



Universidad de Concepción Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magister en
Ciencias Mención Microbiología

ENCAPSULACIÓN DE LA CEPA *LACTOBACILLUS*
***FERMENTUM* UCO-979C FORMADORA DE**
BIOPELÍCULA Y SU INFLUENCIA EN LA INHIBICIÓN DE
CRECIMIENTO DE *HELICOBACTER PYLORI*
EVALUADA *IN VITRO*

Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Mención Microbiología

MARCO ANTONIO VEGA SAGARDÍA
CONCEPCIÓN-CHILE

Julio 2017

Tutor: Apolinaria García Cancino
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor tutor:

Dra. Apolinaria García Cancino Facultad de
Ciencias Biológicas Universidad de
Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Homero Urrutia
Facultad de Ciencias Biológicas Universidad
de Concepción



Msc. Italo Fernández Fonseca
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Dra. Carolina Gómez Gaete
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Victor Campos
Facultad de Ciencias Biológicas

La presente tesis fue financiada por el proyecto CORFO BIO BIO, código 14IDL2-29744

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Probióticos y su acción sobre <i>H. pylori</i>	1
1.2. Características de <i>H. pylori</i>	2
1.3. Biopelículas de <i>Lactobacillus</i> spp.....	5
1.4. Encapsulación de probióticos.....	7
.HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1. Preparación de cápsulas <i>L. fermentum</i> UCO-979C.....	15
2.2. Determinación de la morfología, cuantificación de células viables en agar, y determinación de la presencia de exopolisacárido de las cápsulas.....	19
2.2.1. Análisis de morfología y determinación de células viables.....	19
2.2.2. Extracción de exopolisacáridos (EPS).....	20
2.2.3 Cuantificación de exopolisacáridos (EPS).....	22
2.3. Cuantificación de la liberación de la cepa <i>L. fermentum</i> UCO-979C a pH 3 desde las cápsulas e inhibición de crecimiento de <i>H. pylori</i>	22
2.3.1. Cuantificación de la liberación de la cepa UCO-979C a pH 3.....	22
2.3.2. Inhibición del crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i> causado por la cepa UCO-979C	24

2.4. Viabilidad en el tiempo de <i>L. fermentum</i> UCO-979C contenidos en las cápsulas.....	25
2.5. Análisis estadístico.....	26
3. RESULTADOS.....	27
3.1. Optimización de concentraciones de las matrices usadas para obtener cápsulas estables.....	27
3.2. Visualización de la morfología de la cápsula de biopelícula por microscopía óptica y por microscopía electrónica de barrido.....	35
3.3. Cuantificación de células viables de las cápsulas por recuento en placa en cápsulas planctónicas y de biopelícula, con y sin aceite.....	41
3.4. Liberación de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C desde las cápsulas expuestas a pH 3	44
3.5. Ensayo de difusión en agar de las bacterias contenidas en las cápsulas, y de bacterias liberadas a pH 3.....	47
3.6. Ensayo de recuento en placa cada 15 días, durante 60 días.....	50
3.7. Cuantificación de exopolisacáridos.....	54
4. DISCUSIÓN.....	59
5. CONCLUSIONES.....	73
6. PROYECCIONES.....	75
7. REFERENCIAS.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Condiciones de encapsulación.....	16
Tabla 2.2. Parámetros utilizados en encapsulador Buchi B-395 con boquilla de 75 µm de diámetro.....	18
Tabla 3.1. Encapsulación <i>L. fermentum</i> UCO-979C en alginato/ goma xantana por el método de extrucción con jeringa.....	28
Tabla 3.2. Recuento en placa de las cápsulas antes y después de ser cultivadas en caldo MRS por 12 h.....	42
Tabla 3.3. Análisis t- Student del recuento en placa, comparando cápsulas con y sin aceite, ya sea para cápsulas planctónicas como cápsulas de biopelícula.....	43
Tabla 3.4. Análisis t- Student del recuento en placa, comparando cápsulas planctónicas y con biopelícula, ya sea para cápsulas con y sin aceite.....	43
Tabla 3.5. Análisis t- Student de la liberación de bacterias probióticas a pH 3.....	46
Tabla 3.6. Datos en mm de el ensayo de difusión en agar columbia- sangre de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C contra <i>H. pylori</i> , antes y después de encapsular, y después de ser liberada por exposición a pH 3.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrategias alternativas a la actual terapia contra <i>H. pylori</i>	5
Figura 1.2. Perfiles de liberación celular en fluido gastrointestinal simulado de cápsulas de alta densidad bacteriana en distintas matrices.....	11
Figura 2.1. Procedimiento de la elaboración de cápsulas, en primera instancia en estado planctónico y posteriormente en estado de biopelícula.....	19
Figura 2.2. Shaker (Modelo Argolab SKI 4) usado en la liberación a pH 3 de las cápsulas a 150 rpm y 37 °C por 90 minutos.....	23
Figura 3.1. Diferencia visual del resultado de la encapsulación al utilizar ciertas condiciones indicadas en la Tabla 3.1.....	29
Figura 3.2. Visualización de algunas proporciones de las matrices usadas en la elaboración de las cápsulas en pruebas preliminares para ver concentración óptima utilizada por método de extrusión en jeringa.....	31
Figura 3.3. Visualización de la reducción de tamaño de cápsulas elaboradas en a una concentración de 1,5%, proporción 3:1 (AGN - XT) en cápsulas con y sin aceite, una concentración de 0,1M CaCl ₂	33
Figura 3.4. A: Cápsulas sin aceite en estado planctónico (Pla) y en estado de biopelícula (MRS) B: Cápsulas con aceite en estado planctónico (Pla) y en estado de biopelícula (MRS).....	34

Figura 3.5. Microscopía óptica de la cápsula sin aceite en estado de biopelícula.....	36
Figura 3.6. Microscopía óptica de la cápsula con aceite en estado de biopelícula	36
Figura 3.7. Visualización de la cápsula sin aceite que contiene <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C en matriz alginato/goma xantana en estado planctónico.....	37
Figura 3.8. Visualización de la cápsula sin aceite que contiene <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C en matriz alginato/goma xantana en estado de biopelícula.....	38
Figura 3.9. Visualización de la cápsula con aceite que contiene <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C en matriz alginato/goma xantana y 20% de aceite vegetal (Superficie).....	39
Figura 3.10. Visualización de la cápsula con aceite que contiene <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C en matriz alginato/goma xantana y 20% de aceite vegetal. (Corte transversal).....	40
Figura 3.11. Imagen del recuento en placa efectuado en las cápsulas elaboradas, específicamente en cápsula de biopelícula sin aceite.....	44
Figura 3.12. Liberación de las cápsulas de biopelícula en el tiempo.....	45
Figura 3.13. Efecto de erosión y debilitamiento de la cápsula producido al tratar por 90 minutos a pH 3 las cápsulas.....	46

Figura 3.14. Ensayo de difusión en agar columbia- sangre de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C contra <i>H. pylori</i> antes de encapsular la bacteria.....	49
Figura 3.15. Cápsulas con <i>L. fermentum</i> UCO-979C almacenadas a 4°C durante 60 días.....	51
Figura 3.16. Recuento en placa de las cápsulas a 25°C cada 15 días.....	52
Figura 3.17. Recuento en placa de las cápsulas a 4°C cada 15 días.....	53
Figura 3.18. Curva de calibración de dextrano.....	55
Figura 3.19. Cuantificación de azúcares totales con y sin bacteria en el sobrenadante de la extracción.....	56
Figura 3.20. Cuantificación de azúcares totales con y sin bacteria en el pellet de la extracción.....	57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Promedios de los duplicados graficados en las Figuras 3.19. (25 °C), y 3.20. (4 °C).....	87
Anexo B: Tabla de datos de absorbancia de los triplicados de la curva de calibración de dextrano (Figura 3.18.).....	88
Anexo C: Planilla de cálculo de los mg de EPS/gr cápsula.....	89



RESUMEN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa agente etiológico de úlcera péptica, linfoma gástrico y adenocarcinoma gástrico. Por ello, es importante encontrar alternativas para la prevención y tratamiento de infecciones con esta bacteria, en gran medida debido a su resistencia antibiótica. Una de estas alternativas es el uso de bacterias probióticas (tal como *Lactobacillus*), las cuales afectan a *H. pylori* a través de la producción de ácido láctico, bacteriocinas e inhibición de su adherencia al epitelio gástrico. La capacidad de *Lactobacillus* para formar biopelículas “*in vitro*” y el avance de los estudios relacionados con encapsulación de probióticos en estado de biopelícula, conllevan a que este trabajo tenga como objetivo encapsular en alginato-goma xantana, con y sin aceite vegetal, biopelículas de *Lactobacillus fermentum* UCO-979C y realizar estudios de morfología capsular, recuentos en placa, liberación de probióticos a pH gástrico, actividad anti-*H.pylori*, estabilidad en el tiempo de las cápsulas, y medición de exopolisacáridos. Los resultados avalan que fue posible encapsular la cepa UCO-979C en una matriz alginato-goma xantana proporción 3:1, con y sin aceite vegetal (20 %), y aumentar su densidad bacteriana al cultivar la cápsula en caldo MRS por 12 horas. Las cápsulas con biopelícula liberaron bacterias a pH ácido. La cepa UCO-979C conservó su actividad inhibitoria contra *H. pylori*, a pesar de ser encapsulada, y liberada a pH ácido. Recuentos de bacteria desde las cápsulas almacenadas por 60 días fueron mayores en cápsulas de biopelícula que planctónicas.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a Gram negative bacterium and the etiologic agent of peptic ulcer, gastric lymphoma and gastric adenocarcinoma. Therefore, mainly due to its resistance to antibiotics, it is important to develop alternatives to prevent and treat infections by this bacterium. An alternative is the use of probiotic bacteria (such as *Lactobacillus*) affecting *H. pylori* through the production of lactic acid, bacteriocines or inhibiting its adherence to the gastric epithelium. The capacity of *Lactobacillus* to form biofilms “*in vitro*” and the progress of studies on probiotics biofilms encapsulation lead to attempt the encapsulation of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C biofilms in alginate-xanthan gum, with or without vegetal oil, as the aim of this work. The study of the morphology of capsules, bacterial counts, release of bacteria at gastric pH, anti-*H.pylori* activity, stability of capsules through time and measurement of exopolysaccharides was done. Results showed that *L. fermentum* UCO-979C was encapsulated in a 3:1 proportion alginate-xanthan gum matrix, with or without 20 % vegetal oil, and that bacterial density increased when capsules were cultured in MRS medium for 12 hours. Capsules with biofilm (with or without vegetal oil) released bacteria at acidic pH. The strain UCO-979C maintained its inhibitory activity against *H. pylori* despite being encapsulated and released at acidic pH (90 minutes). Furthermore, bacterial counts of capsules stored for 60 days showed that counts were larger in capsules with biofilms when compared to planktonic ones.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Probióticos y su acción sobre *H. pylori*

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), define a los probióticos como "Microorganismos vivos, que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al receptor". Diversos experimentos "*in vitro*" e "*in vivo*", han demostrado su efecto beneficioso en el ser humano, principalmente frente a enfermedades gastrointestinales causadas por bacterias patógenas, ya que ayudan al balance de la microbiota normal, promoviendo la integridad y movilidad intestinal, e inhibiendo bacterias patógenas (Luc *et al.*, 2007; Kaushik *et al.*, 2009). Para que una bacteria sea denominada probiótica, debe cumplir una serie de requisitos: Ser preferentemente de origen humano si se va usar en humanos, tener propiedades no patogénicas, producir sustancias antimicrobianas, resistir al pH ácido del estómago y secreciones biliares, adherirse a mucosas y/o células intestinales, persistir en el tracto gastrointestinal y modular el sistema inmune (Pineiro *et al.*, 2007). Las bacterias más utilizadas como probióticos, son las bacterias ácido lácticas (BAL), principalmente los *Lactobacillus* que son bacterias de morfología bacilar mayoritariamente, Gram positivas, y se encuentra en la cavidad oral, tracto gastrointestinal y tracto urogenital,

principalmente. *Lactobacillus* spp. ha sido ampliamente utilizados para el diseño de probióticos, debido a su mayor aerotolerancia, lo que permite que esta bacteria presente una mejor estabilidad en alimentos (Kolida *et al.*, 2006).

En el último tiempo, se ha demostrado que diversas especies de *Lactobacillus* son capaces de inhibir el crecimiento de *H. pylori* y mejorar las tasas de erradicación de esta bacteria cuando se administran antes o después de la terapia estándar (Du *et al.*, 2012; Efrati *et al.*, 2012; Sunanliganon *et al.*, 2012). Se han demostrado variados mecanismos por los cuales estas bacterias probióticas son capaces de afectar a *H. pylori* "in vitro". La producción de ácido láctico inhibe la ureasa de *H. pylori* por disminución del pH gástrico. *Lactobacillus* inhibe la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas y produce bacteriocinas que provocan la muerte de *H. pylori*. Otros mecanismos incluyen la estabilización de la función de la barrera gástrica debido a la producción de mucina y respuesta inmunológica (Kim *et al.*, 2008; Yaşar *et al.*, 2010).

1.2. Características de *H. pylori*

Bacteria Gram negativa que se encuentra en el estómago humano y posee una forma espiralada. Aunque la colonización gástrica por *H. pylori* induce gastritis histológica en todos los individuos infectados, solo una minoría desarrolla

signos clínicos evidentes (Van Amsterdam *et al.*, 2006). Entre las patologías asociadas se encuentran la gastritis crónica, linfoma de MALT, úlcera duodenal y úlcera gástrica, e incluso es el principal factor de riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Uemura *et al.*, 2001).

H. pylori necesita al menos cuatro características básicas para ser capaz de colonizar y establecer una infección en la mucosa gástrica: la enzima ureasa, flagelos, presentar una forma de espiral y adhesinas. Es capaz de sobrevivir en pH gástrico gracias a la síntesis de ureasa, enzima que utiliza para generar un micro-entorno de pH neutro, ya que convierte la urea a iones de amoníaco, neutralizando el ácido jugo gástrico. Los 3 a 5 flagelos que posee *H. pylori*, junto con su forma espiral, le permiten penetrar la capa de mucina del estómago, consiguiendo adherirse a las células epiteliales gástricas mediante adhesinas específicas (Andersen, 2007). La infección por *H. pylori* afecta aproximadamente al 50% de la población mundial, llegando a valores de hasta un 90% en países en vías de desarrollo (Van Amsterdam *et al.*, 2006). La prevalencia de *H. pylori* en Chile varía entre un 60% y 79% dependiendo de la condición socioeconómica, de la educación y a las condiciones sanitarias de la población estudiada (Vallejos *et al.*, 2007).

El tratamiento para la erradicación de *H. pylori* requiere la combinación de varios fármacos, siendo la claritromicina el componente central. La última guía

de manejo de la infección por *H. pylori* (Malfertheiner *et al.* 2017) recomienda dos terapias de erradicación de primera línea: inhibidor de bomba de protones (PPI), claritromicina, y amoxicilina o metronidazol (terapia triple), sin embargo existe la problemática del aumento de la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina. En regiones de alta resistencia (> 15%) se usa la terapia cuádruple: PPI, bismuto, tetraciclina y metronidazol (terapia cuádruple).

La resistencia antibiótica principalmente a claritromicina (Aguilera-Correa *et al.* 2017) y la alta prevalencia de efectos adversos que producen los antibióticos, son las principales causas de las fallas en el tratamiento contra *H. pylori* (Malfertheiner *et al.* 2017; Wirtz *et al.* 2010). En el año 2007 los países con mayor consumo de macrólidos (incluyendo claritromicina) y antibióticos relacionados fueron Venezuela, Argentina y Chile. Debido a esto, hay un gran interés en la actividad probiótica contra *H. pylori*, ya que es una solución alternativa de bajo costo para prevenir o disminuir la colonización por *H. pylori* (Figura 1.1.) (Ayala *et al.* 2014).

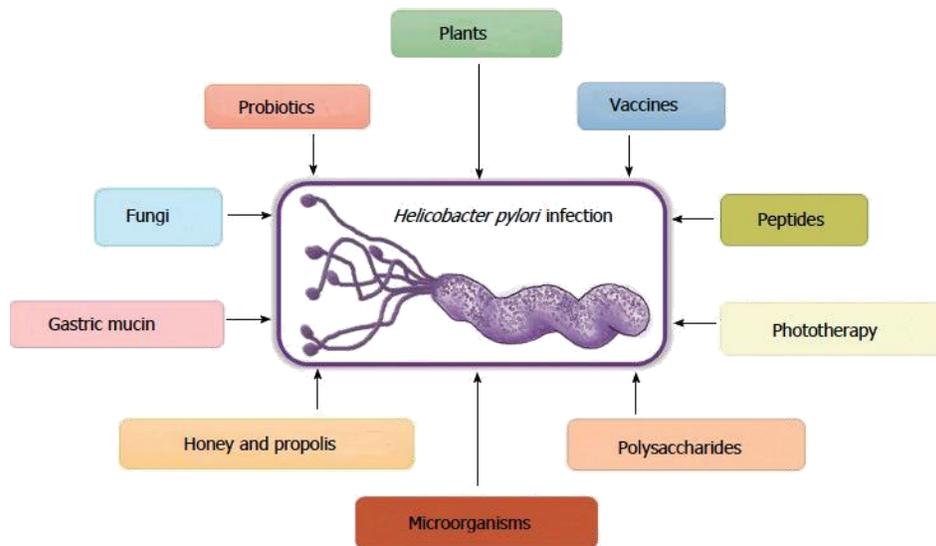


Figura 1.1. Estrategias alternativas a la actual terapia contra *H. pylori*.

(Fuente: Ayala *et al.* 2014).

1.3. Biopelículas de *Lactobacillus* spp.

Una biopelícula se define como una comunidad microbiana sésil caracterizada por células que están adheridas a un sustrato, interface o entre ellas, las cuales se encuentran embebidos en una sustancia polimérica extracelular producida por ellos mismos, y exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y transcripción génica (Donlan *et al.*, 2002).

Los microorganismos incluidos en una biopelícula muestran un comportamiento diferente a las células planctónicas, y son más resistentes a tratamientos convencionales con antibióticos, siendo capaces de evadir el sistema inmune del hospedador (Terraf *et al.*, 2012), además las células de la biopelícula son capaces de exhibir mayor resistencia a diversas tensiones presentes en su

entorno (ej: calor) (Zhu *et al.* 2001), estudios de encapsulación de probióticos muestran que representan una mejora comparado con la encapsulación de planctónicos, ya que hay mayor viabilidad a la temperatura y liofilización (Cheow y Hadinoto, 2013). Existen 5 etapas para formar biopelículas, en las 2 primeras etapas las células planctónicas presentan una asociación leve y débil al sustrato, seguida por una fuerte adhesión. La tercera y cuarta etapa se caracteriza por la agregación celular en microcolonias seguido por la maduración de la biopelícula y finalmente, en la quinta, las células que conforman la biopelícula se desprenden de la colonia y retornan a la vida planctónica transitoriamente y se dispersan. La formación de biopelículas por *Lactobacillus* spp. probióticos podrían promover la colonización y mayor permanencia a lo largo del tiempo en la mucosa del hospedador, impidiendo así la colonización por bacterias patógenas (Terraf *et al.*, 2012).

