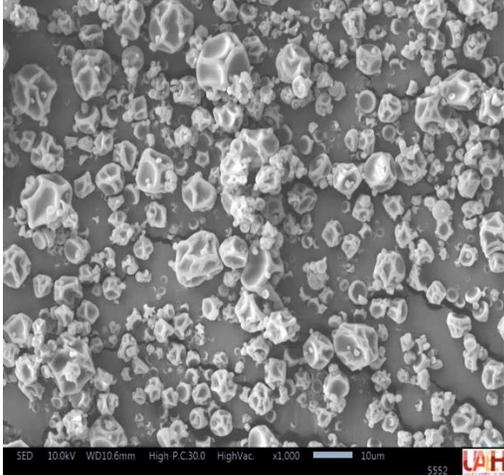
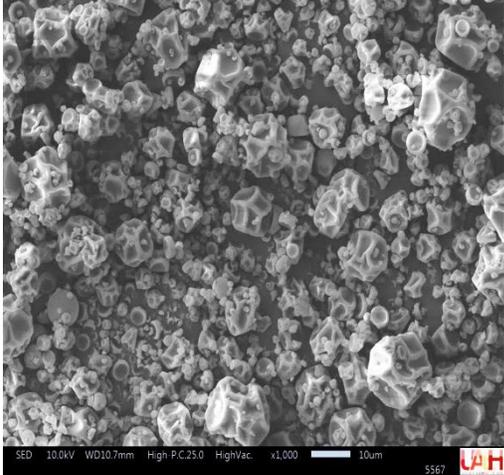
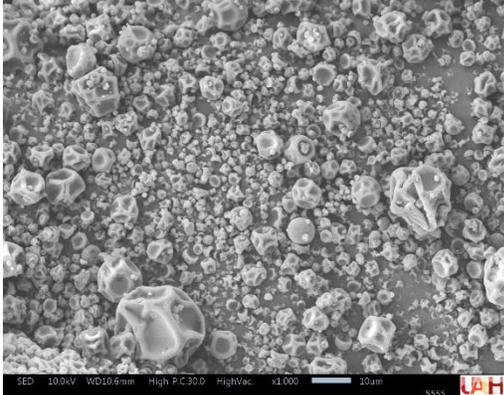
La morfología observada en las microcápsulas fue con cavidades en la superficie en todos los tratamientos obtenidos. Siendo esta una característica producida por el proceso de atomización y por el resultado de la rápida evaporación del agua (Tabla 7).

Autores como Rodríguez-Huezo et al. (2007) y Ying et al. (2010), han reportado resultados similares a los obtenidos en la presente investigación. El tamaño estimado de las microcápsulas obtenidas en los diferentes tratamientos fue de $\approx 20 \mu\text{m}$. El impacto de la textura de un modelo alimentario que contiene

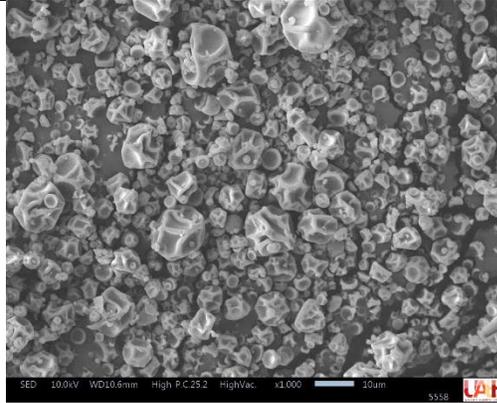
microcápsulas obtenidas por secado por aspersión depende del tamaño de dichas partículas Pérez-Leonard et al. (2013).

Las microcápsulas obtenidas de L20 por secado por aspersión (Tabla 7) presentaron una forma ovalada con formación de poros en la superficie, resultado de la rápida evaporación del agua, con un tamaño estimado de 9.9 μm . Cuando L20 fue adicionada con 0.6 % de FOS, el tamaño aproximado de las microcápsulas fue de 11.4 μm . Siendo un factor favorable, ya que de acuerdo con lo reportado por Pérez-Leonard et al. (2013), la morfología que tienen estas microcápsulas redondas u ovaladas, auguran una buena dispersabilidad y pueden ser distribuidas de manera homogénea en el producto al cual se deseen agregar. La eficiencia del encapsulado en todos los tratamientos se puede comprobar con las micrografías mostradas en la Tabla 7, ya que no se observaron bacterias en la superficie de la cápsula.

Tabla 7. Micrografías de microcápsulas de BAL con y sin prebiótico a (1000X) obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido.

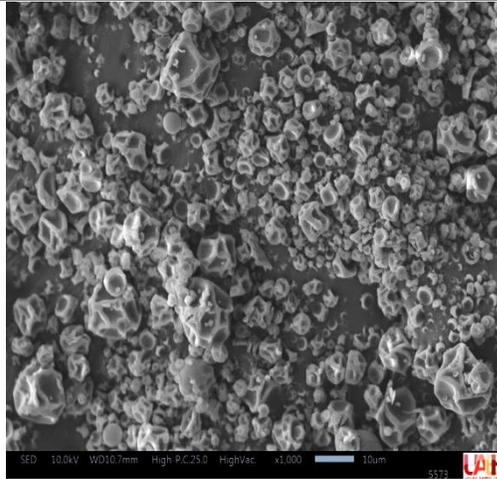
Tratamiento	Micrografía (1000X)	Tamaño de partícula (µm)
L17 SIN PREBIOTICO		^a 8.1 ± 2.8
L17 + 0.6% FOS		11.2 ± 3.2
L19 SIN PREBIOTICO		9.1 ± 6.3