En nuestro Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, se ha demostrado que la cepa de *Lactobacillus fermentum* UCO-979C de aislamiento gástrico cumple con varias características que la hacen muy buena candidata para ser utilizada como bacteria probiótica contra *H. pylori* (Pineda, 2009; Márquez, 2011; Petermann, 2011; Salas-Jara *et al.* 2016^a, García *et al.* 2017) y es capaz de formar biopelículas "*in vitro*", en células AGS (línea celular de adenocarcinoma gástrico humano) y Caco-2 (línea celular de cáncer de colon) (Salas-Jara *et al.* 2016^a).

1.4. Encapsulación de probióticos

Para que los probióticos puedan ejercer su función en alimentos para uso humano es deseable que sea de origen humano, “GRAS” (“generally recognized as safe”) y deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales (Arribas, 2008). Es necesario que los microorganismos se introduzcan protegidos por una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno. Para ello, se recurre a las técnicas de encapsulación, que consisten en el recubrimiento de pequeñas cantidades de un determinado compuesto mediante un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica. La encapsulación protege a los materiales encapsulados de factores como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad, también se ha utilizado para mejorar el sabor y la estabilidad de medicamentos, además protege a los probióticos de bacteriófagos y ambientes adversos, como la congelación, tiempo de almacenamiento en algún alimento y pH gástrico (Martin *et al.*, 2009); sin embargo, hay que tener en cuenta que estas características pueden variar según las propiedades químicas de la matriz que se usará y su concentración.

La selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado

propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del coste. Entre las matrices que se usarán en este trabajo se encuentran: i) Alginato (AGN): Es el polímero más utilizado en la encapsulación de probióticos debido a su biocompatibilidad y bajo costo, se extrae principalmente de tres especies de algas marrones (*Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*). Los AGN son una familia de polisacáridos lineales no ramificados, que contienen cantidades variables de ácido (1,4) β -D-manurónico y de ácido α -L-gulurónico. La composición, extensión de sus ácidos y el peso molecular determinan sus propiedades físicas. Es capaz de gelificar al interactuar su carga negativa de COO^- derivada de los ácidos que la componen, con las cargas positiva de Ca^{++} (Martin *et al.*, 2009). Esta actividad de reticulación ayuda a estabilizar las cápsulas, sin embargo, cuando son tratadas con pH que simulan los jugos gástricos (JGS), el componente de alginato puede sufrir hidrólisis catalizada por el ácido. En esta condición, carboxilato de alginato es neutralizado, lo que conduce a la interrupción de la atracción electrostática de Ca^{++} y COO^- (Bajpai *et al.*, 2006). Además, los alginatos poseen muy buenas propiedades mucoadhesivas, lo que podría prolongar el tiempo de residencia en el estómago (Sosnik, 2014). Otro aspecto a considerar, es que cuanto menor sea la concentración de la solución de Ca^{++} y/o más corta sea la duración del proceso de la encapsulación, será menor el grado de reticulación, por lo tanto, la liberación del fármaco más rápida (Heng *et al.*, 2003). Estudios han comprobado que JGS catalizan la hidrólisis por ácido en cápsulas de AGN en

mayor medida, comparada con cápsulas de AGN recubiertas con quitosano (Kamalian *et al.*, 2014). Un sistema de matriz de AGN reticulado a muy bajo pH manifiesta una reducción en el peso molecular, causando una degradación más rápida y la liberación de ingredientes activos (Gombotz y Wee, 1998). En este trabajo se usará alginato de bajo peso molecular, lo que aumentaría la velocidad de liberación, según estudios realizados para la liberación de proteínas (Murata *et al.*, 1993). ii) Goma xantana (XT): Polisacárido que se utiliza convencionalmente como estabilizador de gelificación en los alimentos (Fareez *et al.*, 2015). La alta afinidad de XT para las moléculas de agua aumentan la inflamación de las cápsulas (Torres *et al.*, 2012), esto se puede atribuir a la estructura química de moléculas de XT que poseen carga negativa en grupos carboxilos en las cadenas laterales, lo que lleva al aumento de la fuerzas de repulsión y la expansión de la matriz, resultando en mayor capacidad absorción de agua. Estudios que han utilizado AGN y XT, denotan que la reticulación compacta del alginato con Ca^{++} se puede reducir, aumentando la difusión (Elfin, 1995), además la mezcla ayuda a preservar la viabilidad BAL (Fareez *et al.*, 2015). XT causa un cambio en la estructura de la matriz de la membrana de las cápsulas por creación de enlace de hidrógeno entre grupos hidroxilos de XT y grupos carboxilato de AGN, esto ciertamente conduce a una mejor protección de BAL (Bekhit *et al.*, 2016). A pesar de que la goma xantana es un polímero aniónico, que contiene una función ácido carboxílico, posee gran estabilidad a distintos pH, por lo que debe ser usado en pequeña cantidad para

que no aumente la resistencia de la cápsula al jugo gástrico, dicha propiedad se le atribuye a la forma de varilla de la molécula y la importancia de la unión de hidrógeno intermolecular que posee (Talukdar y Vercammen, 1993). Un estudio que busca liberar amoxicilina en medio gástrico para tratar infecciones con *H. pylori* demostró que ocupando AGN 1% y recubierto con quitosano 0.5% se obtenía una gran liberación (Sahasathian *et al.*, 2010), por lo que se deduce que al utilizar solo AGN, deberían obtenerse buenos resultados, ya que el quitosano contribuye a aumentar la resistencia a pH ácido.

Una forma de encapsular los probióticos formando una biopelícula, una comunidad de alta densidad de bacterias sésiles encerradas por una sustancia polimérica extracelular auto-secretada llamada exopolisacárido (EPS), que es innatamente más resistente que sus homólogos planctónicos a agentes antibacterianos (Cheow *et al.* 2010) y diversas tensiones presentes en su entorno (Por ejemplo, ácido, calor) (Zhu *et al.* 2001), como resultado de su estado metabólico inactivo y la capacidad de detección de quórum, así como la presencia de blindaje de los EPS (Cheow *et al.* 2010). La comparación de un estudio de la encapsulación de células planctónicas y biopelículas de *Lactobacillus rhamnosus* GG, mostraron que las células de la biopelícula de las cápsulas son superiores en términos de viabilidad en la liofilización y en la termotolerancia (Cheow y Hadinoto, 2013). Existe un estudio que vincula la liberación gastrointestinal de biopelículas (Cheow *et al.* 2014), en el que se

demuestra que cápsulas compuestas de AGN-XT recubierta con quitosano, después de 1 h de incubación en JGS (Figura 1.2.), presentan la mayor cantidad de células liberadas y corresponden a las cápsulas AGN-XT (4,9 log (CFU/mg) comparadas con cápsulas de solo AGN o utilizando una goma diferente (goma algarrobo), todas recubiertas adicionalmente con quitosano. Si se considera que quitosano es un polímero que le otorga mayor resistencia a pH gástrico a la cápsula, en su ausencia debería liberarse el contenido capsular más rápidamente.

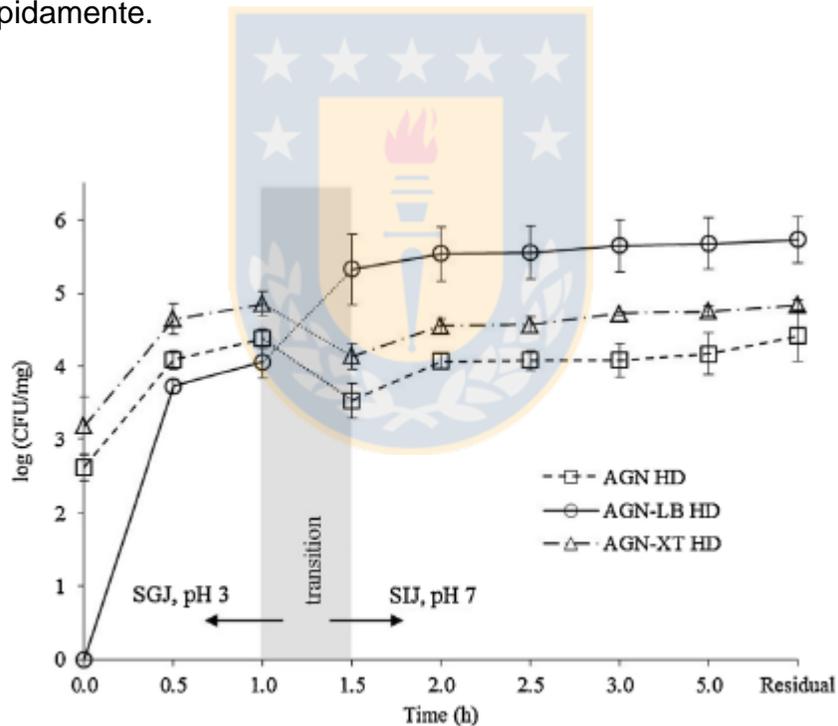


Figura 1.2. Perfiles de liberación celular en fluido gastrointestinal simulado de cápsulas de alta densidad bacteriana en distintas matrices. Alginato (AGN), alginato-goma algarrobo (AGN-LB) y alginato-goma xantana (AGN-XT).

(Fuente: Cheow *et al.* 2014).

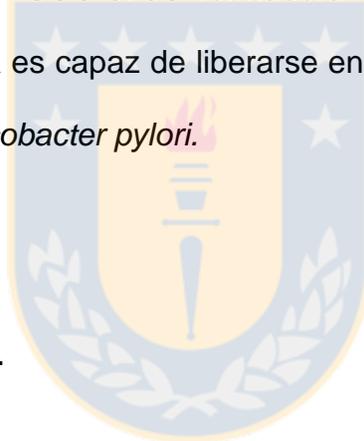
En este trabajo se utilizó capsulas con aceite para otorgarle la capacidad de flotar en un medio acuoso, que permitiría aumentar el tiempo de residencia en el estómago. Pocos estudios existen en donde mezclen aceite con una cápsula con bacterias, y ninguno donde usen cápsulas de biopelícula con aceite. Un estudio de Errate *et al.* 2015 que utilizó bacterias planctónicas probióticas (*L. casei*), las encapsuló con goma arábica, proteína de suero y aceite rico en omega 3, con el fin de potenciar actividades. Además, el aceite aumentó la hidrofobicidad de la bacteria, aumentando su capacidad para unirse a epitelios intestinales (Errate *et al.* 2017). En el presente trabajo se optó por el aceite vegetal por su reducido precio, ya que sería más barato a la hora de escalar; sin embargo, no se descarta usar aceites con mayor valor nutricional en estudios posteriores. Se usó 20 % de aceite extrapolando el mejor resultado de un estudio que pretendía que cápsulas de alginato flotaran en el estómago y liberaran su contenido, el cual era metronidazol (Ishak *et al.* 2007).

En este trabajo se elaboró un encapsulado que pueda contener *L. fermentum* UCO-979 en estado de biopelícula, en cápsulas de AGN-XT, con y sin aceite, y se evaluó su capacidad de liberarse a pH ácido (pH 3), donde la cápsula actuaría como soporte del biopelícula y permitiría la liberación de bacterias en el estómago. Además, se realizaron estudios de viabilidad para comprobar que la cápsula mantiene células vivas en su interior y que son capaces de inhibir el crecimiento de *H. pylori*, también se analizó la morfología capsular para ver

diferencias de las cápsulas con cultivo planctónico y con biopelícula, antes y después del tratamiento con pH ácido. Finalmente se realizó recuentos de los probióticos en el tiempo, a dos temperaturas diferentes (4 °C y 25 °C), y se midió en contenido de EPS de las cápsulas.

HIPÓTESIS

La cepa *L. fermentum* UCO-979C formadora de biopelícula encapsulada en alginato/goma xantana es capaz de liberarse en un medio de pH ácido e inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*.



OBJETIVO GENERAL

Encapsular la cepa de *L. fermentum* UCO-979C formadora de biopelícula en alginato/goma xantana y determinar la morfología, viabilidad (en el tiempo), liberación a pH ácido, inhibición del crecimiento de *H. pylori* de los encapsulados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar cápsulas de alginato/goma xantana que contengan *L. fermentum* UCO-979C en estado planctónico y de alta densidad bacteriana (biopelícula), previamente optimizando condiciones de encapsulación.
2. Determinar la morfología, cuantificar las células viables, y determinar la presencia de exopolisacárido de las cápsulas.
3. Cuantificar la liberación de la cepa *L. fermentum* UCO-979C a pH 3 desde las cápsulas y determinar la inhibición de crecimiento de *H. pylori* por parte de las bacterias contenidas en la cápsula y liberadas.
4. Medir la viabilidad en el tiempo de *L. fermentum* UCO-979C contenidos en las cápsulas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de cápsulas *L. fermentum* UCO-979C

Primero se realizaron cápsulas planctónicas, cultivando por 12-15 horas *L. fermentum* UCO-979C, y utilizando la mezcla de matrices de polisacáridos de alginato-goma xantana (AGN-XT) por gelificación externa. Se usó el método descrito en Cheow *et al.* (2014) con algunas modificaciones, condiciones que se evaluaron se observa en la tabla 2.1., Cheow *et al.* utilizó un porcentaje de 2 % (AGN-XT, 3:1), en conjunto con doble recubrimiento con quitosano. Sin embargo, este estudio buscó cápsulas más endebles para ser liberadas en el estómago, por ello se prescindió de aquel recubrimiento. Además, Se intentó reducir la concentración de alginato, cuyo porcentaje exitoso en la publicación Sahasathian *et al.* (2010), en donde evaluaron la liberación a pH gástrico de un antibiótico en una matriz de alginato, fue de 1%. Por ello, se probó diversas concentraciones para la matriz de polisacáridos usada, y encontrar la menor concentración que formaran una cápsula no tan dura y relativamente uniforme. Además, se utilizó dos concentraciones de CaCl_2 , considerando un estudio de Foster *et al.* (2012) que determinó que la concentración de calcio se relaciona con la reticulación. Habitualmente se utiliza 0,1 M, sin embargo, se probó también con la mitad de esta concentración (0,05M) para verificar si se

formaban cápsulas más blandas pero que conservaran su forma, y por ende, a las bacterias probióticas.

Tabla 2.1. Condiciones de encapsulación, en todas las cápsulas se conservó la proporción 3:1 (alginato, goma xantana), y el tiempo de endurecimiento post-encapsulación en CaCl_2 fue de 10 minutos. (Fuente: Elaboración propia)

AGN-XT (3:1)	CaCl_2 (M)
% p/v	
0,5	0,05
0,5	0,10
0,8	0,05
0,8	0,10
1,0	0,05
1,0	0,10
1,2	0,10
1,5	0,05
1,5	0,10
AGN-XT	CaCl_2
1,0 (0,5-0,5)	0,10
1,0 (0,6-0,4)	0,10

El detalle de la preparación de las cápsulas consistió en que primero se cultivó 15 μ L de un cepario de *L. fermentum* UCO-979C que se mantenía a -20 °C en 1 ml de caldo Man-Rogosa Sharpe (MRS, Difco) contenido en un eppendorf estéril, después de el crecimiento por una noche de las bacterias planctónicas (12-15h de crecimiento que corresponde a la fase exponencial) se centrifugó a 5000 rpm por 90 segundos, y se realizaron 2 lavados con suero fisiológico. Se agregó el pellet obtenido a 50 ml de una solución del AGN-XT en un matraz estéril de la proporción y concentración elegida, cuya matriz fue preparada anteriormente agregándole agua destilada y con ayuda de un agitador magnético a 200 rpm por 2 horas aproximadamente, y a 40 °C. Para las cápsulas de aceite (aceite vegetal belmont comercial) se le adicionó 20 % de aceite a la solución. Para optimizar la concentración de polisacáridos utilizados en las cápsulas y llegar a la conclusión de utilizar AGN-XT en proporción 3:1 y 1.5% p/v, se realizó el método de extrusión con jeringa de 10 ml, cuyas gotas caían en 200 ml de CaCl_2 contenidos un vaso precipitado y agitado a 100 rpm en un agitador magnético. Luego de optimizar la concentración mínima para formar una cápsula blanda y que conservara su forma, se atomizó en 250 ml de CaCl_2 estéril en un recipiente de vidrio, usando el encapsulador Buchi B-395 equipado con una boquilla de 750 μ m de diámetro, condiciones que se usaron después de pruebas preliminares se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Parámetros utilizados en encapsulador Buchi B-395 con boquilla de 750 μm de diámetro. (Fuente: Elaboración propia)

Parámetro	Cápsula sin aceite	Cápsula con aceite
Vibración frecuencia	40-50 Hz	50-70 Hz
Velocidad de flujo	100 ml/min	52 ml/min
Voltaje de electrodo	450 mV	450 mV
Amplitud	3	3

Las cápsulas que contenían con *L. fermentum* UCO-979C se formaron inmediatamente como resultado de la interacción entre el AGN y Ca^{++} . Se dejó endurecer durante 10 minutos a temperatura ambiente, después se filtraron las cápsulas con un colador estéril, y se lavaron con agua destilada, todo realizado en una cabina de flujo laminar.

Las cápsulas que contienen las biopelículas potenciales se prepararon desde las cápsulas de células planctónicas (modificado de Cheow *et al.* 2014) con una etapa de incubación adicional para formación de biopelícula, específicamente, durante 12 h (Salas-Jara *et al.* 2016^a) en caldo MRS complementada con CaCl_2 (20 %, concentración encontrada en ensayos preliminares) para evitar que se

disuelvan las cápsulas en este medio. En Figura 2.1. se resume el procedimiento.

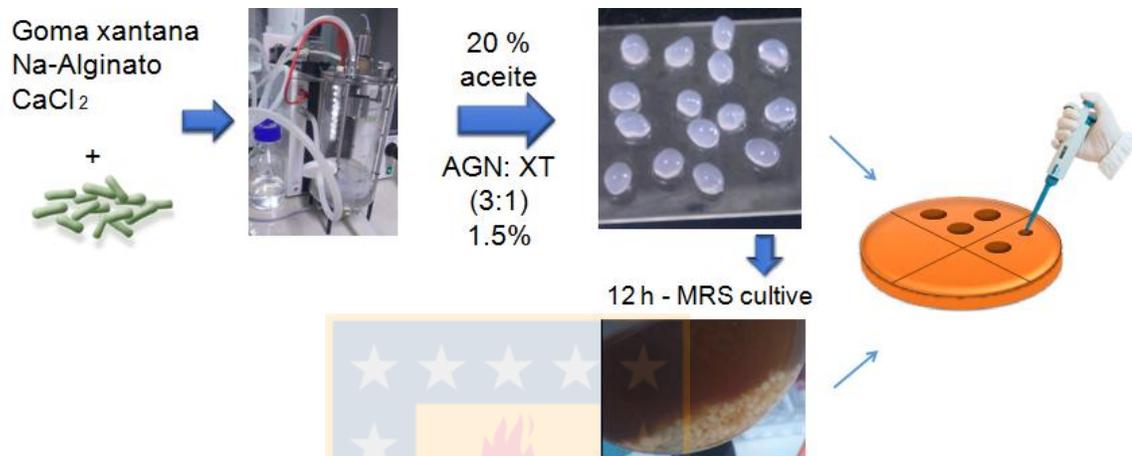


Figura 2.1. Procedimiento de la elaboración de cápsulas, en primera instancia en estado planctónico y posteriormente en estado de biopelícula. Las cápsulas con aceite se elaboraron con la misma metodología, solo que se adiciona 20% aceite a la matriz. (Fuente: Elaboración propia).

2.2. Determinación de la morfología, cuantificación de células viables en agar, y determinación de la presencia de exopolisacárido de las cápsulas.

2.2.1. Análisis de morfología y determinación de células viables

Se hizo un análisis macroscópico de la forma de la cápsula y tamaño. Además, La morfología (tamaño, forma) de cápsulas húmedas se caracterizó usando un

microscopio de luz (Motic BA410), mientras que la morfología más detallada fue visualizó por microscopio electrónico de barrido ETEC Autoscan (SEM), Laboratorio de microscopía electrónica, Universidad de Concepción.

Cada vez que se producían cápsulas, se introducía una cantidad aproximada de 10 cápsulas en un eppendorf estéril bajo un gabinete de flujo laminar, para luego pesarlas en una balanza analítica (peso no incluye el eppendorf). Estas cápsulas luego fueron disueltas en 1 ml de PBS con ayuda de un vortex. Cuando fue necesario se usó estrés mecánico con ayuda de una pinza estéril. Posteriormente se utilizó el método de recuento en placa por 48 h de incubación a 37 °C en agar MRS. El resultado del recuento se expresó en UFC/g cápsula (Figura 2.1.). Se analizó la cantidad de bacterias contenido tanto en cápsulas planctónicas como en cápsulas de biopelícula, para poder verificar si existe un aumento después de la incubación en caldo MRS.

2.2.2. Extracción de exopolisacáridos (EPS)

El método que se usó para extraer EPS es una adaptación del descrito por Tallon *et al.* (2003). Para esto, primero se disolvió una cantidad conocida de cápsulas que contienen a *L. fermentum* UCO-979 (300 mg aproximadamente) en 1 ml de suero fisiológico, tanto cápsulas planctónicas como en estado de biopelícula, después fue necesario el estrés mecánico con pinzas para

disolverlas. Luego se centrifugó la solución a 10.000 g durante 10 min. En donde se obtuvo un sobrenadante y un pellet que fueron tratados de la siguiente manera.

El sobrenadante se trató con ácido tricloroacético (TCA) (concentración final del 15% v/v) durante 2 h bajo agitación suave, para luego centrifugar a 10.000 g durante 10 minutos, y el pellet se desechó. El sobrenadante que contenía el exopolisacárido (y azúcares de la matriz) se precipitó por la adición de dos volúmenes de etanol absoluto frío seguido de una incubación durante la noche a 4°C. Después se centrifugó a 10.000 g durante 10 min, y se resuspendió el pellet obtenido en 1 ml de agua destilada.

Para la extracción de exopolisacárido de la pared celular de las bacterias del pellet obtenido con la centrifugación inicial de las cápsulas, se resuspendieron en 2 ml de EDTA (0,05 M) y se mantuvo a 4°C durante 3 h seguido por una centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos. El pellet se desechó y al sobrenadante se le adicionó dos volúmenes de etanol absoluto frío durante una noche a 4°C, seguido de centrifugación a 6.000 g durante 15 min. El exopolisacárido recuperado en el pellet se suspendió en 1,5 ml de agua destilada, volumen final. Todas las muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta su utilización.

2.2.3. Cuantificación de exopolisacáridos (EPS)

El método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.* 1956) para determinar la concentración de exopolisacárido con pequeñas modificaciones. Alícuotas de 150 µl de exopolisacárido se trataron con 150 µl fenol (8%) y 750 µl de ácido sulfúrico al 98,5%, agitado a mano durante 5 s, y se incubó durante 15 min a 98 ° C. Para calcular la concentración de EPS se midió la absorbancia a 490 nm para hexosas y pentosas frente a una recta de calibrado con dextrano. Se diluyó 10 veces las muestras.

2.3. Cuantificación de la liberación de la cepa *L. fermentum* UCO-979C a pH 3 desde las cápsulas e inhibición de crecimiento de *H. pylori*.

2.3.1. Cuantificación de la liberación de la cepa UCO-979C a pH 3

La viabilidad de las bacterias encapsuladas liberadas a pH 3 se procedió según la metodología de Cheow *et al.* 2014, en donde se preparó la solución ácida mediante el ajuste del pH de la solución de NaCl a \approx pH 3 (0,2% p/v) adicionando HCl 1,0 M para simular la condición no en ayunas del estómago (Cook *et al.* 2011).

La viabilidad se determinó por inmersión de una cantidad conocida de cápsulas (200 mg aproximadamente) en un falcón de 50 ml, adicionándole 10 ml de la solución preparada anteriormente que está a pH 3, posteriormente se llevó a un incubador shaking a 150 rpm y 37 °C (Figura 2.2.), durante 90 minutos.

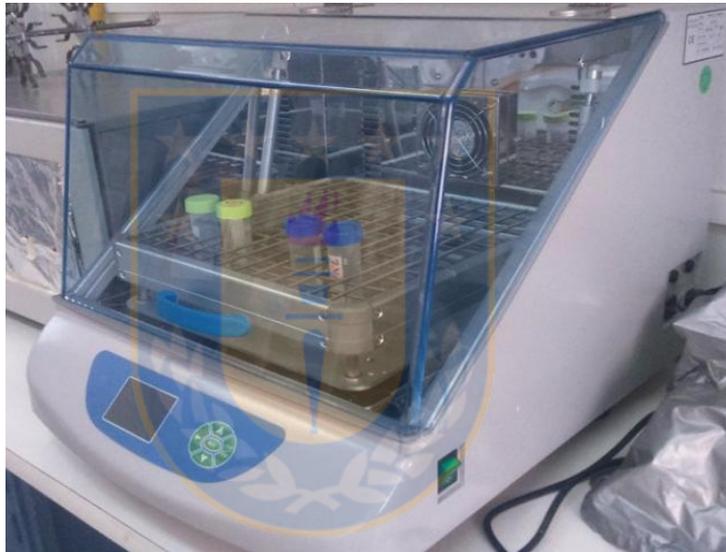


Figura 2.2. Shaker (Modelo Argolab SKI 4) usado en la liberación a pH 3 de las cápsulas a 150 rpm y 37 °C por 90 minutos. (Fuente: Elaboración propia).

Se tomó una alícuota de 200 uL (sin ningún tipo de cápsulas) en los tiempos 0, 45 y 90 minutos para cuantificar por recuento en placa la cantidad de bacterias viables liberadas a pH 3. Después se cultivó en placas MRS por 48 h a 37 °C para realizar el recuento pertinente. El tiempo de incubación imita el tiempo de vaciado de un estómago típico en adultos humanos (Graff *et al.* 2001).

2.3.2. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* causado por la cepa UCO-979C

La inhibición del crecimiento de *H. pylori* (cepa J99) se realizó utilizando la metodología de difusión radial, descrita por Sgouras *et al.* (2004). Brevemente, se prepararon 5 pocillos de 6 mm de diámetro aproximadamente con un sacabocado estéril (pipeta Pasteur autoclavada), en placas de 25 ml de agar Columbia suplementado con sangre de caballo desfibrilada y sin DENT. Posteriormente, las placas se inocularon usando tómulas estériles y una suspensión de *H. pylori* J99 a McFarland N°2 (Hartzen *et al.* 1997). El ensayo se hizo tanto para 1) La bacteria UCO-979C obtenida directamente desde cepario, 2) La bacteria UCO-979C de las cápsulas de biopelícula previamente recuperada en una placa después de crecer una noche al disolver la cápsula, y 3) Para la bacteria UCO-979C recuperada por el recuento en placa hecho previamente del sobrenadante de pH 3 y cultivada una noche. A continuación, cada suspensión de un cultivo de una noche (12-15 h) en 6 ml de caldo MRS sin citrato de la cepa UCO-979C, se centrifugó 3 veces 1 ml del cultivo a 5000 rpm por 1 minuto en cuya primera centrifugación se guardó el sobrenadante, y después se lavó 2 veces con suero fisiológico el pellet. Las placas se incubaron a 37° C, durante 96 h, en estufa de microaerofilia. Se depositaron 60 µL en cada pocillo, cada uno contenía MRS sin citrato, MRS sin cintrato + UCO-979C

(12 h), suero fisiológico, sobrenadante del cultivo de UCO-979C (12 h), pellet de la cepa UCO-979C en 0,5 ml de suero fisiológico.

Los resultados se expresaron según Gaudana et al. (2010), en el cual las cepas se definen midiendo sólo la zona de inhibición como: cepas no inhibidoras, halos ≤ 1 mm (+/-); cepas con ligera inhibición, halos = 2 mm (+); cepas con fuerte inhibición, halos = 2 - 5 mm (++); y cepas con muy fuerte inhibición, halos de más de 5 mm (+++). Se comparó la cepa en estado planctónico sin encapsular con la cepa liberada de las cápsulas de biopelícula a pH 3, adicionalmente se hará este ensayo para las bacterias encapsuladas en estado de biopelícula para verificar que la cápsula no interfiere en la inhibición con *H. pylori*.

2.4. Viabilidad en el tiempo de *L. fermentum* UCO-979C contenidos en las cápsulas

Para examinar la viabilidad de los encapsulados probióticos, se almacenaron a dos temperaturas diferentes: 25 °C (temperatura ambiente), 4 °C (temperatura refrigeración) durante 60 días en tubos de ensayo con suero fisiológico. El número de bacterias viables se determinó por recuento en placa como se explicó anteriormente en el inciso 2.1.

2.5. Análisis estadístico

Se utilizó desviación estándar de ser necesario considerando el número de réplicas de 3 o 2 según el ensayo. En todos los experimentos se comparó las cápsulas en estado planctónico con las que están en estado de biopelícula, que fueron cultivadas una noche en caldo MRS. Por otro lado, se aplicó un test t de Student (con un intervalo de confianza del 95%) para analizar el aumento de densidad bacteria en las cápsulas y la liberación a pH 3 de bacterias desde cápsulas.

Para el análisis de la concentración de exopolisacárido se realizó un Análisis de Varianzas (ANOVA) de tres vías. Posterior al análisis se realizaron contrastes con la finalidad de comparar los aumentos, con y sin bacteria, con y sin medio MRS (caldo sin citrato), tanto para el experimento con aceite como el experimento sin aceite. Los análisis fueron realizados utilizando el software estadístico InfoStat.

3. RESULTADOS

3.1. Optimización de concentraciones de las matrices usadas para obtener cápsulas estables

Para optimizar la cápsula que contendría la bacteria probiótica, con el fin de que fuese blanda y que permitiese la liberación a nivel gástrico, se probó diversas concentraciones y proporciones de matriz (AGN-XT) y dos concentraciones de CaCl_2 , las que se indicaron en materiales y métodos (Tabla 3.1.), en cuya tabla se pudo ver si se formaron las cápsulas en cada concentración usada. Cuando no se formaban las cápsulas se veía una masa, que indicaba que no había reticulación (Figura 3.1.).

Tabla 3.1. Encapsulación *L. fermentum* UCO-979C en alginato/ goma xantana por el método de extrucción con jeringa. Tiempo degelificación post encapsulación de 10 minutos. **X:** No gelifica. (Fuente: Elaboración propia).

AGN-XT (3:1) % p/v	CaCl ₂ (M)	Cápsula
0,5	0,05	X
0,5	0,10	X
0,8	0,05	X
0,8	0,10	Sí. Gelifica débil, poco viscoso
1,0	0,05	X
1,0	0,10	Sí
1,2	0,10	Sí
1,5	0,05	Sí (Gelifica muy débil)
1,5	0,10	Sí
AGN-XT % p/v	CaCl ₂ (M)	Cápsula
1,0 (0,5-0,5)	0,10	Sí. Viscosa y endeble
1,0 (0,6-0,4)	0,10	Sí. Irregular y deforme

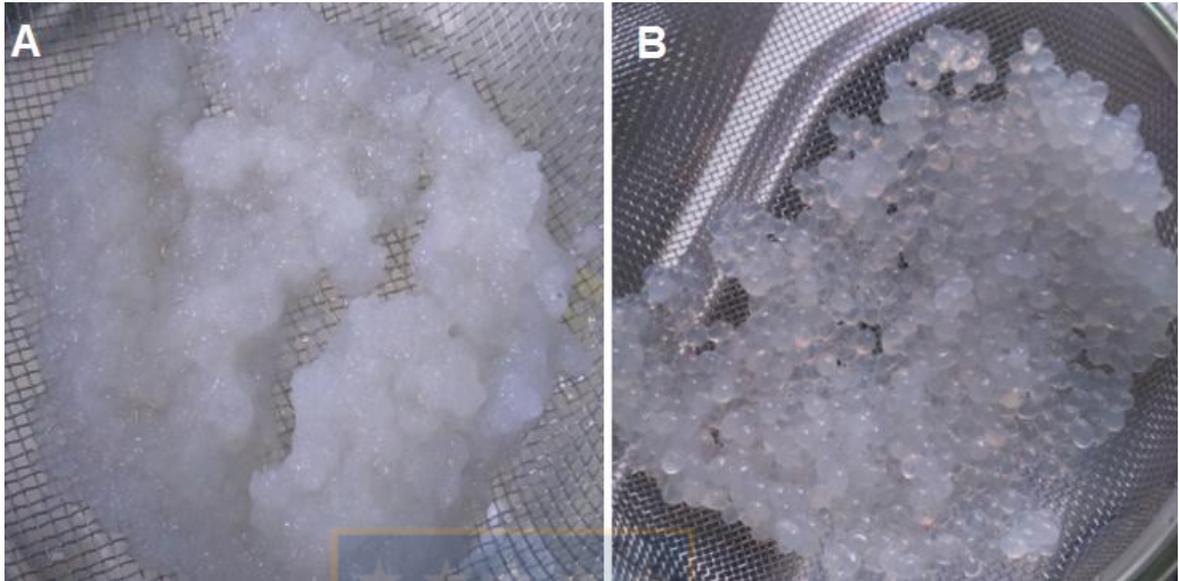


Figura 3.1. Diferencia visual del resultado de la encapsulación al utilizar ciertas condiciones indicadas en la Tabla 3.1. **A:** Cuando no se forman cápsulas con las condiciones indicadas en la Tabla 3.1., **B:** Cuando se forman cápsulas específicamente con la condición 1,5% (AGN-XT, proporción 3:1, respectivamente). (Fuente: Elaboración propia).

Hay que tener en cuenta que estas concentraciones fueron previamente probadas por el método de extrusión en jeringa para encontrar la proporción óptima para la producción de las cápsulas, por lo que después al usar el encapsulador, no se pudo utilizar la mínima concentración probada en jeringa que producía cápsulas de consistencia deseada (1%, proporción 3:1, AGN:XT) (goma xantana-alginato), sino que se usó (1,5%, proporción 3:1, AGN:XT) para obtener cápsulas más uniformes en el encapsulador, ya que al usar 1% y 1,2% (Tabla 3.1.) se observaban cápsulas más endebles y no conservaban su forma,

a pesar que a esas concentraciones se observó que se formaban cápsulas adecuadas con el método de extrusión en jeringa, deduciendo que estos métodos son ligeramente diferentes a la hora de obtener cápsulas, cuyas variables pueden ser la altura y velocidad con que caía la gota de la matriz, ya que fue ligeramente diferente la formación de cápsulas usando jeringa o el encapsulador (Cheow *et al.* 2014), además el tamaño de cápsula era un poco mayor en la jeringa (5mm en jeringa y 3 mm en encapsulador provocada por un boquilla de 750 μm , aproximadamente). Se fue variando la concentración tanto de polisacárido como de CaCl_2 , en casi todas las concentraciones de CaCl_2 de 0,05 M se observó que la cápsula no se formaba, excepto cuando se usaba proporción 1,5% (3:1, AGN:XT), pero era una cápsula muy débil y no mantenía la forma por mucho tiempo. En la Figura 3.2. se observó algunas imágenes de las cápsulas obtenidas de algunas proporciones utilizadas: 0.8% (0,6 AGN, 0,2 XT), 1% (0,5 AGN, 0,5 XT), 1% (0,5 AGN, 0,5 XT), y 1% (0,5 AGN, 0,5 XT), todas elaboradas en la etapa de optimización de parámetros para obtener la mejor cápsula por el método de extrusión en jeringa y con una concentración de CaCl_2 de 0,1 M. Se observa que cuando se utiliza mayor proporción de goma xantana las cápsulas son menos esféricas, ya que le concede cierta elasticidad (Cheow 2014 *et al.*), también se ve que cuando son tratadas a pH 3 por 90 minutos las cápsulas elaboradas por el método de extrusión en jeringa, en general presentan disminución de tamaño (Figura 3.2.).

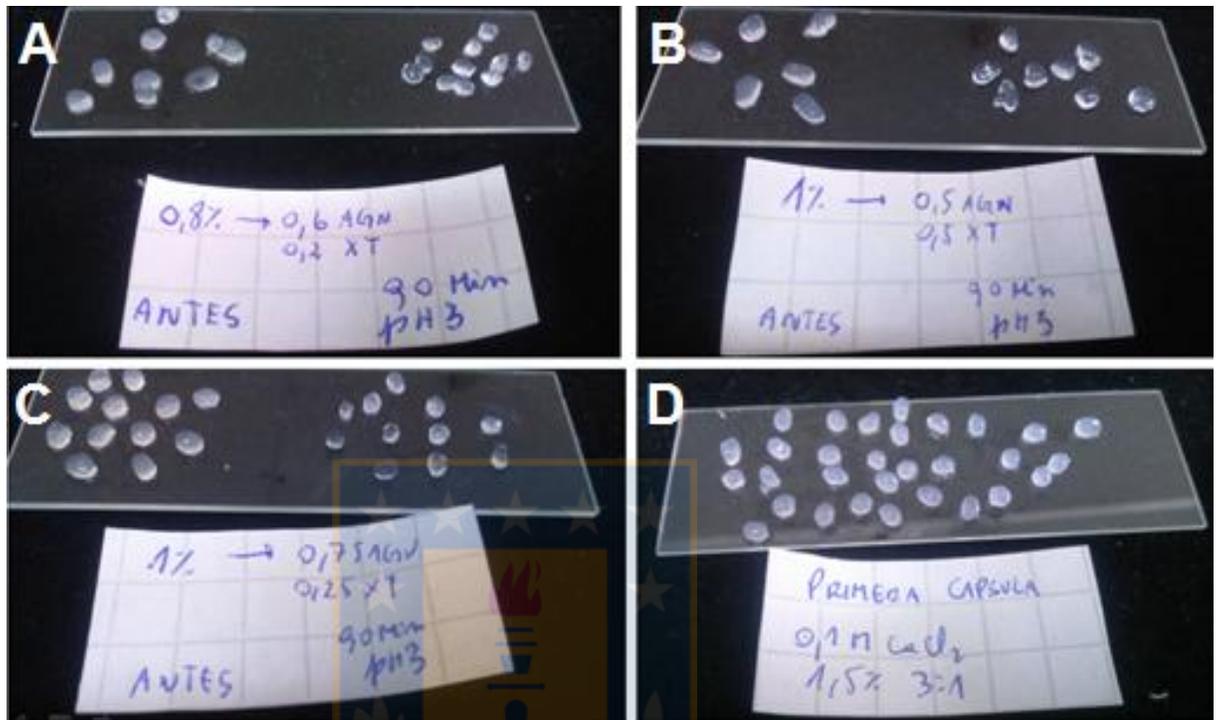


Figura 3.2. Visualización de algunas proporciones de las matrices usadas en la elaboración de las cápsulas en pruebas preliminares para ver concentración óptima utilizada por método de extrusión en jeringa. **A)** 0,8% p/v (0,6 AGN, 0,2 XT), **B)** 1% p/v (0,5 AGN, 0,5 XT), **C)** 1% (0,75 AGN, 0,25 XT), **D)** Cápsula obtenida a la concentración utilizada para el trabajo de estudio, 1,5% (AGN-XT, 3:1). La concentración de CaCl_2 utilizada fue de 0,1 M. (Fuente: Elaboración propia).