L20 SIN PREBIOTICO



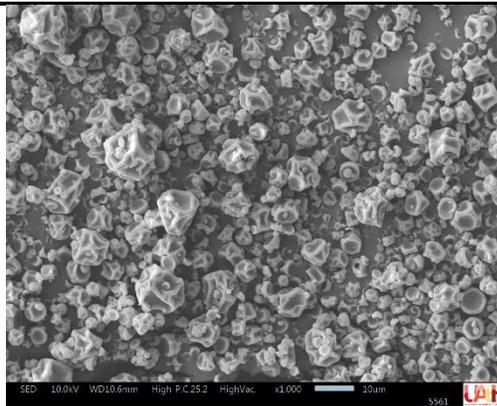
9.9 ± 5.1

L20 + 0.6% FOS



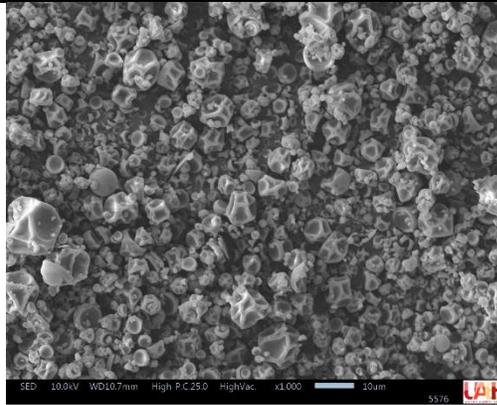
11.4 ± 3.9

L25 SIN PREBIOTICO



9.5 ± 3.0

L25 + 0.6% INULINA



5.9 ± 2.1

^a Promedio de cinco mediciones \pm desviación estándar

7.2.3 Efecto inhibitorio de BAL con o sin prebióticos después de la encapsulación

En general las BAL mantuvieron el efecto inhibitorio contra *C. jejuni* tal y como se aprecia en la Figura 6. Cabe destacar que tanto L19 y L20 se comportaron de manera distinta, esto se puede deber a que la capacidad antibacteriana depende de cada cepa de BAL y de la bacteria patógena objetivo, algunos autores como Papadimitriou et al., (2016), argumentan que existen cambios metabólicos posteriores a la encapsulación que reducen la síntesis de productos finales metabólicos.

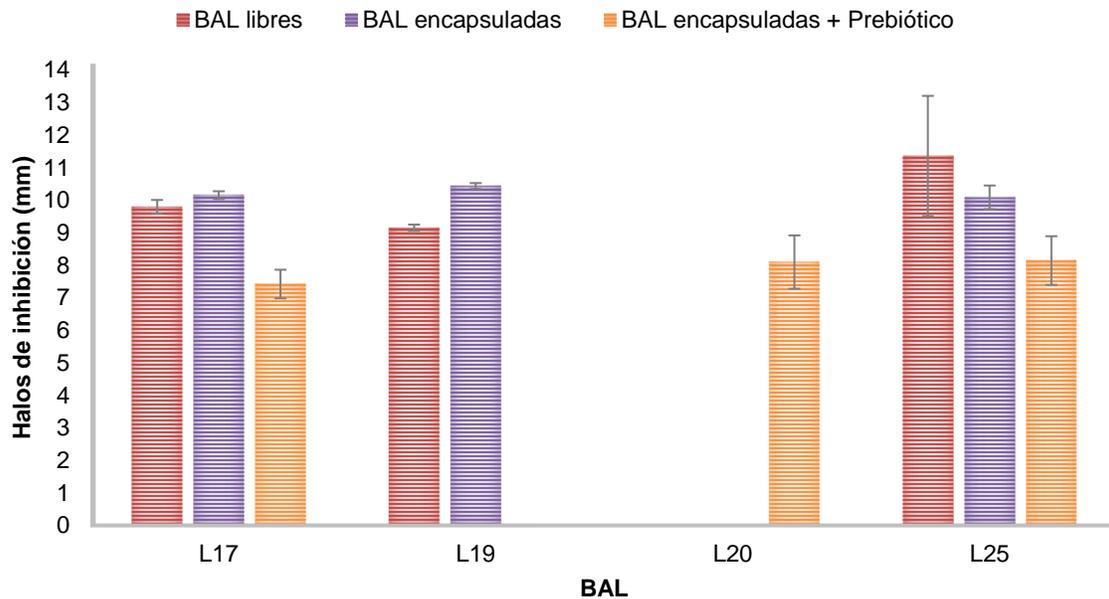


Figura 6. Comprobación del efecto inhibitorio de las BAL contra *C. jejuni* con o sin prebiótico después de la encapsulación.

7.2.4 Resistencia de BAL libres y encapsuladas a pH bajos y a sales biliares

Cómo se muestra en la Figura 7, se determinó la resistencia de las BAL libres, encapsuladas con y sin prebiótico (tabla 5) a pH 2 y sales biliares (0.3%), a condiciones similares a las del TGI, a tiempos controlados de 0, 1.5 y 3.0 h. Esto con la finalidad de comprobar si el proceso de microencapsulación y la adición de prebióticos aportaban protección a viabilidad de las BAL. Un factor importante que afecta la supervivencia de las cepas bacterianas probióticas es el pH; la supervivencia está restringida a valores de pH bajos (Dumitru et al., 2021).

En la Figura 7 se puede apreciar que L17, libres y encapsuladas, después de 3 h de exposición a pH 2, mantuvieron una supervivencia alrededor de ~ 6 a 8 Log UFC/mL o g. Las bacterias libres tuvieron mayor resistencia al pH bajo en comparación con las encapsuladas con o sin el prebiótico. Ya que, a las 3 h, el efecto disminuyó de manera considerable tanto en las encapsuladas con o sin prebióticos, por lo que para esta bacteria la microencapsulación no presentó

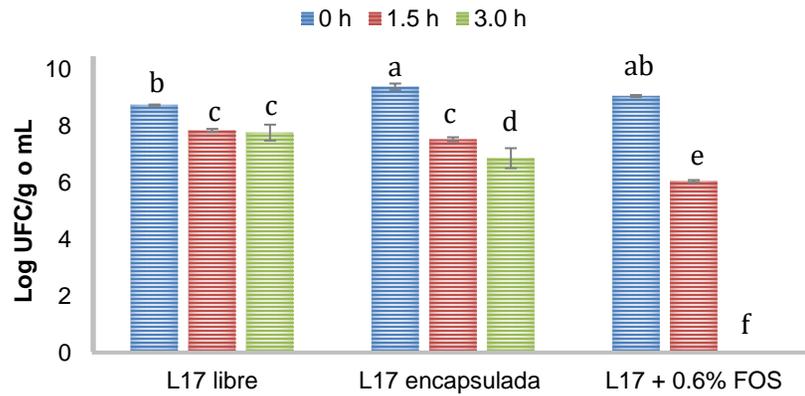
ventaja, al ser evaluada en estas condiciones. Sin embargo, para las bacterias L19, L20 y L25, los resultados fueron favorables con la encapsulación y la adición del prebiótico.

Para L19 (Figura 7), se observó que tuvo un comportamiento diferente al de L17, ya que el proceso de encapsulamiento logró mantener la viabilidad de la BAL hasta las 3 h de exposición a pH 2. En la Figura 8 L19 libre y encapsulada mantuvo su viabilidad alrededor de 6 Log UFC/g posterior a 3 h de exposición a sales biliares.