Las cápsulas con la proporción escogida elaboradas en el encapsulador (1,5%, AGN-XT, 3:1) para todo el trabajo experimental se aprecian en la Figura 3.3., tanto las cápsulas con aceite como sin aceite, y se observa la reducción de tamaño al ser tratadas a pH 3 por 90 minutos, la cual es aproximadamente entre 0,5-1 mm. Hay que recordar que la optimización fue solamente realizada por las matrices sin bacteria, después de obtener la condición óptima mencionada se procedió a encapsular *L. fermentum* UCO-979C en encapsulador, en donde también se procedió a estandarizar parámetros mencionados en la Tabla 2.1. de la metodología.



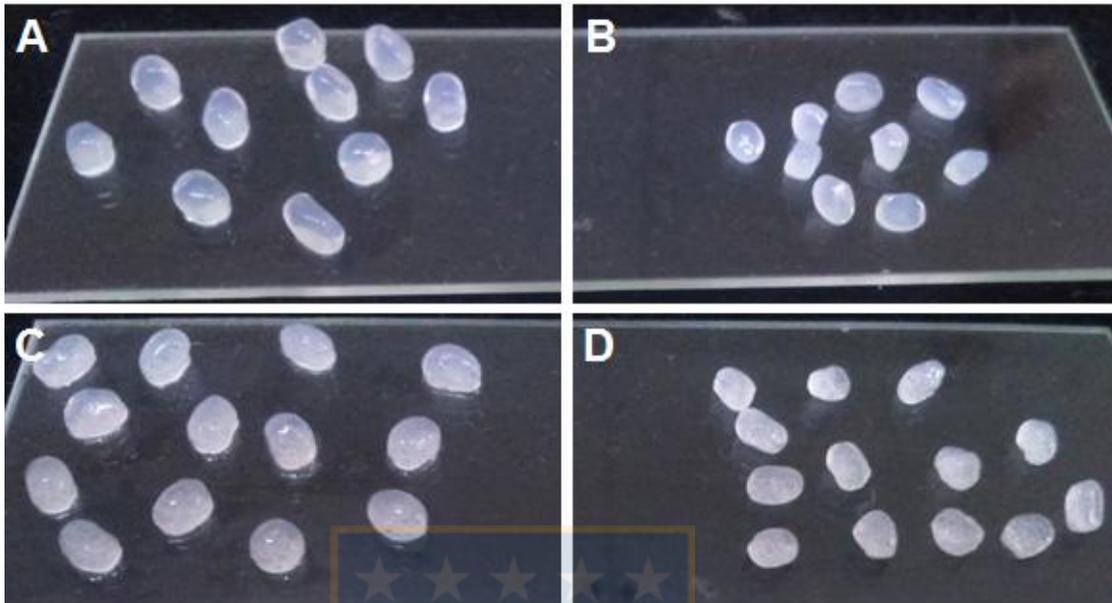


Figura 3.3. Visualización de la reducción de tamaño de cápsulas elaboradas en a una concentración de 1,5%, proporción 3:1 (AGN - XT) en cápsulas con y sin aceite, una concentración de 0,1M CaCl_2 , 10 minutos de reticulación. Método de extrusión en jeringa. **A)** Cápsula sin aceite **B)** Cápsula sin aceite después de 90 minutos a pH 3, **C)** Cápsula con aceite **D)** Cápsula con aceite después de 90 minutos a pH 3. Las cápsulas poseen un tamaño de 5 mm y no presentan bacteria. (Fuente: Elaboración propia).

Posteriormente se elaboraron cápsulas con probióticos en el encapsulador B-395 Buchi con una boquilla de 750 μm , por ello las cápsulas fueron más pequeñas (2-3 mm) en comparación con cápsulas hechas con jeringa. En la Figura 3.4. se puede ver que al ser las cápsulas cultivadas por una noche en caldo MRS cambian de color, de blanco a un color un poco marrón, y se ven

ligeramente más hinchadas comparadas con las planctónicas. Sin embargo, las cápsulas que mas cambian de color son las sin aceite, claramente debido a la afinidad del medio con la cápsula que es hidrofílica.

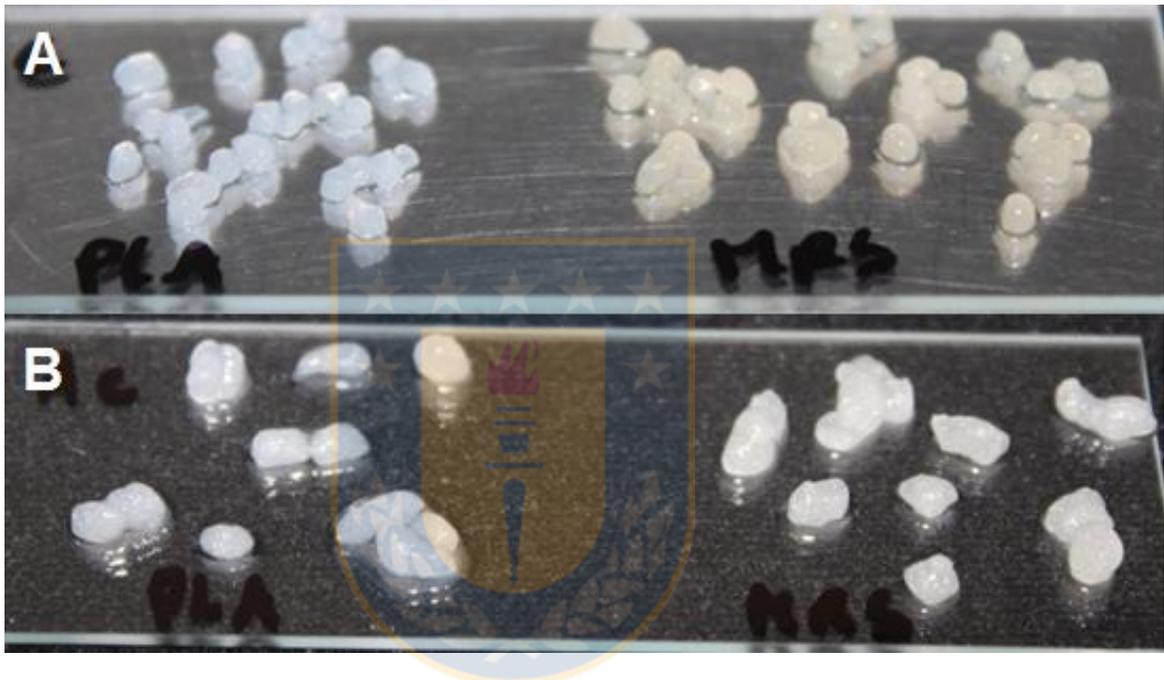


Figura 3.4. A: Cápsulas sin aceite en estado planctónico (Pla) y en estado de biopelícula (MRS) **B:** Cápsulas con aceite en estado planctónico (Pla) y en estado de biopelícula (MRS). (Fuente: Elaboración propia).

3.2. Visualización de la morfología de la cápsula de biopelícula por microscopía óptica y por microscopía electrónica de barrido

La microscopía óptica denotó que las cápsulas son irregulares y tienen un color similar al caldo MRS en el cual fueron embebidos por 12 horas. La cápsula sin aceite posee una forma bastante irregular, similar a un ovalo, y se ven pequeñas microcolonias por microscopía de luz (4 x), que al ser observadas con más aumento denotan la presencia de densidad bacteriana considerable (Figura 3.5.), corroborado por los recuentos efectuados en ensayos posteriores. La cápsula con aceite en aumento 4x no se pudo ver microcolonias, probablemente por la estructura que le otorga el aceite, especies de grumos que pueden ser causados por la repulsión que existe con la matriz que es hidrofílica. Sin embargo en el aumento 100x se aprecia que presenta también conglomerados de bacterias (Figura 3.6.).

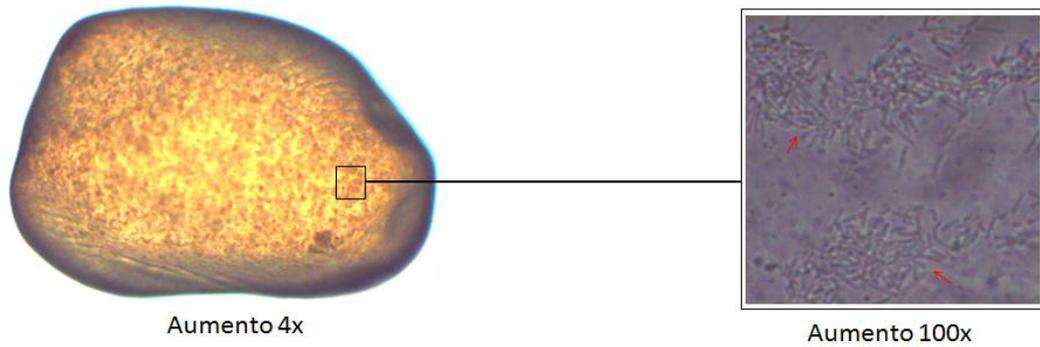


Figura 3.5. Microscopía óptica de la cápsula sin aceite en estado de biopelícula vista a 4x. Además la cápsula se aplastó con un cubreobjeto para ver los conglomerados de bacteria a 100x. (Fuente: Elaboración propia).

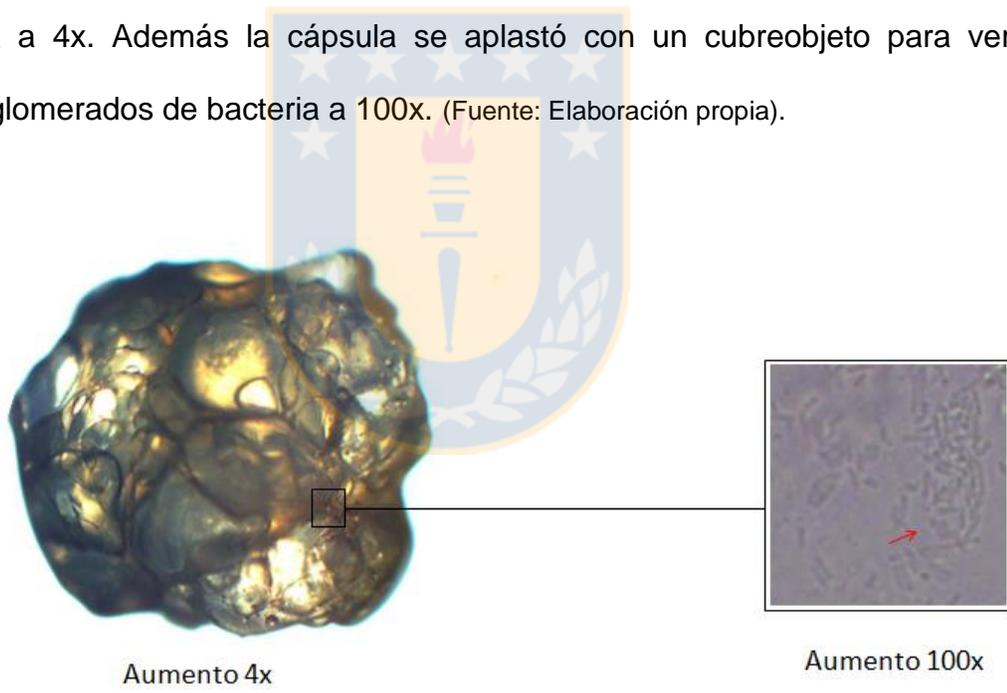


Figura 3.6. Microscopía óptica de la cápsula con aceite en estado de biopelícula vista a 4x. Además la cápsula se aplastó con un cubreobjeto para ver los conglomerados de bacteria a 100x. (Fuente: Elaboración propia).

La microscopía electrónica de barrido mostró que las cápsulas sin aceite en estado planctónico poseían una densidad bacteriana muy baja, ya que no se pudo visualizar bacterias (Figura 3.7.), y en las cápsulas sin aceite en estado de biopelícula (Figura 3.8.) si se pudo ver conglomerados bacteriano rodeados por una masa blanca que se presume que puede ser exopolisacárido, ya que no fue visto en las cápsulas de planctónicas (Figura 3.7.). Además la cápsula de biopelícula se ve más hinchada, comparada con la planctónica, lo que se pudo deber a el incremento bacteriano por haber sido cultivada 12 h en caldo MRS, o simplemente por la retención de líquido debido a la interacción con las moléculas de goma xantana.

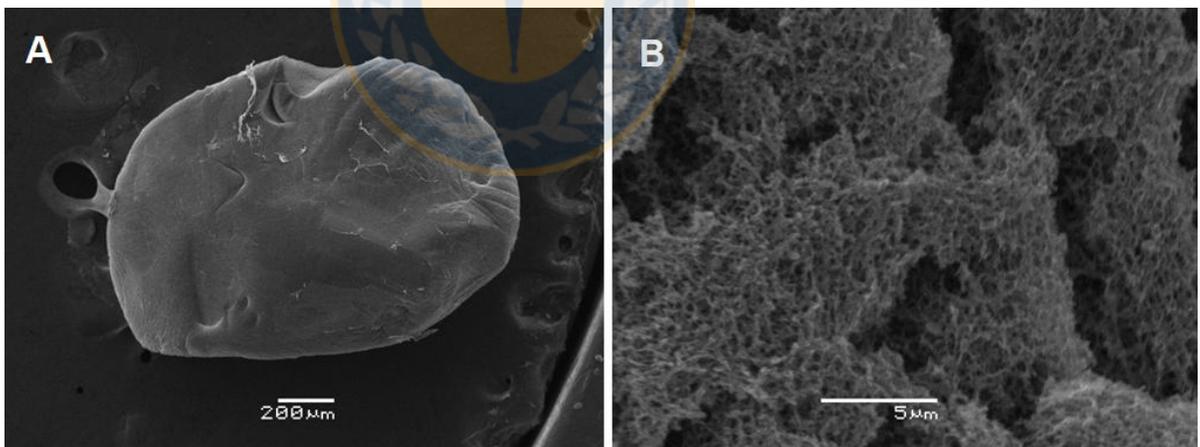


Figura 3.7. Visualización de la cápsula sin aceite que contiene *Lactobacillus fermentum* UCO-979C en matriz alginato/goma xantana en estado planctónico.

A) Superficie de la cápsula **B)** Corte transversal de la cápsula. Aumento 5000X.

(Fuente: Elaboración propia).

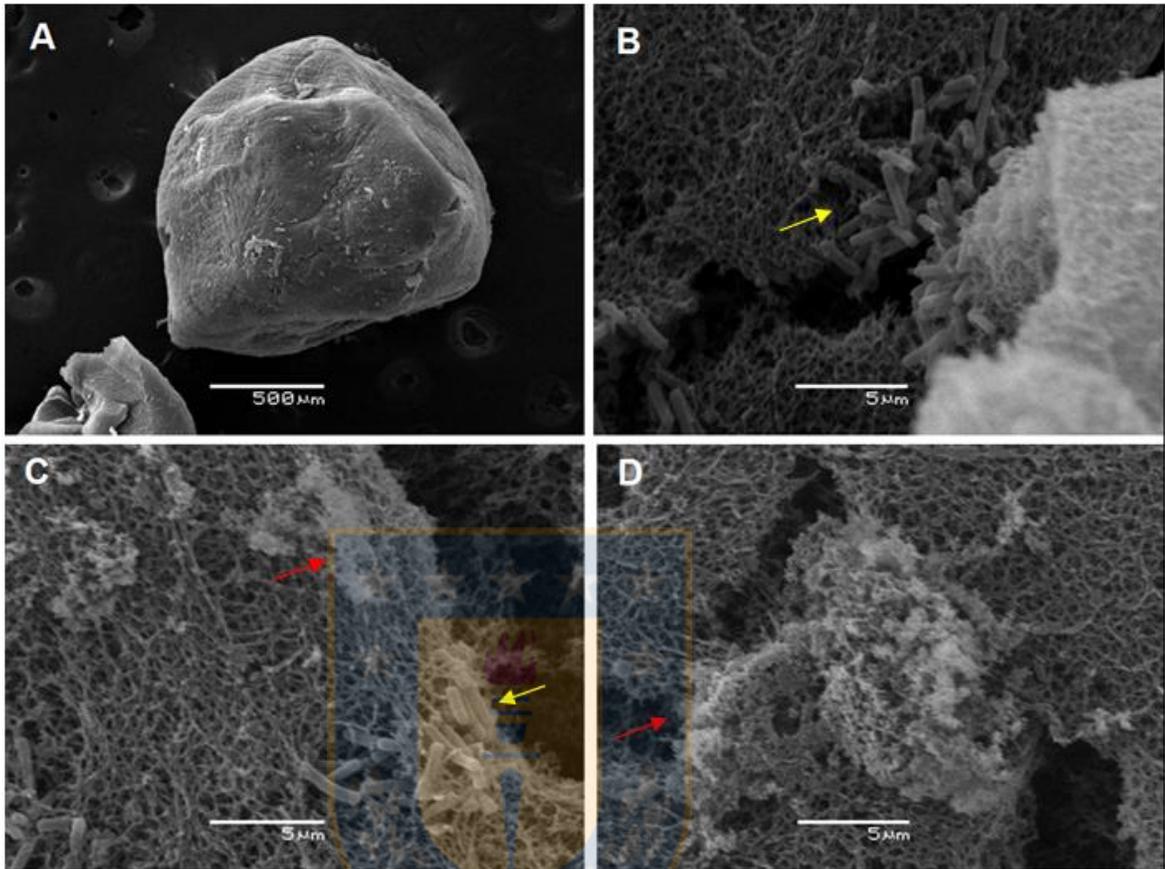


Figura 3.8. Visualización de la cápsula sin aceite que contiene *Lactobacillus fermentum* UCO-979C en matriz alginato/goma xantana en estado de biopelícula **A)** Superficie de la cápsula, **B), C)** y **D)** Corte transversal de la cápsula. Aumento 5000X. Flechas rojas indican la presencia de exopolisacarido, flechas amarillas muestran conglomerados de *Lactobacillus fermentum* UCO-979 que forman biopelícula. La cota blanca corresponde a 500 μm en A y a 5 μm en B, C, y D. (Fuente: Elaboración propia).