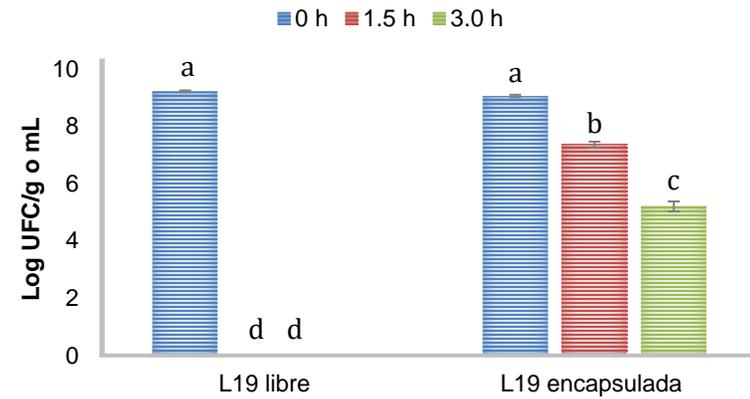
En el caso de L20, se aprecia un efecto completamente diferente en comparación con L17 y L19, ya que el tratamiento con FOS al 0.6% fue el que presentó mayor resistencia a condiciones de bajo pH a lo largo de las 3 h de exposición, en comparación con el tratamiento en donde se expuso a L20 libre y encapsulada sin prebiótico. Esto se puede atribuir a que los fructooligosacáridos le están proporcionando otra barrera de protección adicional a la microencapsulación. Sin embargo, cuando los diferentes tratamientos de L20 fueron expuestos a sales biliares (Figura 8), se observó que L20 encapsulada fue la que presentó la mayor sobrevivencia a diferencia de los otros tratamientos.

Por último, se puede apreciar en la Figura 7 que L25, al igual que L20, tuvo una mayor resistencia a pH 2 en presencia de FOS, este mismo comportamiento se observó cuando se expuso a sales biliares. Con esto se confirma que L25 con el prebiótico mantiene su sobrevivencia posterior a lo largo de las 3 h de exposición. Según lo reportado por Pupa et al. (2021), después de exponer cinco diferentes cepas de BAL encapsulas por secador por aspersion a condiciones similares a las del TGI alcanzaron concentraciones por encima de 6 Log UFC/g, resultado similar al que se obtuvo en el presente estudio. Se ha reportado que los prebióticos a su vez logran reducir la producción de bilis y también estos estimulan la hidrolasa de sales biliares (BSH). La BSH hidroliza los ácidos biliares conjugados glico- y tauro-desoxicólicos, los cuales conducen a la desconjugación de estos ácidos biliares (Ooi & Liang, 2010).

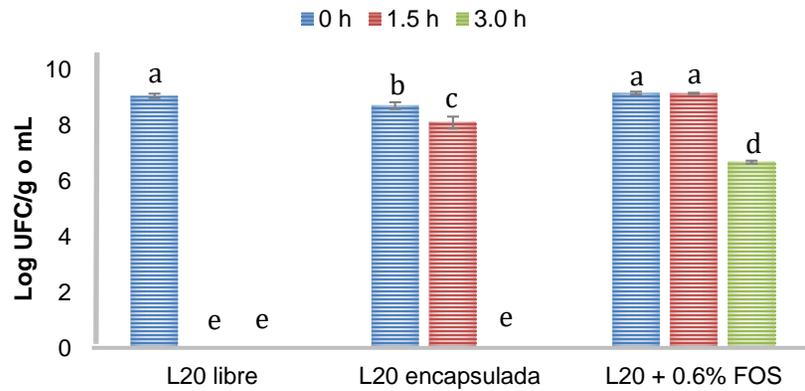
a)



b)



c)



d)

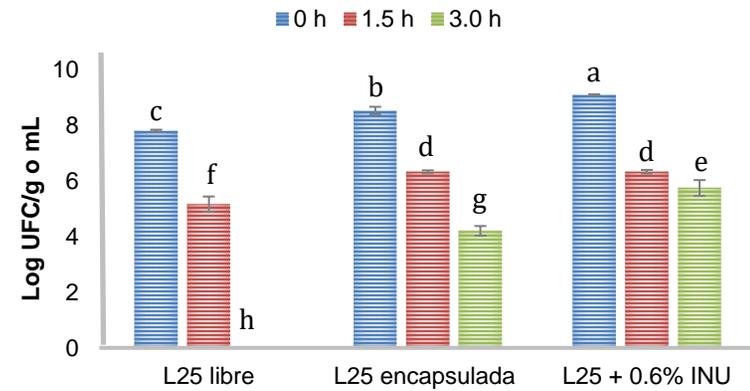


Figura 7. Sobrevivencia de a) L17, b) L19, c) L20 y d) L25, libres, encapsuladas con y sin prebióticos a pH 2 a tiempo 0, 1.5 y 3 h.

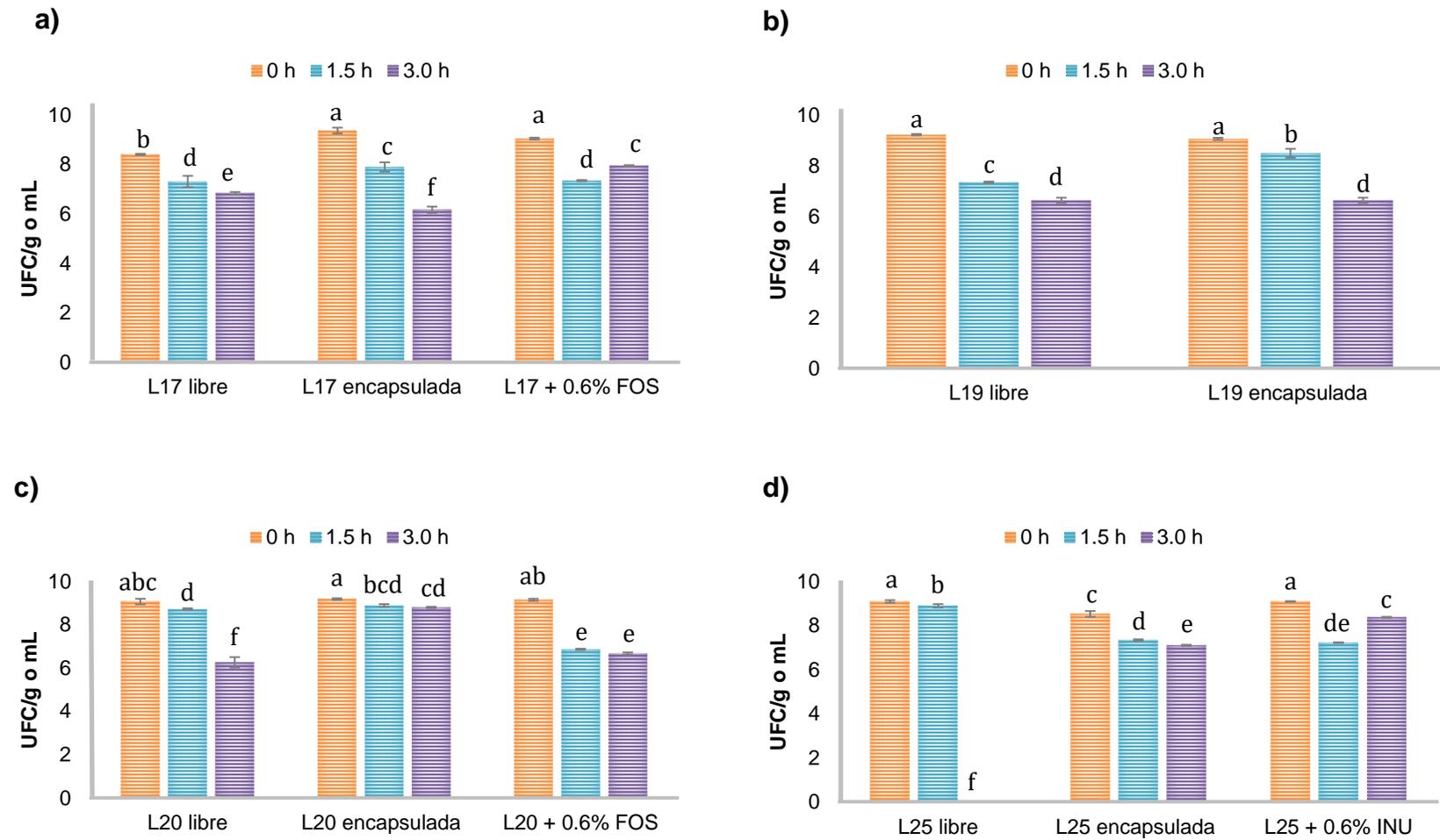


Figura 8. Sobrevivencia de a) L17, b) L19, c) L20 y d) L25, libres, encapsuladas con y sin prebióticos a 0.3% de sales biliares a tiempo 0, 1.5 y 3 h.

7.2.5 Viabilidad de las BAL microencapsuladas con y sin prebióticos durante el almacenamiento

El recuento de la viabilidad de las BAL encapsuladas con y sin prebióticos, se realizó posterior al secado por aspersión, esto se llevó a cabo, por medio del método de vertido en placa. En la Figura 9 se presenta la concentración bacteriana de las BAL encapsuladas con y sin prebióticos, donde T_0 es la viabilidad posterior al proceso de secado y T_f es la viabilidad después de nueve semanas. En el caso de L17, se observó que en presencia de inulina al 0.6%, después de nueve semanas de almacenamiento, se mantuvo la concentración, mientras que en comparación con el tratamiento sin inulina, en este caso se presentó una reducción significativa en la viabilidad.

L19 fue únicamente analizado sin prebióticos, ya que los resultados anteriores esta BAL mostraron que esta bacteria tiene mayor resistencia y efecto antimicrobiano sin prebióticos, este comportamiento se podría deber, muy probablemente a los metabolitos que produce sin los prebióticos. En la Figura 8 se observa que la viabilidad disminuyó de manera significativa después de las nueve semanas. Sin embargo, la concentración se mantiene alrededor de 9 Log UFC/g.

En cuanto a la viabilidad de L20, después de las nueve semanas de almacenamiento, se apreció (Figura 9) una diferencia significativa en ambos tratamientos. De acuerdo a lo descrito por Hernández-López et al. (2019), quienes evaluaron esta misma cepa encapsulada bajo las mismas condiciones, hallaron que después de 9 semanas de almacenamiento a 30 °C, está llegó tener una concentración de ~4 Log UFC/g. Con L25 se observó (Figura 9) un comportamiento similar a L19, en donde para los dos tratamientos evaluados existió una diferencia significativa en la viabilidad posterior a las nueve semanas de almacenamiento. Las BAL que tuvieron una mayor estabilidad y viabilidad fueron L17 y L19, ya que estas presentaron la mejor resistencia posterior al almacenamiento de nueve semanas. Esto nos indica que el prebiótico aplicado con L17 está ayudando a la funcionalidad y viabilidad de la BAL. Podemos argumentar que en este estudio, la BAL que tuvo una mejor resistencia a sales biliares y pH bajos fue L25, además de ser la BAL que

presentó el mayor efecto inhibitorio contra *C. jejuni*, esto se puede deber a que la capacidad antibacteriana de esta cepa es mayor en comparación de las otras 3 BAL.

7.2.6 Morfología de las BAL microencapsuladas con y sin prebióticos después del almacenamiento

En las Figuras 10 y 11 se pueden apreciar las micrografías de los diferentes tratamientos encapsulados después de las nueve semanas de almacenamiento a temperatura ambiente. Todas las microcápsulas mantuvieron su forma esférica, con presencia de algunas concavidades. Las concavidades son típicas de productos obtenidos por secado por aspersión. Como también lo observaron Hernández-López et al. (2018), quienes encapsularon *L. paracasei* UAEH20 con N-lok y evaluaron su viabilidad después de doce semanas a temperatura de 4 y 30 °C.

Las microcápsulas, en general no mostraron grietas o fracturas visuales en sus superficies. Por lo tanto, podría garantizar una mayor protección de los microorganismos probióticos a lo largo del almacenamiento (Rajam & Anandharamakrishnan, 2015).

Las micropartículas producidas con inulina y fructooligosacaridos presentaron una forma regular y una superficie con muchas concavidades características del secador por aspersión. Desde un punto de vista comercial, es importante mantener la estabilidad del polvo atomizado durante la vida útil.