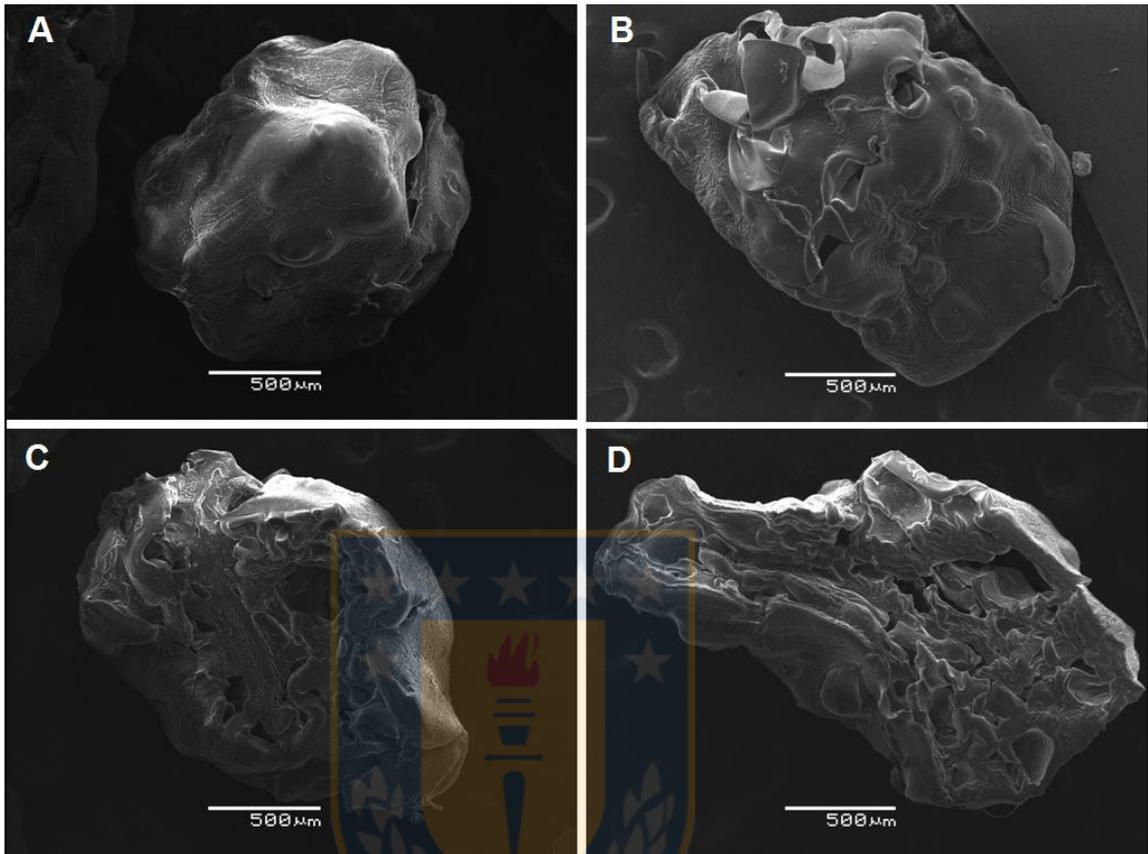


Figura 3.9. Visualización de la cápsula con aceite que contiene *Lactobacillus fermentum* UCO-979C en matriz alginato/goma xantana y 20% de aceite vegetal. **A)** Superficie cápsula planctónica, **B)** Superficie cápsula formando biopelícula **C)** Corte transversal cápsula planctónica, **D)** Corte transversal cápsula formando biopelícula. Aumento 5000X. (Fuente: Elaboración propia).

Las cápsulas con aceite, tanto planctónicas como en estado de biopelícula no pudieron verse las bacterias encapsuladas. Sin embargo recuentos posteriores demostraron que si se presentaba y habían diferencias entre estas cápsulas. En cuanto a su morfología la cápsula planctónica se ve más uniforme que la cápsula de biopelícula (Figura 3.9.). La Figura 3.10. mostró claramente la diferencia presente de la matriz después de ser tratada por 12 h en caldo MRS. Específicamente en un corte transversal, se observó un aspecto más liso y compacto.

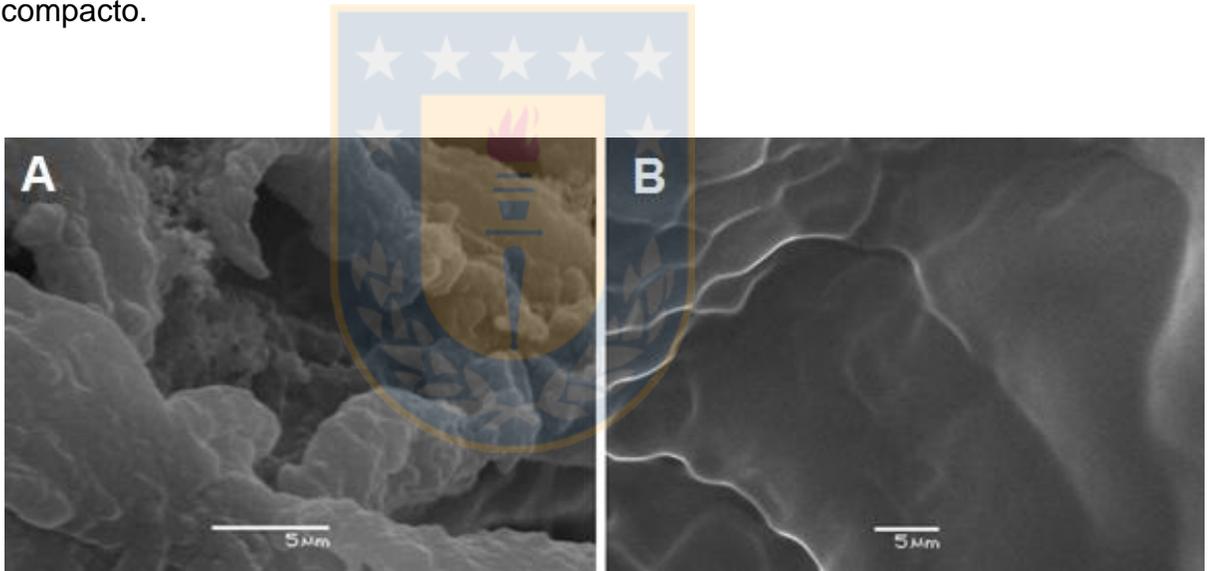


Figura 3.10. Visualización de la cápsula con aceite que contiene *Lactobacillus fermentum* UCO-979C en matriz alginato/goma xantana y 20% de aceite vegetal **A)** Corte transversal cápsula planctónica, **B)** Corte transversal cápsula de biopelícula. Aumento 5000X. La cota blanca corresponde a 5 µm. (Fuente: Elaboración propia).

3.3. Cuantificación de células viables de las cápsulas por recuento en placa en cápsulas planctónicas y de biopelícula, con y sin aceite.

Los recuentos que se pueden ver en la Tabla 3.2. que mostró la diferencia existente entre las cápsulas al ser cultivadas por 12 h en caldo MRS, en donde se observó un aumento aproximado de 2 logaritmos. En cápsulas sin aceite planctónicas incrementó de $2,23 * 10^7$ a $1,26 * 10^9$ (cápsulas de biopelícula sin aceite), y en cápsulas con aceite planctónicas incrementó de $1,77 * 10^7$ a $1,55 * 10^9$ (cápsulas de biopelícula con aceite).

En la Figura 3.11. se observó la diferencia del número de colonias según la dilución utilizada, en las diluciones las cápsulas planctónicas se ubican en el rango de la dilución 10^{-2} , mientras que las cápsulas de biopelícula en un rango de 10^{-4} .

Tabla 3.2. Recuento en placa de las cápsulas antes y después de ser cultivadas en caldo MRS por 12 h. Ensayo realizado por triplicado. (Fuente: Elaboración propia).

	Cápsula planctónica (UFC/g cápsula)	Cápsula estado de biopelícula (UFC/g cápsula)
Sin aceite	Muestra 1: $3,1 * 10^7$ Muestra 2: $1,5 * 10^7$ Muestra 3: $2,1 * 10^7$ Promedio: $2.23 * 10^7$	Muestra 1: $2.0 * 10^9$ Muestra 2: $4.5 * 10^9$ Muestra 3: $3.0 * 10^9$ Promedio: $1.26 * 10^9$ *
Con aceite	Muestra 1: $3,2 * 10^7$ Muestra 2: $1,4 * 10^7$ Muestra 3: $2,2 * 10^7$ Promedio: $1.75 * 10^7$	Muestra 1: $2,6 * 10^9$ Muestra 2: $1,7 * 10^9$ Muestra 3: $1,4 * 10^9$ Promedio: $1.55 * 10^9$ *

El análisis estadístico t de Student realizado demostró que comparando las cápsulas con y sin aceite, tanto para las cápsulas planctónicas y las cápsulas de biopelícula, no se registró diferencias significativas (Tabla 3.3.). En cambio al

comparar las cápsulas planctónica con las de biopelícula, tanto con y sin aceite, se vio una diferencia significativa, considerando un intervalo de confianza del 95%. (Tabla 3.4.)

Tabla 3.3. Análisis t- Student del recuento en placa, comparando cápsulas con y sin aceite, ya sea para cápsulas planctónicas como cápsulas de biopelícula. (Fuente: Elaboración Dra. Katia Sáez, Departamento de estadística, Universidad de Concepción).

	sin aceite		con aceite		p-valor
	Media	D.E.	Media	D.E.	
biofilm	3.17E+09	1.26E+09	1.90E+09	6.24E+08	0.1934
planctónica	2.23E+07	8.08E+06	2.27E+07	9.02E+06	0.9643

Tabla 3.4. Análisis t- Student del recuento en placa, comparando cápsulas planctónicas y con biopelícula, ya sea para cápsulas con y sin aceite. * Son estadísticamente significativas $P < 0,05$. (Fuente: Elaboración Dra. Katia Sáez, Departamento de estadística, Universidad de Concepción).

	biofilm		planctónica		p-valor
	Media	D.E.	Media	D.E.	
sin aceite	3.17E+09	1.26E+09	2.23E+07	8.08E+06	0.0495 *
con aceite	1.90E+09	6.24E+08	2.27E+07	9.02E+06	0.0350 *

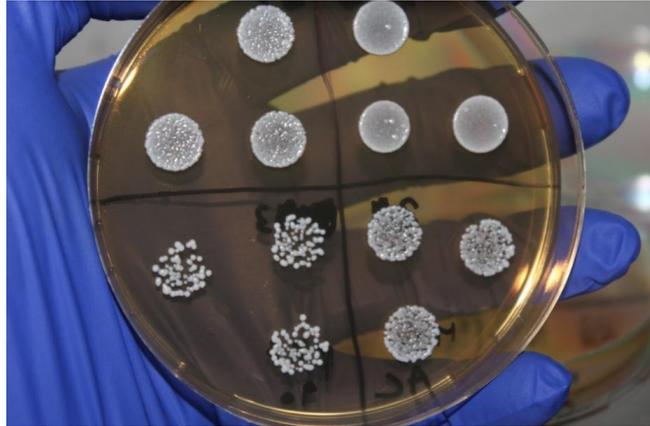


Figura 3.11. Imagen del recuento en placa efectuado en las cápsulas elaboradas, específicamente en cápsula de biopelícula sin aceite. (Fuente: Elaboración propia).

3.4. Liberación de *Lactobacillus fermentum* UCO-979C desde las cápsulas expuestas a pH 3

La Figura 3.12. mostró la liberación de las cápsulas que se presentó solamente en las cápsulas de biopelícula, además tratamientos efectuados solo en agua mostró una liberación pobre y nula, y solo presentada en cápsulas con aceite desde los 45 minutos, conservando la integridad de la cápsula. Por lo que el efecto de la erosión de las cápsulas y liberación de bacterias probióticas es debido a la exposición a pH 3 y no al estrés mecánico acuoso (Figura 3.13.). La liberación es continua en el caso de las cápsulas sin aceite, mientras que en las cápsulas con aceite aumenta en mayor medida a los 90 minutos.

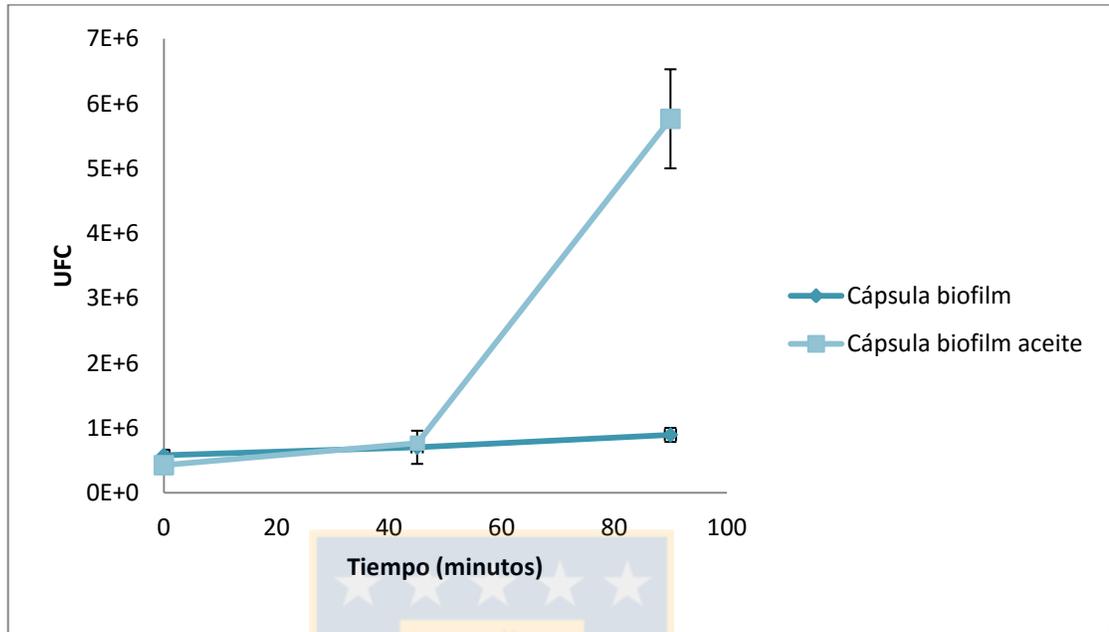


Figura 3.12. Liberación de las cápsulas de biopelícula en el tiempo. Cápsulas fueron tratadas con 10 ml de una solución ácida a pH 3, y se tomó muestras en tiempo 0, 45 y 90 min. (Fuente: Elaboración propia).

El análisis estadístico realizado demostró que a los 90 minutos las cápsulas con biopelícula con aceite poseían una mayor liberación, corroborado al ser estadísticamente significativo según el intervalo de confianza del 95%, con un test t de Student (Tabla 3.5).

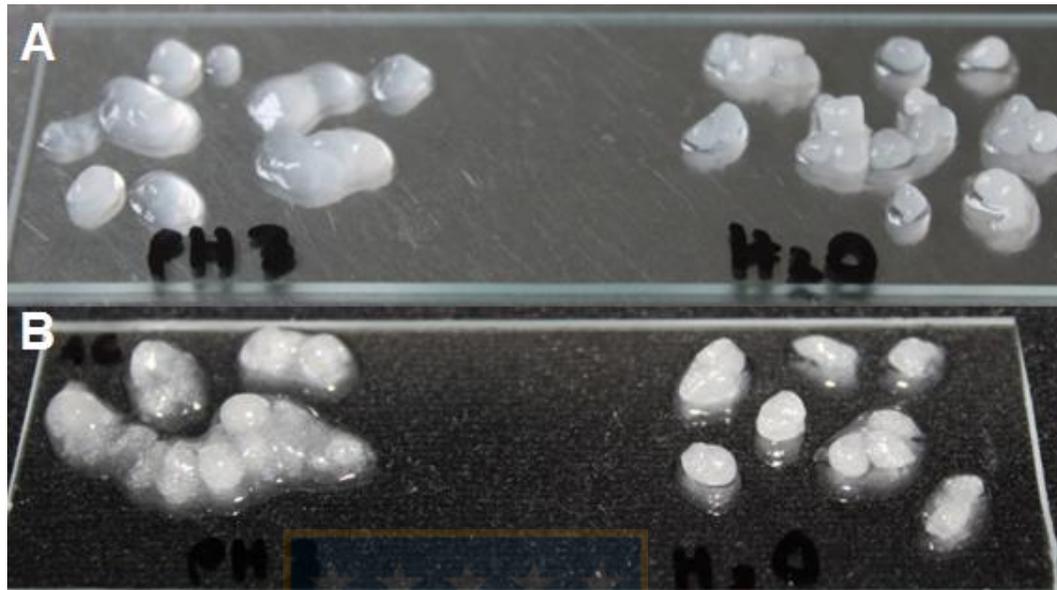


Figura 3.13. Efecto de erosión y debilitamiento de la cápsula producido al tratar por 90 minutos a pH 3 las cápsulas, en agua no se observó mayor erosión **A:** Cápsulas sin aceite, **B:** Cápsulas con aceite. (Fuente: Elaboración propia).

Tabla 3.5. Análisis t- Student de la liberación de bacterias probióticas a pH 3

** Son estadísticamente significativas $P < 0,01$. (Fuente: Elaboración Dra. Katia Sáez, Departamento de estadística, Universidad de Concepción).

Tiempo	sin aceite		con aceite		p-valor
	Media	D.E.	Media	D.E.	
0 min	579000.0	86156.8	426666.7	89628.9	0.1011
45 min	702333.3	255590.2	766666.7	75718.8	0.6974
90 min	893333.3	107857.9	5766666.7	763762.6	0.0082 **

3.5. Ensayo de difusión en agar de las bacterias contenidas en las cápsulas, y de bacterias liberadas a pH 3

Los ensayos de difusión en agar mostraron que se conservó la actividad inhibitoria contra *H. pylori*, el primer ensayo se realizó con la cepa UCO-979 sin encapsular (Figura 3.14.) y como se indicó en la metodología, observándose los datos obtenidos en la Tabla 3.6. Además en esta tabla se registran los resultados en mm de los ensayos efectuados a las bacterias recuperadas de las cápsulas de biopelícula y las bacterias recuperadas desde la solución que estaba a pH 3, específicamente la liberación presentada a los 90 minutos de tratamiento con esta solución. Se ve que la tendencia es una inhibición de 2 mm en la mayoría de los casos y se conserva después de encapsular la bacteria y liberarla a pH ácido.

Según Gaudana et al. (2010), la cepa utilizada se define como cepa con ligera inhibición, correspondiente a halos aproximados de 2 mm (Tabla 3.6.).

Tabla 3.6. Datos en mm de el ensayo de difusión en agar columbia- sangre de *Lactobacillus fermentum* UCO-979C contra *H. pylori* antes y después de encapsular (y cultivar por 12 h en caldo MRS), y después de ser liberada por exposición a pH 3. **N.I.**= No inhibe. (Fuente: Elaboración propia).

UCO-979C	Pellet	Suero Fisiológico	MRS s/c sin bacteria	MRS s/c con bacteria	Sobrenandante
Sin encapsular	N.I.	N.I.	2,5 mm	4,5 mm	4,5 mm
			3,0 mm	5,0 mm	5,0 mm
			3,0 mm	6,0 mm	5,0 mm
			$\bar{x} = 2,8$	$\bar{x} = 5,1$	$\bar{x} = 4,8$
Encapsulada sin aceite	N.I.	N.I.	3,0 mm	5,5 mm	5,0 mm
			3,0 mm	5,0 mm	5,0 mm
			3,0 mm	5,0 mm	5,0 mm
			$\bar{x} = 3,0$	$\bar{x} = 5,2$	$\bar{x} = 5,0$
Encapsulada con aceite	N.I.	N.I.	3,0 mm	5,0 mm	5,0 mm
			3,0 mm	5,0 mm	5,0 mm
			2,5 mm	5,0 mm	4,5 mm
			$\bar{x} = 2,8$	$\bar{x} = 5,0$	$\bar{x} = 4,8$
Liberada a pH 3 cápsula sin aceite	N.I.	N.I.	3,0 mm	5,0 mm	5,0 mm
			3,0 mm	5,0 mm	5,0 mm
			3,5 mm	6,0 mm	6,0 mm
			$\bar{x} = 3,2$	$\bar{x} = 5,3$	$\bar{x} = 5,3$
Liberada a pH 3 cápsula con aceite	N.I.	N.I.	3,0 mm	5,0 mm	5,5 mm
			3,0 mm	5,5 mm	5,5 mm
			3,0 mm	5,5 mm	5,0 mm
			$\bar{x} = 3,0$	$\bar{x} = 5,3$	$\bar{x} = 5,0$

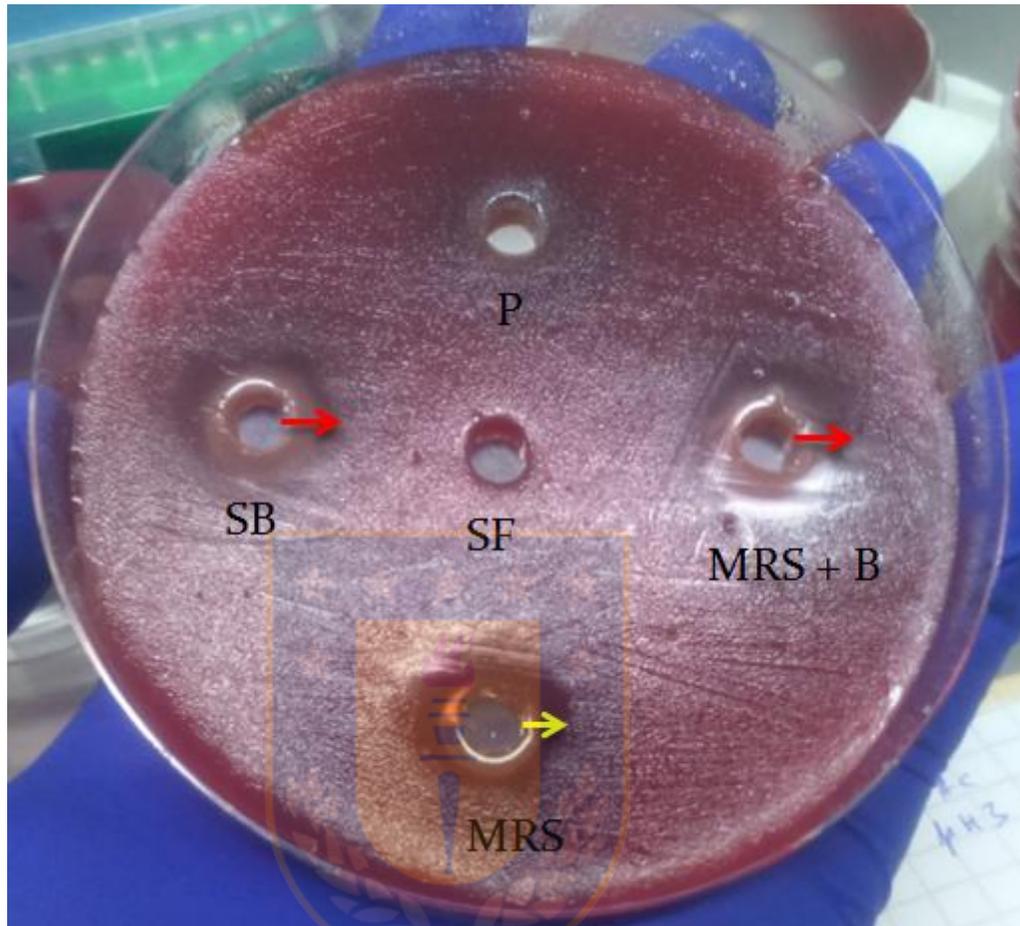


Figura 3.14. Ensayo de difusión en agar columbia- sangre de *Lactobacillus fermentum* UCO-979C contra *H. pylori* antes de encapsular la bacteria. **SB:** Sobrenadante bacteriano, **SF:** Suero fisiológico **P:** Pellet, **MRS:** Caldo MRS sin citrato **MRS+B:** MRS sin citrato mas bacteria. Flecha roja indica 5mm, flecha amarilla 3 mm. (Fuente: Elaboración propia).

3.6. Ensayo de recuento en placa cada 15 días, durante 60 días

Los resultados del recuento en placa se pueden ver en los Figuras 3.16. y 3.17., los cuales se hicieron a dos temperaturas diferentes, 25°C y 4°C, respectivamente, además se observa que a pesar de pasar 60 días las cápsulas con aceite aún no pierden su capacidad de flotar en suero fisiológico, tanto las cápsulas almacenadas a 25°C como las almacenadas a 4°C (Figura 3.15.). Cuando las cápsulas fueron almacenadas 25 °C, es decir, a temperatura ambiente, se observó que las cápsulas planctónicas dejan de presentar bacterias viables crecidas en placa MRS a los 30 días. En cambio las cápsulas con biopelícula, tanto con o sin aceite, presentaron bacterias viables aún a los 60 días en el que las cápsulas fueron mantenidas en suero fisiológico, además las cápsulas con aceite que poseen biopelícula tuvieron la peculiaridad de conservar su recuento hasta los 15 días, sin embargo, después de los 30 días la disminución fue mayor que en las cápsulas sin aceite que presentaban biopelícula (Figura 3.16.; Anexo A).

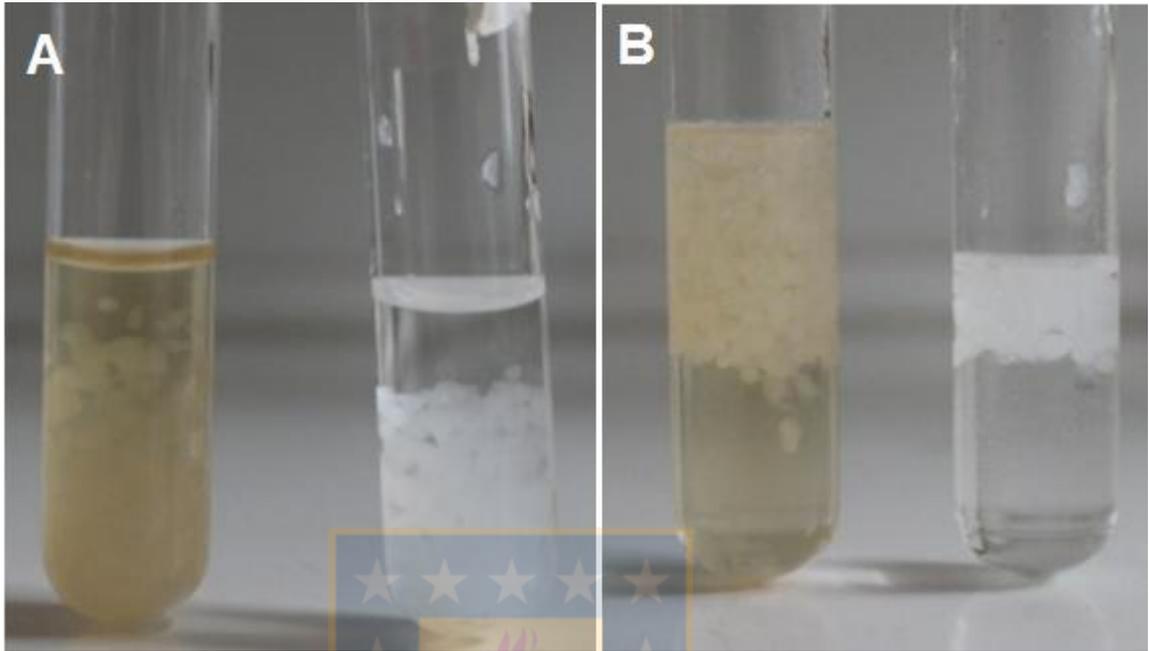


Figura 3.15. Cápsulas con *L. fermentum* UCO-979C almacenadas a 4°C durante 60 días. **A:** Cápsulas sin aceite. Cápsula blanca es planctónica, cápsula marrón es en estado de biopelícula **B:** Cápsulas con aceite. Cápsula blanca es planctónica, cápsula marrón es en estado de biopelícula. (Fuente: Elaboración propia).

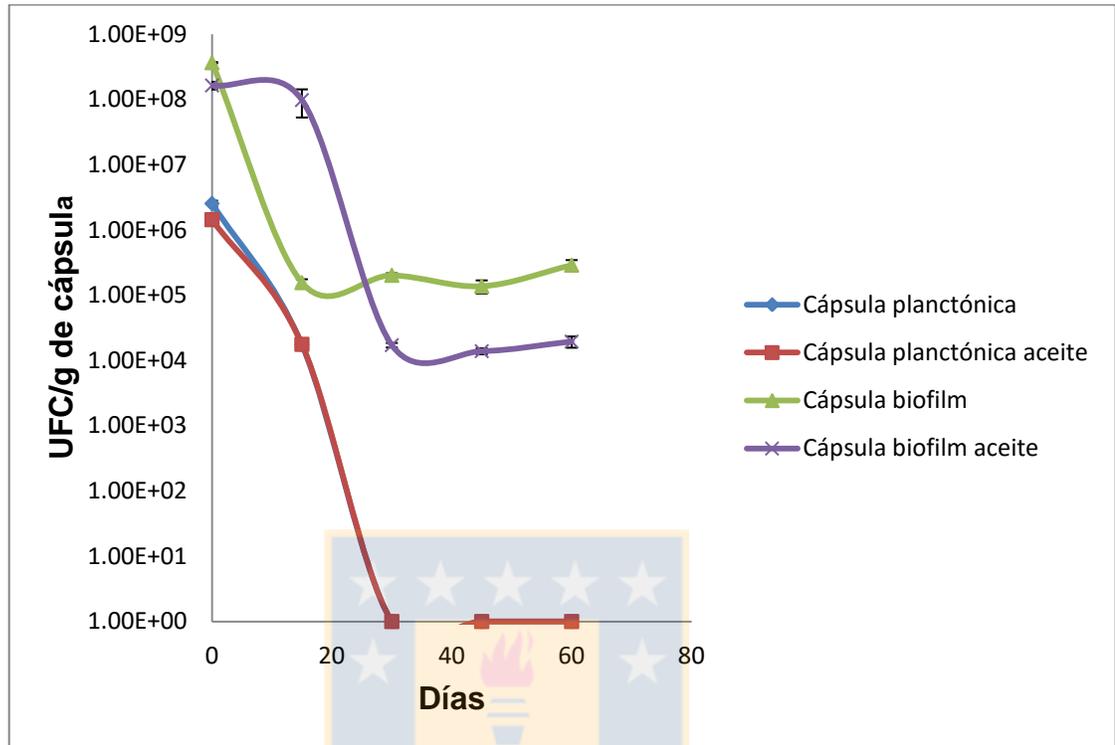


Figura 3.16. Recuento en placa de las cápsulas a 25°C cada 15 días.

(Fuente: Elaboración propia).

Las cápsulas sin aceite con biopelícula almacenadas en suero fisiológico a 4°C presentan un ligero aumento a los 15 días, al igual que las cápsulas planctónicas, que se puede deber a que continúan en crecimiento aún en estas condiciones (Figura 3.17.; Anexo A).

Las cápsulas almacenadas en suero fisiológico a 4°C se observó que la viabilidad es mayor que las cápsulas almacenadas a temperatura ambiente, ya que a 25°C las cápsulas con biopelícula a los 60 días tienen 10^4 - 10^5 UFC/g de cápsula y las cápsulas planctónicas no poseen recuento después de 30 días.

Por otro lado las cápsulas a 4°C que contienen biopelícula están en el orden de 10^7 (UFC/g de cápsula) después de 60 días almacenados en suero fisiológico, y las cápsulas planctónicas poseen 10^5 (UFC/g de cápsula) después de 60 días.

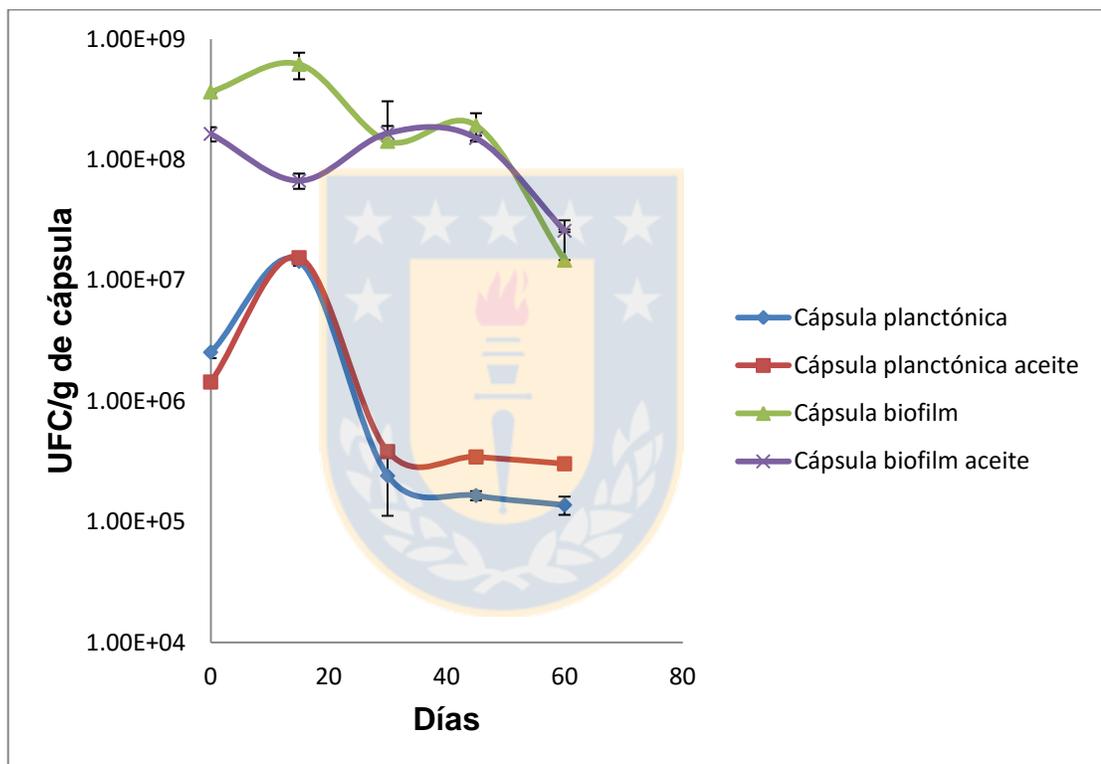


Figura 3.17. Recuento en placa de las cápsulas a 4°C cada 15 días.

(Fuente: Elaboración propia).

3.7. Cuantificación de exopolisacáridos

La medición de azúcares se realizó primero a la cápsula sin bacteria y después a la cápsula con bacteria, primero se extraen los azúcares totales desde la cápsula, y después se realizó el método fenol-ácido. Para los cálculos se obtuvo la ecuación de la recta de la curva de calibración de dextrano observada en el Figura 3.18.

La cuantificación se expresó en mg de EPS/ g cápsula. El exopolisacárido correspondía a la diferencia de azúcares totales presentada en la cápsula con y sin bacteria en cada caso: 1) cápsula sin aceite y bacteria planctónica, 2) cápsula con aceite y bacteria planctónica, 3) cápsula sin aceite y bacteria en estado de biopelícula, 4) cápsula con aceite y bacteria en estado de biopelícula. Cuando en las Figuras se menciona MRS, se refiere a que se cultivó por 12 h en MRS la cápsula planctónica.

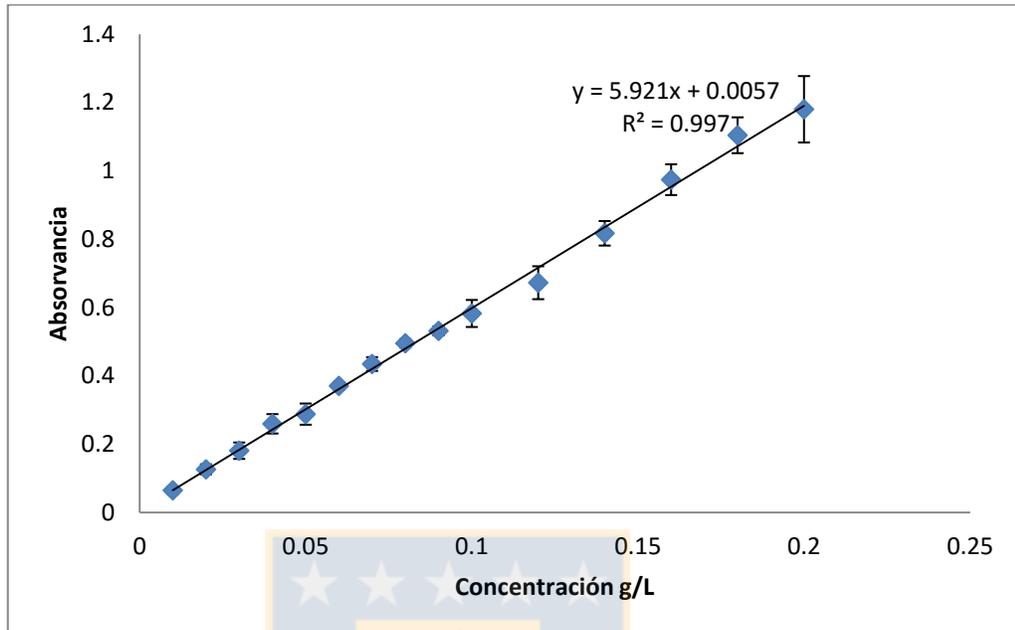


Figura 3.18. Curva de calibración de dextrano (Anexo B).