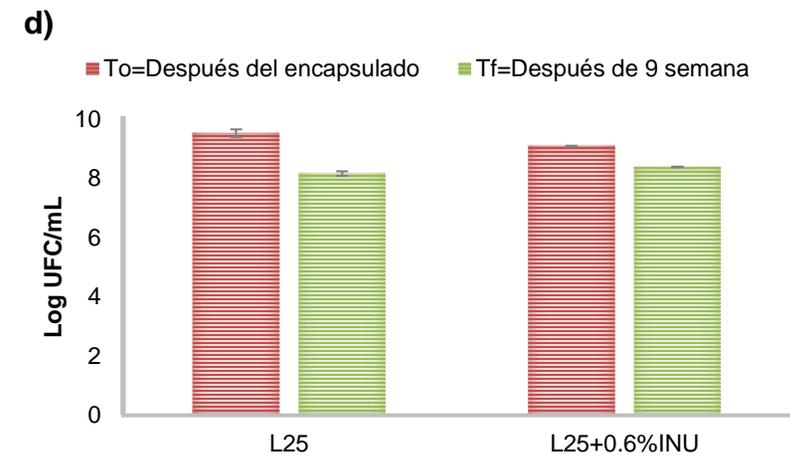
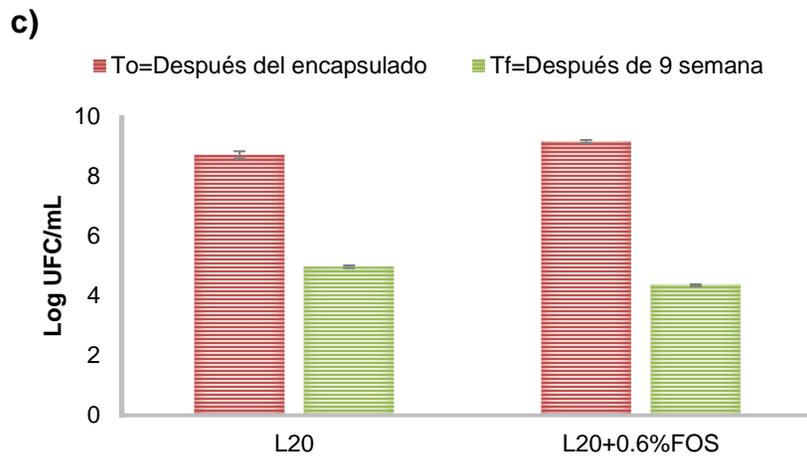
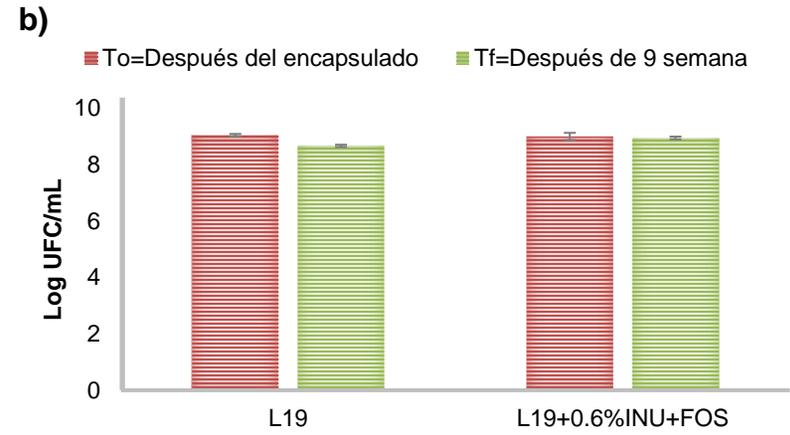
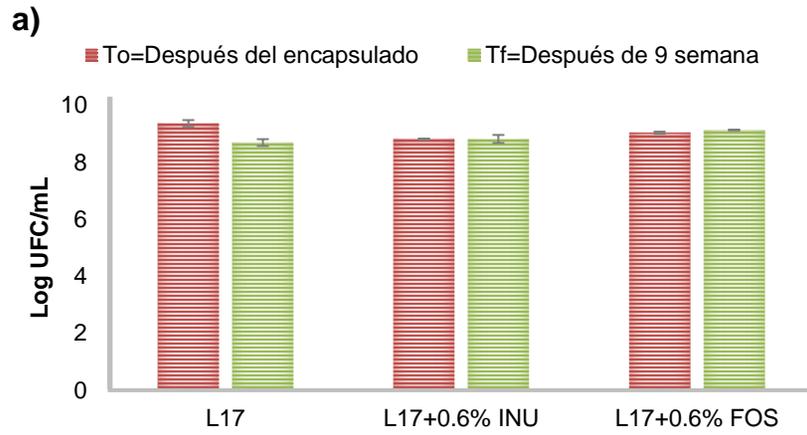
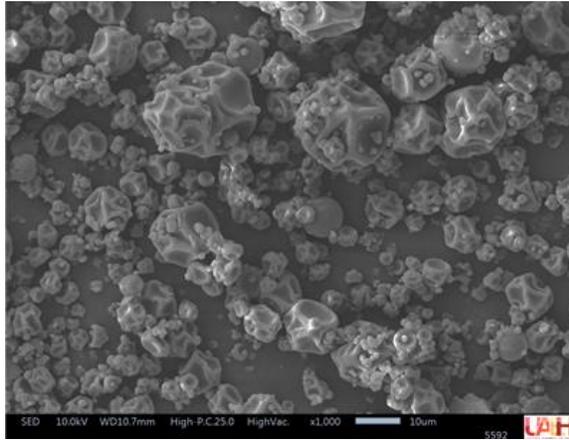
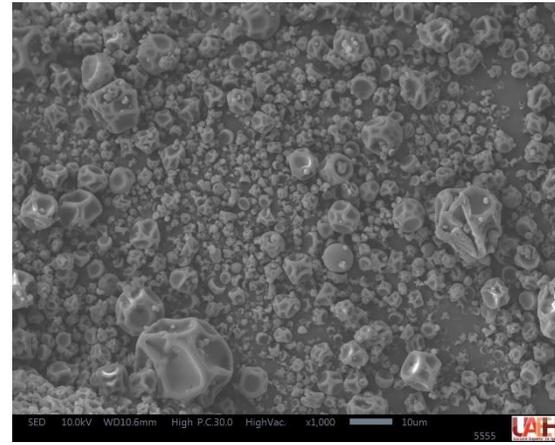


Figura 9. Gráficos de las BAL sin y con prebiótico después de 9 semana de almacenamiento a 25 ± 2 °C

a)



b)



c)

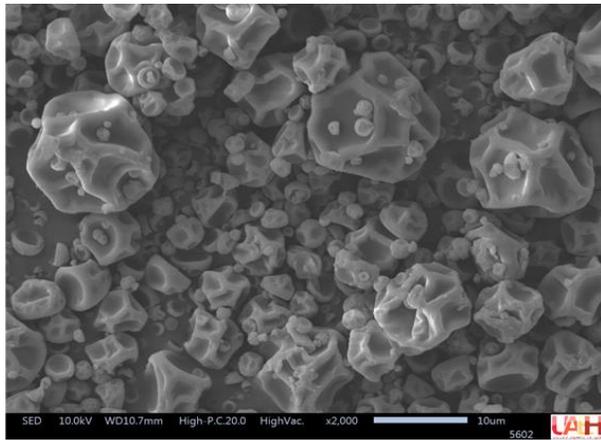
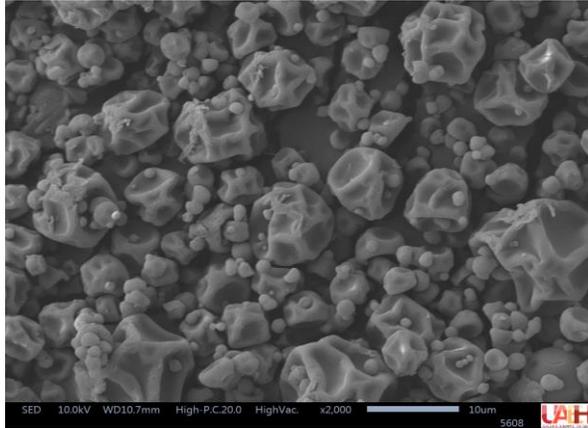
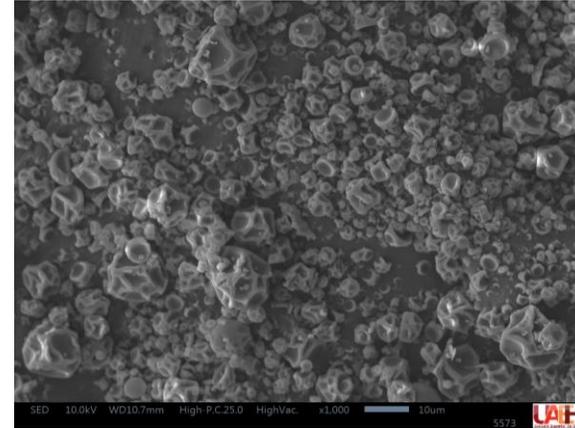


Figura 10. Micrografías obtenidas por MEB (1500X) de microcápsulas después de nueve semanas de almacenamiento de a) L17 sin prebiótico b) L17+0.6% Inulina y c) L19 sin prebiótico.

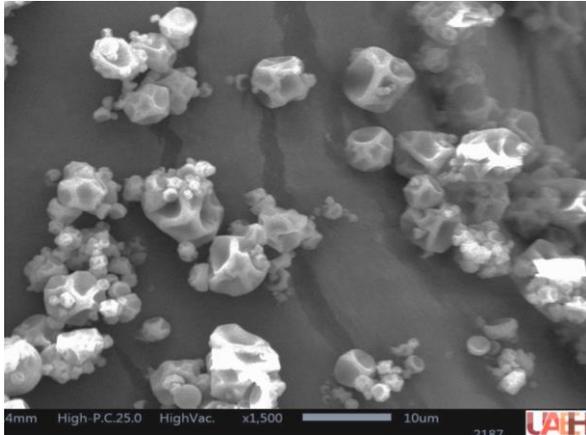
a)



b)



c)



d)

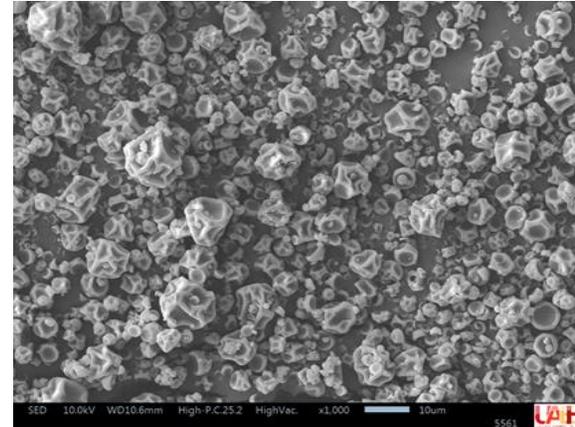


Figura 11. Micrografías obtenidas por SEM (1500X) de microcápsulas después de nueve semanas de almacenamiento de a) L20 sin prebiótico b) L20+0.6% fructooligosacáridos, c) L25 sin prebiótico y d) L25+0.6% Inulina.

VIII. CONCLUSIONES

La encapsulación mediante el secado por aspersion y la adición de prebióticos (inulina o FOS) incrementa a las BAL (L17, L19 y L25) el efecto antibacteriano contra *C. jejuni*.

En general, los prebióticos (inulina o FOS) al 0.6% incrementan la eficiencia de encapsulación de L17, L20 y L25 de forma significativa ($p < 0.05$)

El proceso de encapsulación mediante secado por aspersion de todos los tratamientos es eficiente de acuerdo a las micrografías obtenidas mediante MEB.

El efecto inhibitorio de las cuatro BAL contra *C. jejuni* se mantuvo después del proceso de secado por aspersion. La microencapsulación y la adición de prebióticos ofrecieron protección a las BAL contra las condiciones adversas similares a las TGI a las que fueron expuestas.

Las BAL mantuvieron una viabilidad por encima de los 8 Log UFC/g después de las nueve semanas de almacenamiento. L25 microencapsulada con inulina, fue la BAL que obtuvo los mejores resultados en la mayoría de las pruebas *in vitro*.

Las cepas de *E. lactis* tienen un elevado potencial para ser empleadas como coadyuvante en el tratamiento de Campilobacteriosis. Sin embargo, es importante continuar realizando pruebas tanto en animales como en humanos.

IX. REFERENCIAS

- Alvarado Ramírez, M. Á., & Nataren Estrada, G. (2022).” Elaboración de helado casero adicionado con bacterias probióticas e inulina como prebiótico. “
- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C. D., & Stapley, A. (2008). Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray drying of whey proteins. *LWT- Food Science and Technology*, 41(2), 270-277.
- Atia, A., Gomaa, A., Fliss, I., Beyssac, E., Garrait, G., & Subirade, M. (2016). A prebiotic matrix for encapsulation of probiotics: physicochemical and microbiological study. *Journal of Microencapsulation*, 33(1), 89-101.
- Alpas, H., Lee, J., Bozoglu, F., & Kaletunc, G. (2003). Evaluation of differential scanning calorimetry of high hydrostatic pressure sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Int. J. Food Microbiol.* 87:229–237.
- Arias, C., & Rodriguez, M. (2007). Informe técnico del proyecto: Determinación bioquímica de la madurez del Agave tequilana Weber var. azul en el laboratorio y su implementación en campo. México. CRT.
- Aberle, T., Burchard, W., Vorweg, W., & Radosta, S. (1994). Conformational contribution of amylose and amylopectin to the structural properties of starches from various sources. *Starch/Stärke*. 46: 329-335.
- Audisio, M. C., Torres, M. J., Sabate, D. C., Ibarguren, C., & Apella, M. C. (2011). Propierties of diferents lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiology Research*. 166: 1-13.

- Araujo, R. C., Daley, D. R., Goodall, S. R., Jalali, S., Bisneto, O. G., Budde, A. M., ... & Engle, T. E. (2019). Effects of a microencapsulated blend of essential oils supplemented alone or in combination with monensin on performance and carcass characteristics of growing and finishing beef steers. *Applied Animal Science*, 35(2), 177-184.
- Bronowski, C., James, C. E., & Winstanley, C. (2014). Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS microbiology letters*. 356(1): 8-19.
- Bian, L., (2008). An in vitro antimicrobial and safety study of *Lactobacillus reuteri* DPC16 for validation of probiotic concept. Tesis de maestría de la universidad Massey, Auckland Nueva Zelandia.
- Beristain, S. C., Palou, E y López, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 6: 64-78.
- Bustamante, M., Villarroel, M., Rubilar, M., & Shene, C. (2015). *Lactobacillus acidophilus* La-05 encapsulated by spray drying: Effect of mucilage and protein from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *LWT - Food Science and Technology*. 62(2): 1162–1168. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.017>.
- Chang Suárez, A. F., & Tomalá Pacheco, B. S. (2021). Análisis bibliográfico de la determinación de campylobacter en pollos por medio de la técnica PCR en países de Sudamérica. Repositorio.ug.edu.ec. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/53555>
- Cabeza-Herrera, E. A., Laguado-Corredor, G. E., y Suarez-Quintana, W. H. (2018).