(Fuente: Elaboración propia)

Los resultados muestran que en el caso del sobrenadante, en general se obtuvo menos concentraciones de exopolisacárido que en el pellet, ya que cuando es tratada en MRS está en el orden de 0,9 mg EPS/ g cápsula en el sobrenadante y en el pellet en el orden de 4,0 mg EPS/ g cápsula. En el sobrenadante de las cápsulas sin aceite se observó un aumento en la concentración de exopolisacárido de 0,32 mg EPS/ g cápsula y en las cápsulas con aceite el aumento fue de 0,18 mg EPS/ g cápsula, comparando cápsulas planctónicas con cápsulas cultivadas en MRS por 12 h (biopelícula) (Figura 3.19.). En el caso del exopolisacárido contenido en el pellet de cápsulas sin aceite se registró un aumento de 0,3 mg EPS/ g cápsula y en las cápsulas con aceite se observó una

disminución de 0,3 mg EPS/ g cápsula, comparando cápsulas planctónicas con cápsulas cultivadas en MRS (biopelícula) (Figura 3.20.). Esta disminución sería incongruente con los datos obtenidos en el recuento en placa, ya que el aumento de la cantidad de bacterias al ser cultivada la cápsula de aceite en MRS daba indicio de formación de biopelícula y por ende exopolisacárido, posibles explicaciones se analizan en la discusión. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

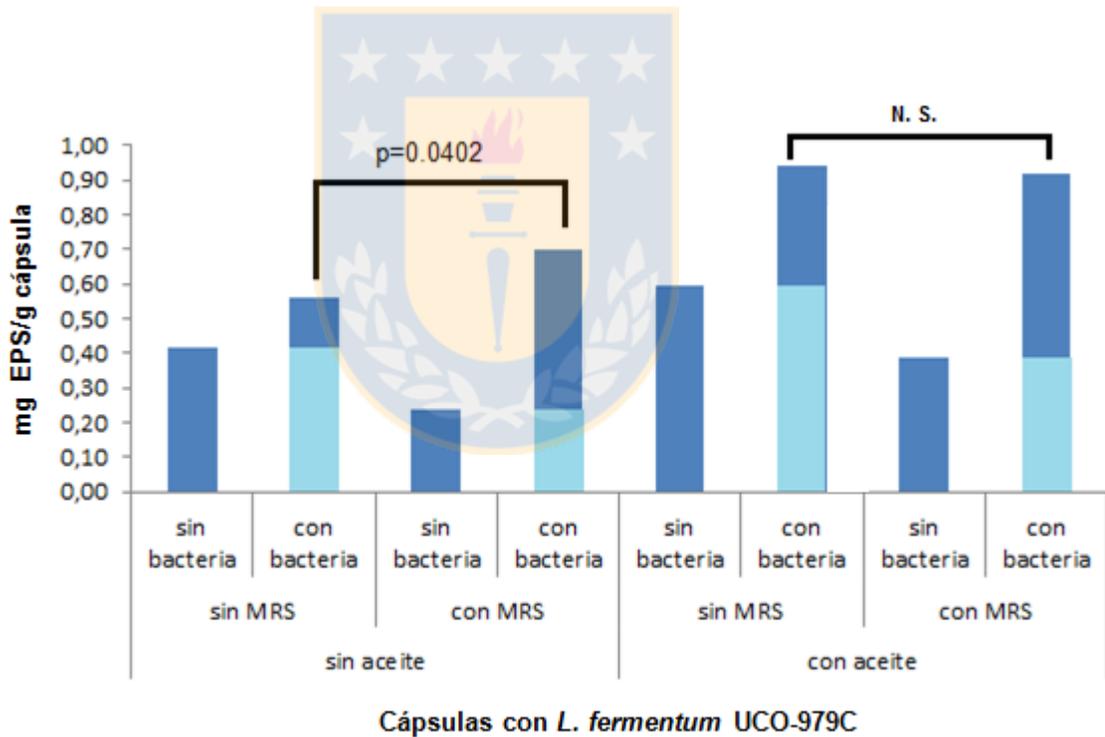


Figura 3.19. Cuantificación de azúcares totales con y sin bacteria en el sobrenadante de la extracción. La resta representa el exopolisacárido contenidos en cada sección. N.S.: No estadísticamente significativo, $p < 0,05$: Estadísticamente significativo (Anexo C). (Fuente: Elaboración propia)

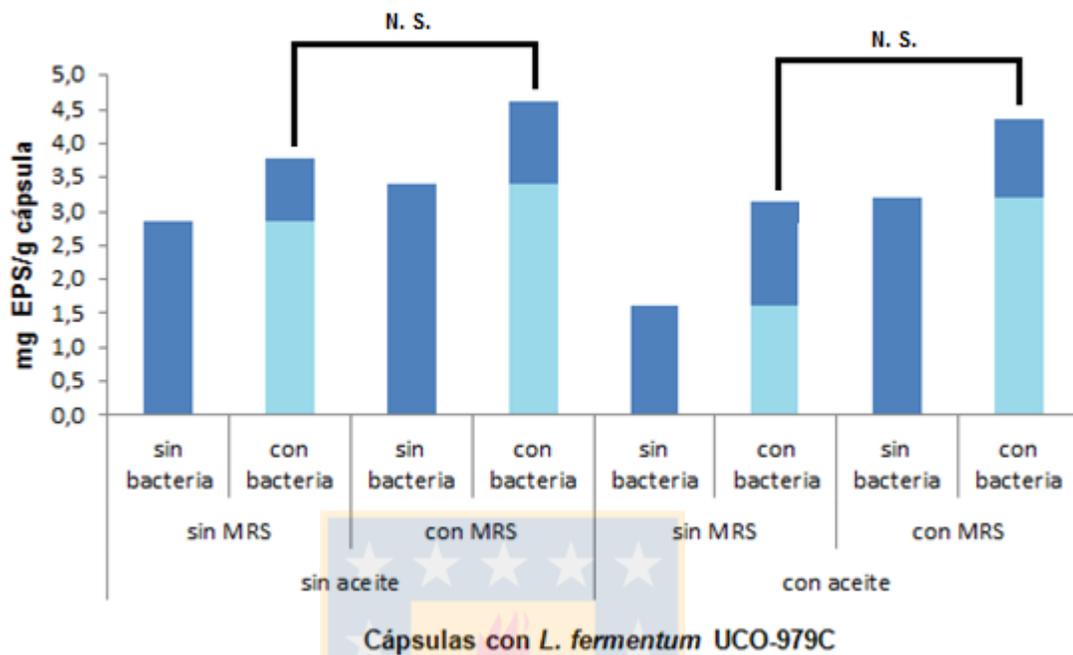


Figura 3.20. Cuantificación de azúcares totales con y sin bacteria en el pellet de la extracción. La resta representa el exopolisacárido contenidos en cada sección. N.S.: No estadísticamente significativo (Anexo C).

(Fuente: Elaboración propia)

Para el análisis estadístico con la finalidad de comparar los promedios de las respuestas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, Medio (sin y con caldo MRS sin citrato), Aceite (sin y con) y Bacteria (sin y con). Posterior a ello al análisis se realizaron contrastes con la finalidad de comparar los aumentos, con y sin bacteria, con y sin medio MRS, tanto para el experimento con aceite como para el experimento sin aceite. Se evidenció el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas a través de los

test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Un nivel de significación del $\alpha=0,05$ fue utilizado, esto es cada vez que el valor p fue menor o igual que 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Ello se vio reflejado en solamente en el caso del exopolisacárido del sobrenadante como se indica en la Figura 3.19, posibles explicaciones se discuten más adelante



4. DISCUSIÓN

Los resultados de la optimización de la matriz de alginato (AGN) y goma xantana (XT), permitieron concluir que se necesitaba mínimo 0,1 M de concentración de CaCl_2 para que se forme una cápsula relativamente rígida, y concuerda con estudios hechos anteriormente en cápsulas con la misma mezcla de matriz; sin embargo en ese estudio de Cheow *et al.* 2014 se utilizó una concentración de 2% p/v proporción 3:1 AGN - XT, además de un tiempo de 30 minutos de endurecimiento en la solución solo cápsulas sin aceite.

En este trabajo se demostró que se pudo reducir un poco la concentración a 1,5 % p/v proporción 3:1 (AGN - XT) y 10 minutos de endurecimiento en la solución, sin perder la forma de la cápsula. Sin embargo, los objetivos de ambos trabajos eran distintos, ya que este trabajo buscó la liberación de probióticos a nivel gástrico, y el estudio mencionado buscaba la liberación a nivel intestinal, por ello recubrían adicionalmente con quitosano.

La formación de una cápsula estable se debe principalmente a la relación de calcio y alginato que hay en la solución para que formen la gelificación iónica (Heng *et al.*, 2003), por lo que a veces se formaban las cápsulas y a veces no, según los parámetros utilizados (Tabla 3.1.), además que variaba la formación

según el método utilizado, si era con jeringa o con encapsulador, principalmente debido a parámetros como el diámetro de la boquilla, velocidad de flujo, altura de caída de la gora, volumen de CaCl_2 y recipiente utilizado, entre otros (Burgain *et al.* 2011). Las cápsulas que se observaron en la etapa de optimización en la Figura 3.1. que poseían mayor cantidad de goma xantana tomaban una forma más alargada y eran más viscosas, debido a la naturaleza de esta goma, por el contrario mientras mayor cantidad de alginato se utilizaba se formaba una cápsula más dura, debido a que se formaba un reticulado iónico más fuerte (Heng *et al.*, 2003). La Figura 3.2. además muestra la reducción de tamaño al ser tratadas a pH ácido por 90 minutos, tanto en cápsulas con aceite como sin aceite, lo que corrobora con bibliografía con respecto a la conduce a la interrupción de la atracción electrostática de Ca^{++} y COO^- del reticulado iónico, provocando cierta erosión de la cápsula (Bajpai *et al.* 2006).

En definitiva este trabajo utilizó en el encapsulador B-395 Buchi una matriz 1,5 % proporción 3:1 (AGN - XT) y 10 minutos de endurecimiento en la solución. La Figura 3.3. mostró que las cápsulas al ser cultivadas por una noche en caldo MRS cambian de color, de blanco a un color levemente marrón, color similar al medio en el cual son embebidas, además se ven ligeramente más hinchadas comparadas con las planctónicas presumiblemente por la naturaleza de la goma xantana, que es capaz de retener agua (Darwiche *et al.*, 2003). Las

cápsulas que más cambian de color son las sin aceite, principalmente por un tema de afinidad hidrofílica.

La microscopía óptica denotó que las cápsulas son irregulares y tienen un color marrón descrito anteriormente, la cápsula sin aceite de biopelícula presentaron una forma irregular, ovalada y pequeñas microcolonias (Figura 3.4.). En la cápsula con aceite en aumento 4x no se pudo visualizar microcolonias debido a la interferencia que puede causar la estructura que le otorga el aceite, que se ven como protuberancias por la repulsión de afinidad que existe con la matriz que es hidrofílica y el aceite usado; sin embargo, en el aumento 100x se aprecia que presenta también microcolonias, comprobando que la cápsula de biopelícula posee bacterias en su interior (Figura 3.5.).

La microscopía electrónica de barrido mostró que para las cápsulas sin aceite en estado planctónico poseía una superficie lisa, y una densidad bacteriana baja, ya que no se visualizaron bacterias (Figura 3.7.). Esto sugiere que presentan menor cantidad de bacterias con respecto a las cápsulas de biopelícula, en estas últimas si se visualizaron conglomerados bacterianos. En las cápsulas sin aceite en estado de biopelícula (Figura 3.8.) se vio microcolonias rodeadas por una masa blanca que se presume que fue exopolisacarido, ya que no fue visto en las cápsulas de bacterias planctónicas (Figura 3.7.) y se encuentra alrededor de las microcolonias. Cabe destacar que

en las cápsulas AGN-XT de biopelícula realizadas por Cheow *et al.*, 2014 se podían ver bacterias en la superficie, ellos usaron un Buchi Spray Dryer B-290. Por ello las cápsulas estaban más deshidratadas que las cápsulas realizadas en este trabajo, basado en gelificación externa B-395 Buchi. Además, la cápsula de biopelícula se ve más hinchada, comparada con la planctónica, lo que se puede deber al incremento bacteriano por haber sido cultivada 12 h en caldo MRS, o simplemente por la retención de líquido debido a la interacción con las moléculas de XT, las altas afinidades de XT para las moléculas de agua (Torres *et al.*, 2012) aumentan la hinchazón de las cápsulas (Darwiche *et al.*, 2003).

En las cápsulas con aceite, tanto planctónicas como en estado de biopelícula no pudieron verse las bacterias encapsuladas; sin embargo, los recuentos obtenidos demostraron que las cápsulas de biopelícula poseían mayor densidad bacteriana que las planctónicas. En cuanto a su morfología la cápsula planctónica se ve más uniforme que la cápsula de biopelícula, lo que se puede deber que al ser cultivadas por una noche en caldo MRS las interacciones hidrofílicas-hidrofóbicas afectaron un poco su superficie, reventando ciertas protuberancias presentes en la cápsula (Figura 3.9.). La Figura 3.10. mostró claramente la diferencia presente de la matriz después de ser tratada por 12 h en caldo MRS, específicamente en un corte transversal se observó un aspecto

más liso y compacto, que también puede ser atribuible a las interacciones hidrofílicas-hidrofóbicas.

Hay que tener en cuenta que SEM proporciona alta resolución, alta profundidad de campo y una amplia gama de ampliaciones operacionales para estudios de biopelícula (Wu *et al.*, 2014) o cápsulas (Cheow *et al.*, 2014). Sin embargo, la deshidratación de las etapas incluidas en el procesamiento (acetona) puede inducir distorsiones que perjudiquen la detección de estructuras en materiales biológicos (El Abed *et al.*, 2012), o en sí afectar la lectura en estas matrices de polisacáridos.

En cuanto a la cuantificación de células viables de las cápsulas por recuento en placa en cápsulas planctónicas y de biopelícula, con y sin aceite, la Tabla 3.2. mostró la diferencia existente entre las cápsulas al ser cultivadas por 12 h en caldo MRS, registrándose un aumento aproximado de 2 logaritmos, cuyo aumento es avalado en cápsulas de biopelícula de *L. rhamnosus* cuyo aumento no fue cuantificado, pero si informado (Cheow *et al.*, 2014). El análisis estadístico t de Student (Tabla 3.3.) realizado demostró que comparando las cápsulas con y sin aceite, en cápsulas planctónicas y de biopelícula, no se registró diferencias significativas, lo que da a entender que si se usa aceite o no en la cápsulas, el crecimiento es similar, por ello el uso de aceite es propicio y no afecta la viabilidad de las bacterias, lo que ha sido avalado por otros

estudios (Eratte *et al.* 2015). En cambio, al comparar los recuentos de las cápsulas planctónica con las de biopelícula, se visualizó diferencias significativas en su densidad bacteriana, indicando el aumento por parte de las cápsulas de biopelícula (2 logaritmos) con respecto a las cápsulas planctónicas, considerando un intervalo de confianza del 95% (Tabla 3.4.). Se corrobora con estudios realizados en cápsulas de biopelícula en la misma matriz, en donde se encapsuló *L. rhamnosus* (Cheow *et al.*, 2014), ellos documentan un aumento del recuento al ser cultivadas en caldo MRS por una noche, pero llegan a 7,7 log (UFC / mg) las cápsulas de biofilm, en este trabajo están en el orden de 9,0 log (UFC / g), sin embargo, hay que recordar que se usaron distintos métodos de encapsulación y tamaños de cápsulas diferentes.

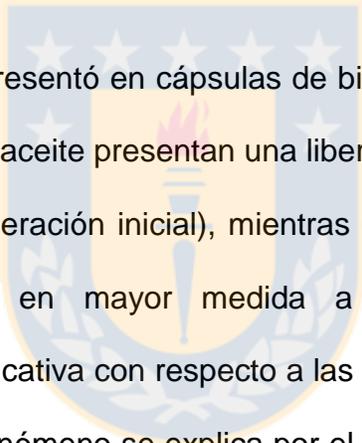
Hay que mencionar que actualmente no se registra información de cápsulas de biofilm con aceite, con la idea innovadora de usar aceite para aumentar el tiempo de residencia en el estómago, y con ello aumentar la liberación de las cápsulas, ya sea por los movimientos peristálticos de las paredes gástricas, por la adhesión más fácil de las cápsulas al estar flotando por la capacidad del alginato de ser mucoadhesivo (Sosnik, 2014), o sino también por el contacto de mayor tiempo con el jugo gástrico, ya que el alginato puede sufrir hidrólisis catalizada por el ácido, siendo neutralizado, lo que conduce a la interrupción de la atracción electrostática de Ca^{++} y COO^- (Bajpai *et al.*, 2006) y reduciendo su peso molecular (Gombotz y Wee, 1998). Sin embargo, existe un estudio

relacionado con bacterias planctónicas encapsuladas (*L. casei*) en goma arábica, más proteína de suero y aceite rico omega 3 pero con el fin de potenciar actividades (Eratte *et al.*, 2015), dando como resultado la mejora de la viabilidad de las bacterias por las propiedades de estabilidad oxidativa del aceite de atún.

La Figura 3.12. mostró la liberación de bacterias desde las cápsulas de biofilm, liberación que estuvo ausente en cápsulas planctónicas, fenómeno atribuible a la menor densidad bacteriana que estas cápsulas poseían, lo que puede ser ratificado al no haber visualizado bacterias por SEM en cápsulas planctónicas y al poseer recuentos menores que las cápsulas de biofilm. La erosión con ácido permitió que se liberara una pequeña cantidad de bacterias desde las cápsulas, que es aproximadamente el 1% de lo contenido en las cápsulas; sin embargo, alcanza valores de 5-6 log, lo que puede ser suficiente o un recuento muy cercano para que este probiótico ejerza su función. El reglamento sanitario chileno año 2017 (Decreto N° 977/96), exige que los microorganismos lácticos presentes en el producto final deberán ser viables y en cantidad superior a 10^6 UFC/g de producto.

El recuento de bacterias se mantuvo casi en su totalidad en las cápsulas después del tratamiento con ácido. El control que poseía agua solamente no registró liberación en cápsulas de biofilm sin aceite, y en cápsulas de biofilm

con aceite fue casi nula, pero existente, denotando que son cápsulas más débiles que las sin aceite. La Figura 3.13. mostró que las cápsulas adquieren una estructura más viscosa, y débil, volviéndose más blandas por acción del ácido y fácilmente rompibles al tacto, por ello, la liberación puede aumentar si consideramos que el experimento de este trabajo no consideró el estrés mecánico de la masticación, o del existente en un estómago, por ejemplo al ingerir otros alimentos y estos se rocen con las cápsulas.



La liberación solo se presentó en cápsulas de biofilm y no en planctónicas. Las cápsulas de biofilm sin aceite presentan una liberación constante, y se mantiene la liberación ráfaga (liberación inicial), mientras que en las cápsulas de biofilm con aceite aumenta en mayor medida a los 90 minutos, diferencia estadísticamente significativa con respecto a las cápsulas de biofilm sin aceite a los 90 minutos. Este fenómeno se explica por el hecho que de las cápsulas con aceite tienden a ser más blandas por su constitución, probablemente debido a la capacidad de XT de retener agua, junto con la hidrofobicidad del aceite terminaría por desestabilizar la cápsula, actualmente no existen estudios que analice la interacción de XT con el aceite. Según un estudio de Cheow *et al.* (2014) que utilizaron la misma matriz pero recubierta con quitosano en cápsulas con biofilm sin aceite presentó una liberación de probióticos de 4,9 log (CFU/mg cápsula) después de 60 minutos, en cambio en este trabajo se liberan a los 90 minutos del orden de 5 - 6 log (UFC en 10 ml), según los cálculos en ambos

trabajos se liberó cerca del 1% de lo contenido en la cápsula. Sin embargo, una diferencia fue que las cápsulas de Cheow *et al.* presentaron una liberación inicial de 3,1 log (UFC /mg cápsula), llegando a 4,9 log (UFC / mg cápsula). En las cápsulas de biofilm de este trabajo, en las cápsulas sin aceite se mantuvo en 5 log UFC (en 10 ml) aproximadamente hasta los 90 min a pH 3, en cambio en cápsulas sin aceite llegó a 6 log UFC (en 10 ml) la liberación a pH 3, ambas cápsulas de biofilm de este trabajo tuvieron una liberación ráfaga inicial cercana al óptimo, es decir, se liberan más rápido, sin embargo, es un campo nuevo a investigar y requieren más estudios. Este fenómeno se explica debido a que se liberaron bacterias de la capa más externa de la cápsula, donde se produce erosión, en Cheow *et al.* (2014) al estar recubiertas con quitosano le otorga un retardo en este fenómeno. Hay que tener en cuenta que en Cheow *et al.* (2014), tanto las cápsulas con alginato como con AGN-XT exhiben perfiles de liberación de células similares en el fluido gastrointestinal simulado, sin embargo, la mayor tolerancia ácida fue de las cápsulas de AGN-XT. Si existe liberación de bacterias probióticas y estas son capaces de adherirse al epitelio del estómago se estaría logrando el objetivo de prevenir la infección de *H. pylori* que implica la penetración en la mucina gástrica y adhesión a células epiteliales a través de adhesinas (Boren *et al.*, 1993).