Modelamiento del crecimiento de bacterias ácido lácticas en chorizo cocido empacado al vacío bajo condiciones isotérmicas de refrigeración. *Bistua*. 17(1): 124. <https://doi.org/10.24054/01204211.v1.n1.2019.3154>.

Casado-Salgado, R. (2021). Extractos de hojas de olivo como fuente de compuestos antibacterianos frente a cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de la cadena alimentaria de la carne de pollo. *Handle.net*. <http://hdl.handle.net/10261/253215>

Catalán, R., Neira, A., Rivas, B. L., y Melo, R. (2000). Polimerización de injerto de fibra celulósica secundaria con metacrilato de metilo y metacrilato de etilo. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 45(3), 391-402.

Cueto, C., & Aragón, S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol in vitro. *Scientia Agropecuaria*, 3(1), 45-50.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & Villarán, M. del 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(1–2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022>

Chen, M. J., & Chen, K. N. (2007). Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, 83–112. <https://doi.org/10.1002/9780470277881.ch4>

Dunne, C., Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., Halloran, S y Feeney, M. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73, 386–392.

Dubey, R. (2009). Microencapsulation technology and applications. *Defence science journal*, 59(1), 82.

Doron, S., & Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(Suppl 2), S129–S134.
<https://doi.org/10.1093/cid/civ085>

Duncan, B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11:1

Díaz Infante, A., & Grandez Grandez, L. (2020). Revisión y Análisis Comparativo de la Eficiencia de las Bacterias Ácido Lácticas en la Descomposición de los residuos orgánicos. Universidad Peruana Unión.
<https://repositorio.upeu.edu.pe/handle/20.500.12840/3288>

Delgado, D. L. C., Guzmán-Sánchez, T. J., Ferro-Villamizaro, S. A., Díaz-Gélvez, C. A., & Bernal-Pérez, M. Á. (2022). Salmonella sp., Campylobacter sp., Escherichia coli. en el sector avícola, bacterias que colocan en riesgo la seguridad alimentaria. *Spei Domus*, 18(2), 1-34.

Erginkaya, Z., Konuray, G., Harmanci, M., Kesen, G., & Nagihan, M. E. T. E. Antibacterial Effects of Microencapsulated Probiotic and Synbiotics. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 34(1), 27-36.

Ekmekci, I., Fiebiger, U., Stingl, K., Bereswill, S., & Heimesaat, M. M. (2017). Amelioration of intestinal and systemic sequelae of murine *Campylobacter jejuni* infection by probiotic VSL#3 treatment. *Gut Pathogens*, 9(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s13099-017-0168-y>.

- Encina, C., Vergara, C., Giménez, B., Oyarzún-Ampuero, F., & Robert, P. (2016). Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil. *Trends in food science & technology*, 56, 46-60.
- Elhadidy, M., Ali, M. M., El-Shibiny, A., Miller, W. G., Elkhatib, W. F., Botteldoorn, N., & Dierick, K. (2020). Antimicrobial resistance patterns and molecular resistance markers of *Campylobacter jejuni* isolates from human diarrheal cases. *PLoS ONE*, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227833>
- Elhadidy, M., Ali, M. M., El-Shibiny, A., Miller, W. G., Elkhatib, W. F., Botteldoorn, N., & Dierick, K. (2020). Antimicrobial resistance patterns and molecular resistance markers of *Campylobacter jejuni* isolates from human diarrheal cases. *PLoS ONE*, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227833>.
- Falfán-Cortés, R. N., Mora-Peñaflor, N., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Acevedo-Sandoval, O. A., Franco-Fernández, M. J., & Castro-Rosas, J. (2022). Characterization and Evaluation of the Probiotic Potential in Vitro and in Situ of *Lactobacillus paracasei* Isolated from Tenate Cheese. *Journal of Food Protection*, 85(1), 112–121. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-021>
- Fernández, J., Moreno, F. J., Olano, A., Clemente, A., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). A galacto-oligosaccharides preparation derived from lactulose protects against colorectal cancer development in an animal model. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02004>
- FAO/OMS, (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London ON, Canada.

- Galarza, A. (2019). Microencapsulación de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* mediante secado por aspersión. Uaeh.edu.mx. <https://doi.org/MALI%20.13270%202019>
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology*, 15(7-8), 330-347.
- Gutiérrez Ramírez, L. A. (2016). “Caracterización de cepas de *Bacillus* sp y Bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de Tilapia roja (*Oreochromis* sp) como potencial consorcio para procesos de microencapsulación.”
- García, A., Pacheco-Delahaye, E., Tovar, J., & Pérez, E. (2007). Caracterización fisicoquímica y funcional de las harinas de arracacha (*arracacia xanthorrhiza*) para sopas instantáneas physicochemical and functional characterization of the arracacha (*arracacia xanthorrhiza*) flours for instant soups. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(5), 384–393. <https://doi.org/10.1080/11358120709487717>.
- Helander, I., Von Wright, A., & Mattila-Sandholm. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8(5), 146–150. [papers3://publication/uuid/DB10A4C9-F57F-4926-987F-B9B087E15FAD](https://doi.org/10.1080/10445719710885903)
- Helmy, Y. A., Kassem, I. I., & Rajashekara, G. (2021). Immuno-modulatory effect of probiotic *E. coli* Nissle 1917 in polarized human colonic cells against *Campylobacter jejuni* infection. *Gut Microbes*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1857514>

- Hlashwayo, D. F., Sigaúque, B., & Bila, C. G. (2020). Epidemiology and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in animals in Sub-Saharan Africa: a systematic review. *Heliyon*, 6(3), e03537. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03537>
- Hernández-López, Z., Rangel-Vargas, E., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Cadena-Ramírez, A., Acevedo-Sandoval, O. A., Gordillo-Martínez, A. J., & Falfán-Cortés, R. N. (2018). Optimization of a spray-drying process for the production of maximally viable microencapsulated *Lactobacillus pentosus* using a mixture of starch-pulque as wall material. *LWT- Food Science and Technology* 95(4): 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.075>
- Horrocks, S. M., R. Rox Anderson, Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2009). Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and coli in animals. *Anaerobe*, 15(1-2), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.09.001>
- Huertas, R. A. P. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 8(1), 93-105.
- Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 50–56.
- Hernández-Cortez, C., Arreola Aguilera, M., & Castro Escarpulli, G. (2013). *Campylobacter jejuni*: ¿una bacteria olvidada? Situación en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(2), 77–84. http://www.amimc.org.mx/revista/2013/33_2/campylobacter.pdf.

Hofreuter, D. (2014). Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 137.

Isoiza, G. G. P., Perez, J. F. L., Sánchez, I. C., Olano, J. C., Salas, W., & Delgado, L. F. V. (2018). Vida en anaquel de galletas saladas utilizando pruebas aceleradas. In *Anales Científicos* (Vol. 79, No. 1, pp. 218-225). Universidad Nacional Agraria La Molina, Mex.

Iovine, N. M. (2013). Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, 4(3), 230-240.

Jin-Song, B. (2008). Accurate Measurement of Pasting Temperature by the Rapid Visco-Analyser: a Case Study Using Rice Flour. *Rice Science* 15(1): 69-72

Ketley, J. M. (1997). Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, 143(1), 5–21. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-1-5>

Kist, M., & Bereswill, S. (2001). *Campylobacter jejuni*. *Contributions to Microbiology*, 8, 150–165. <https://doi.org/10.4324/9780203856871-3>

Lastovica, A. J., & Allos, B. M. (2008). Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Campylobacter*, 123-149.

Montgomery, M. P., Robertson, S., Koski, L., Salehi, E., Stevenson, L. M., Silver, R., et al. (2018). Multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* outbreak linked to

puppy exposure—united states 2016–2018. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 67, 1032. doi: 10.15585/mmwr.mm6737a3

Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>

Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I., & Martínez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 91(3), 380-386.

Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 718–733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>

Natalia De Araújo, U., Ramírez, L. A. G., Villadiego, O. S. R., & Campuzano, O. I. M. (2015). Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: una revisión. *Alimentos Hoy*, 23(36), 112-126.

Neal-McKinney, J. M., Lu, X., Duong, T., Larson, C. L., Call, D. R., Shah, D. H., & Konkel, M. E. (2012). Production of Organic Acids by Probiotic Lactobacilli Can Be Used to Reduce Pathogen Load in Poultry. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043928>

Neria Pérez, Aidé. (2006). Evaluación de la capacidad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/1711>

Nelson, J. M., Smith, K. E., Vugia, D. J., Rabatsky-Ehr, T., Segler, S. D., Kassenborg, H. D., Zansky, S. M., Joyce, K., Marano, N., Hoekstra, R. M., & Angulo, F. J. (2004). Prolonged diarrhea due to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* infection. *Journal of Infectious Diseases*, 190(6), 1150–1157. <https://doi.org/10.1086/423282>

Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., y Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25(121), 20-33.

Pupa, P., Apiwatsiri, P., Sirichokchatchawan, W., Pirarat, N., Muangsin, N., Shah, A. A., & Prapasarakul, N. (2021). The efficacy of three double-microencapsulation methods for preservation of probiotic bacteria. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93263-z>

Paredes-López, O., Bello-Pérez, L. A. y López, M. G. (1994). Amylopectin: Structural, gelatinisation and retrogradation studies. *Food Chemistry* 50: 411-417.

Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M. A., Tortoló-Cabañas, K., & Gastón-Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47(1), 14-25.

Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>

Pinto, S. S., Verruck, S., Vieira, C. R., Prudêncio, E. S., Amante, E. R., & Amboni, R. D. (2015). Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics

on the survival of Bifidobacterium-BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT-food Science and Technology*, 64(2), 1004-1009.

Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 773-780.

Ramírez J. C., Rosas P., Velázquez M. Y., Ulloa J. A. & Arce F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente (CONACYT, MEX)*. 2 (7): 1-16.

Rodrigues, F. J., Omura, M. H., Cedran, M. F., Dekker, R. F., Barbosa-Dekker, A. M., & Garcia, S. (2017). Effect of natural polymers on the survival of *Lactobacillus casei* encapsulated in alginate microspheres. *Journal of microencapsulation*, 34(5), 431-439.

Sardoy, M. E. (2016). Caracterización de las sustancias con actividad antimicrobiana producidas por cepas de Lactobacilos potencialmente probióticas.

Sanz, Y., Collado, M. C., & Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica española*, 61(9), 476-482.

Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., & Dooley, J. S. G. (2005). Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41(4), 297–302. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01788.x>.

- Serna Jiménez, J. A. (2012). Elaboración de jugos de fruta con adición de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico (Master's thesis, Universidad de La Sabana, Col).
- Sheppard, S. K., & Maiden, M. C. (2015). The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(8), a018119.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., ... & Mentis, A. (2004). In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Applied and environmental microbiology*, 70(1), 518-526.
- Tala Orrillo, N. A. (2023). Evaluación de la influencia del encapsulamiento de cepas homofermentativas en la obtención del ácido láctico a partir de lactosuero.
- Villanueva-Castañeda, M., Barrera-Molina, A. I., Antúnez-Mojica, M., & García-Solís, S. E. (2023). Elaboración de una microencapsulación por gelación iónica a base de Kale (*Brassica oleracea* var. *Sabellica*). *Investigación Y Desarrollo En Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, 8(1), 657–666. <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.86>
- Velázquez Villarreal, D. A. (2018). “ Evaluación de las características probióticas del cocultivo de *L. plantarum* BAL 03-ITTG/*L. fermentum* BAL 21-ITTG. “
- Vera-Peña, M. Y., Rodríguez, M. C., & Valencia-García, F. E. (2019). Secado por atomización de bacterias ácido lácticas: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 15(29), 179-213.

- Villena, M. M., Hernández, M. M., Lara, V. G., & Martínez, M. R. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 50(1), 43-50.
- Villa, A. A. M. (2015). “ Estandarización e implementación de la norma ASTM D-4243 para la determinación del grado de polimerización del papel eléctrico (nuevo y usado) como aislante en transformadores de potencia por el método del promedio viscosimétrico (Doctoral dissertation, Universidad Tecnológica de Pereira, COL. Facultad de Tecnologías. Química Industrial). “
- Wada, T., Sugatani, J., Terada, E., Ohguchi, M., & Miwa, M. (2005). Physicochemical characterization and biological effects of inulin enzymatically synthesized from sucrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1246–1253. <https://doi.org/10.1021/jf048711u>
- Wieczorek, K., & Osek, J. (2013). Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Research International*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/340605>
- Zhang, Y., Zhang, Y., Xu, F., Wu, G., & Tan, L. (2017). Molecular structure of starch isolated from jackfruit and its relationship with physicochemical properties. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.