La actividad inhibitoria contra *H. pylori* indicados en la Tabla 3.6. en mm, denotó que se conservó tanto al encapsular como al liberarse y recuperarse las

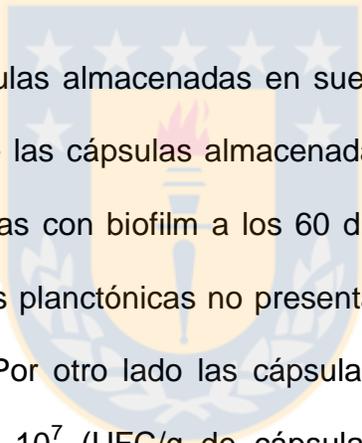
bacterias desde el medio ácido. Según Gaudana *et al.* (2010), la cepa utilizada se define como cepa con ligera inhibición, correspondiente a halos aproximados de 2 mm. Por lo tanto la matriz es propicia para ser ocupada ya que no afecta la actividad anti - *H. pylori* del probiótico de interés, y éste podría actuar a nivel gástrico. La actividad inhibitoria contra *H. pylori*, en conjunto con la formación de biofilm por esta bacteria probiótica, podría considerarse un beneficio porque contribuye a la colonización y mayor permanencia en el tiempo en la mucosa del huésped, evitando así la colonización por bacterias patógenas (Jones & Versalovic, 2009, Terraf *et al.*, 2012).

Las Figuras 3.16. y 3.17., mostraron los recuentos en placa de las cápsulas almacenados en suero fisiológico a distintas temperaturas, 25°C y 4°C respectivamente, cabe destacar que al día 60 las cápsulas con aceite aún no pierden su capacidad de flotar en suero fisiológico por lo que es un aspecto positivo que conserve su flotabilidad a lo largo del tiempo en caso de ser incorporado en algún alimento. Cuando las cápsulas fueron almacenadas 25°C, se observó que las cápsulas planctónicas dejan de presentar bacterias viables crecidas en placa MRS a los 30 días, probablemente por la falta de la protección que le otorgaría un biofilm, ya que las cápsulas con biofilm, tanto con o sin aceite, presentaron bacterias viables aún a los 60 días. Las cápsulas con aceite que poseen biofilm conservaron su recuento hasta los 15 días; sin embargo, después de los 30 días la disminución fue mayor que en las cápsulas

sin aceite que presentaban biofilm (Figura 3.16.), fenómeno atribuible al aceite, y probablemente a su estructura menos compacta y más endeble de las cápsulas, que presentó una disminución más lenta inicialmente de su recuento, pero luego de erosionarse baja considerablemente su recuento. Hoy en día no hay estudios de cápsulas de biofilm con aceite, pero autores como Eratte *et al.* (2015) determinaron que La viabilidad de la bacteria *L. casei* fue significativamente ($p > 0,05$) más alta cuando se co-encapsula con aceite de atún en una matriz de proteína con goma arábica, además de poseer estabilidad frente a la oxidación durante el almacenamiento, en lugar de ser encapsulado sin ese aceite; sin embargo, este trabajo no utilizó aceite rico en omega-3 (Eratte *et al.* 2016) y por ende no se vió ese efecto. Otro caso consistió en el almacenamiento de bacterias probióticas en frío en desnatado de leche, emulsionado con monoglicéridos, en donde las bacterias presentaron mayor viabilidad en comparación a las no emulsionadas; sin embargo, este estudio no contempló cápsulas, pero es un antecedente de los beneficios de los aceites en cuanto a viabilidad de probióticos (Marino *et al.*, 2017). Las cápsulas de biofilm sin aceite a los 15 días mostraron una disminución y se mantuvo su recuento. Ambas cápsulas responden al estrés inicial de la temperatura ambiental para luego mantener sus recuentos.

En el caso de las cápsulas con biofilm sin aceite almacenadas a 4°C presentaron un ligero aumento a los 15 días, al igual que las cápsulas

planctónicas, tanto con o sin aceite, que se puede deber a que continúan en crecimiento aún en estas condiciones, el aumento fue mayor en las cápsulas con biofilm debido a que deberían tener trazas de nutrientes que suministrados por el cultivo de una noche en caldo MRS (Figura 3.17.). Ambas cápsulas de biofilm se mantienen casi constantes en sus recuentos hasta el día 45, disminuyendo el recuento en el día 60, por lo que resisten mejor el estrés de esta temperatura en comparación a la temperatura ambiental.



En definitiva, las cápsulas almacenadas en suero fisiológico a 4°C obtuvieron mejores recuentos que las cápsulas almacenadas a temperatura ambiente, ya que a 25°C las cápsulas con biofilm a los 60 días tienen $10^4 - 10^5$ (UFC/g de cápsula) y las cápsulas planctónicas no presentaron células viables cultivables después de 30 días. Por otro lado las cápsulas a 4°C que contienen biofilm están en el orden de 10^7 (UFC/g de cápsula) y las cápsulas planctónicas poseen 10^5 (UFC/g de cápsula) después de 60 días. Las cápsulas de biofilm presentaron mejores recuentos que las planctónicas. De hecho, estudios de biofilm no encapsulados de tres cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fructivorans*) han demostrado tener una mayor tolerancia al ácido y al estrés (etanol), y en este caso temperatura, que sus formas planctónicas (Kubota *et al.* 2008).

La microencapsulación de biofilm de probióticos conllevaría a mayores cantidades de EPS, que es la sustancia que le otorga mayor tolerancia, en comparación con las células planctónicas, hacia tensiones externas y agentes antibacterianos (Cheow *et al.* 2010). La medición de EPS se expresó en mg de EPS/g cápsula, el EPS correspondía a la diferencia de azúcares totales presentada en la cápsula con y sin bacteria en cada caso, como se explicó en los resultados. El sobrenadante tenía menor concentración de EPS que el pellet, ya que cuando es cultivada la cápsula en caldo MRS está en el orden de 0,9 mg EPS/ g cápsula en el sobrenadante y en el pellet en el orden de 4,0 mg EPS/ g cápsula. Estudios de Salas-Jara *et al.* (2016^a) mostraron que *L. fermentum* UCO-979C obtenía valores más altos de EPS en cuando formaba biofilm en comparación con la misma cepa en planctónico.

En el sobrenadante de las cápsulas sin aceite se observó un aumento en la concentración de EPS de 0,32 mg EPS/g cápsula y en las cápsulas con aceite el aumento fue de 0,18 mg EPS/g cápsula, comparando cápsulas planctónicas con cápsulas cultivadas en caldo MRS por 12 h (biofilm) (Figura 3.19.). En el caso del EPS contenido en el pellet de cápsulas sin aceite se registró un aumento de 0,3 mg EPS/g cápsula y en las cápsulas con aceite se observó una disminución de 0,3 mg EPS/g cápsula, comparando cápsulas planctónicas con cápsulas cultivadas en caldo MRS (biofilm) (Figura 3.20.); sin embargo, este aumento se contradice con los recuentos de la cápsula de aceite cultivada en

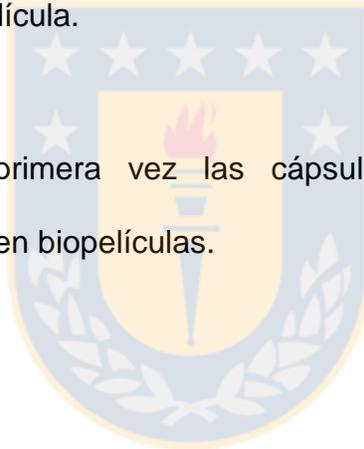
caldo MRS, que indicaba ser mayores que cápsulas sin cultivar en MRS, dando indicio de formación de biofilm y por ende de EPS, esto se puede deber a que la metodología usada no es propicia para cápsulas con aceite, causando ciertas interferencias. Actualmente no hay información de medición de EPS de ningún tipo de cápsula, lo cual se puede deber a la problemática de la interferencia de azúcares de la matriz.



5. CONCLUSIONES

- Se encapsuló *L. fermentum* UCO-979C en una matriz alginato-goma xantana (AGN-XT) proporción 3:1, respectivamente, 1,5% p/v, con y sin aceite vegetal (20 %), y aumentar su densidad bacteriana al cultivar la cápsula en caldo MRS suplementado con calcio durante 12 horas, sugiriéndose la formación de biopelícula.
- Se visualizó por microscopía las cápsulas de biopelícula sin aceite, y se vió microcolonias en microscopía óptica, y exopolisacárido por SEM.
- Solo la cápsula AGN-XT de *L. fermentum* UCO-979C en estado de biopelícula fue capaz de liberarse a pH ácido, en donde las cápsulas con aceite liberan mayor cantidad que las sin aceite, a los 90 minutos (6 log UFC). Sin embargo la cantidad fue pequeña en comparación a la totalidad de bacterias contenidas en la cápsula.
- *L. fermentum* UCO-979C conservó su actividad inhibitoria contra *H. pylori*, a pesar de ser encapsulada en la matriz AGN-XT, con y sin aceite, y al ser liberada a pH ácido (90 minutos).

- Los recuentos de las cápsulas almacenadas en suero fisiológico por 60 días fueron mejor en cápsulas de biopelícula, en comparación con cápsulas planctónicas, y mayores recuentos se observaron cuando se almacenó a 4°C, en comparación a temperatura ambiente (25°C).
- Se registró un pequeño aumento de EPS, comparando cápsulas planctónicas con cápsulas de biopelícula, ambas sin aceite, sugiriéndose la formación de biopelícula.
- Se estudió por primera vez las cápsulas AGN-XT con aceite que posiblemente poseen biopelículas.



6. PROYECCIONES

Existen pocos estudios de cápsulas de biopelícula de probióticos, y no existen estudios de estas cápsulas de biopelícula mezcladas con aceite, en cuanto a estudios de cápsulas probióticas de liberación gástrica, no hay información de matrices de polisacáridos usados para ello. Por ello es imperativo aportar conocimiento al respecto para encontrar matrices que liberen la cepa UCO-979C a nivel gástrico y que actúe principalmente como profilaxis para el tratamiento de la infección con *H. pylori*.

Una alternativa es elaborar cápsulas de biopelícula con aceites con propiedades funcionales como un aceite rico en ácidos grasos omega-3, especialmente recomendado para los individuos con enfermedades cardiovasculares, Alzheimer, diabetes y cáncer (Luchtman y Song 2013; McNamara y Carlson 2006; Rossmeisl *et al.* 2014; Wen, *et al.* 2014). Un estudio reciente puede servir como base para usar aceite en cápsulas con biofilm, ya que Eratte *et al.* (2017) realizó cápsulas con de aceite rico en omega-3 con bacterias probióticas, mejorando los recuentos, y la capacidad de adherencia a epitelio intestinal, además de la liberación de un aceite bioactivo. Una cápsula de biofilm con aceite funcional podría ser una nueva tecnología potencial para alimentos funcionales de mayor impacto a la salud de las personas.

7. REFERENCIAS

Aguilera-Correa, J., Urruzuno P., Barrio, J, Martínez, M., Agudo, Somodevilla, Llorca, L, Alarcón, T. 2017. Detection of *Helicobacter pylori* and the genotypes of resistance to clarithromycin and the heterogeneous genotype to this antibiotic in biopsies obtained from symptomatic children. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. 87, 150–153.

Andersen, L. 2007. Colonization and infection by *Helicobacter pylori* in humans *Helicobacter*. Suppl 2:12-15.

Arribas, B., Rodriguez, M. E., Camuesco, D., Zarauelo, A., Galvez, J. 2008. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharmaceutica*, 49, 5-30.

Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W., de la Cruz-Herrera, C, y Romero, I. 2014. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*. 20(6):1450.

Bajpai, S., Saxena, S., y Sharma, S. 2006. Swelling behavior of bariumions-crosslinked biopolymeric sodium alginate-carboxymethyl guar gum blend beads. *Reactive and Functional Polymers*, 66, 659–666.

Bekhit, M., Sánchez, L., Ben Messaoud, G., Desobry, S. 2016. Design of microcapsules containing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in alginate shell and xanthan gum with nutrients core. *LWT - Food Science and Technology*. 68, 446-453

Boren T, Falk P, Roth K, Larson G, Normark S. 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*. 262:1892–1895.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104, 467–483.

Cheow, W., Chang, M., y Hadinoto, K. 2010. Antibacterial efficacy of inhalable antibiotic-encapsulated biodegradable polymeric nanoparticles against *E. coli* biofilm cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 6(4), 391–403.

Cheow, W., y Hadinoto, K. 2013. Biofilm-like *Lactobacillus rhamnosus* probiotics encapsulated in alginate and carrageenan microcapsules exhibiting enhanced thermotolerance and freeze-drying resistance. *Biomacromolecules*. 14(9), 3214–3222.

Cheow, W., Kiew, T., y Hadinoto, K. 2014. Controlled release of *Lactobacillus rhamnosus* biofilm probiotics from alginate-locust bean gum microcapsules. *Carbohydrate Polymer*. 103(0), 587-595.

Cook, M., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. 2011. Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *Biomacromolecules*. 12(7), 2834–2840.

Darwiche, G., Bjorgell, O., Almer, L. (2003). The addition of locust bean gum but not water delayed the gastric emptying rate of a nutrient semisolid meal in healthy subjects. *BMC Gastroenterology*. 3(1), 12.

Decreto N° 977/96. Actualizado año 2017. REGLAMENTO SANITARIO DE LOS ALIMENTOS Publicado en el Diario Oficial de 13.05.97.

Donlan, R., y Costerton, J. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(2):167-193.

Du, Y., Su, J., Fan, Y., Lu, P., Zheng, X., Li, C., Guo, P., Xu, Y., Gong, F, Li, Z. 2012. Adjuvant probiotics improve the eradication effect of triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*. 18(43):6302.

Efrati, C., Nicolini, G., Cannaviello, C., O'Sed, N., P., Valabrega, S. 2012. *Helicobacter pylori* eradication: sequential therapy and *Lactobacillus reuteri* supplementation. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 18(43):6250.

El Abed, S., Hamadi, F., Latrache, H., Ibensouda, S. 2012. Scanning electron microscopy (SEM) and environmental SEM: suitable tools for study of adhesion stage and biofilm formation. *Scanning Electron Microscopy InTech*. 35:717–730.

Elfin, Y. 1995. Encapsulation of urease enzyme in xanthan–alginate spheres. *Biomaterials* 16, 1157–1161.

Eratte, D, McKnight, S, Gengenbach, T., Dowling, K., Barrow, C, Adhikari, B. 2015. Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. *Journal of functional foods*. 19, 882–892

Eratte, D., Wang, B., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. 2016. Survival and fermentation activity of probiotic bacteria and oxidative stability of omega-3

oil in co-microcapsules during storage. *Journal of Functional Foods*. 23, 485–496.

Eratte, D., Dowling, K., Barrow, C., Adhikari, B. 2017. In-vitro digestion of probiotic bacteria and omega-3 oil co-microencapsulated in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. *Food Chemistry*. 227, 129–136

Fareez, I., Lim, S., Mishraa, R., Ramasamya, K. 2015. Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH andthermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. *International Journal of Biological Macromolecules*. 72; 1419–1428

Foster, K., Morgen, M., Murri, B., Yates, Y., Fancher, R., M., Ehrmann, J., Gudmundsson, O., Hageman, M. 2012. Utility of in situ sodium alginate/karaya gum gels to facilitate gastric retention in rodents. *International Journal of Pharmaceutics*. 434, 406– 412

García, A., Navarro, K., Sanhueza, E., Pineda, S., Pastene, E., Quezada, M., Henríquez, K., Karlyshev, A., Villena, J., González, C. 2017. Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electronic Journal of Biotechnology* 25, 75–83.

Gaudana, S., Dhanani, A., Bagchi, T,. 2010. Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin. *Br J Nutr.*;103(11):1620-8.

Gombotz, W., y Wee, S. 1998. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 31, 276–285.

Graff, J., Brinch, K., y Madsen, J. 2001. Gastrointestinal mean transit times in young and middle-aged healthy subjects. *Clinical Physiology*. 21(2), 253–259.

Hartzen, S., Andersen, L., Bremmelgaard, A., Colding, H., Arpi, M., Kristiansen, J., Justesen, T., Espersen, F., Frimodt-Møller, N., Bonnevie, O. 1997. Antimicrobial susceptibility testing of 230 *Helicobacter pylori* strains: importance of medium, inoculum, and incubation time. *Antimicrob Agents Chemother*. Dec; 41(12):2634-9.

Heng, P., Chan, L., y Wong, T. 2003. Formation of alginate microspheres produced using emulsification technique. *Journal of Microencapsulation*. 20(3), 401–413.

Ishak, R., Awad, G., Mortada, N., Nour, S. 2007. Preparation, in vitro and in vivo evaluation of stomach-specific metronidazole-loaded alginate beads as local anti-*Helicobacter pylori* therap. *J Control Release*. 119(2):207-14

Jones, S., Versalovic, J. 2009. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol*. 9:1–9

Kamalian, Mirhosseini, H., Mustafa, S, Manap, M. 2014. Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. *Nikoo Carbohydrate Polymers*. 111, 700–706

Kaushik, J., Kumar, A., Duary, R., Mohanty, A., Grover, S., Batish, V., K. 2009. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PloS one*. 4(12):e8099.

Kim, M., Kim, N., Lee, S., Park, Y., Hwang, J., Kim, J., Jeong, S., Lee, D., Kim J., Jung, H. 2008. The Effects of Probiotics on PPI-Triple Therapy for *Helicobacter pylori* Eradication. *Helicobacter*. 13(4):261-268.

Kolida, S., Saulnier D., Gibson, G. 2006. Gastrointestinal microflora: probiotics. *Advances in Applied Microbiology*. 59:187-219.

Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H. 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381e386.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Gisbert, J., Kuipers, E., Axon, A., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K., El-Oma, E. 2017. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 2017;66:6–30

Marino, M., Innocente, N., Calligaris, S., Maifreni, M., Marangone, A., Nicoli, M. 2017. Viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in structured emulsions containing saturated monoglycerides. *Journal of Functional Foods*. 35 (2017) 51–59

Márquez, F. 2011. Caracterización de la tolerancia a pH ácido, tolerancia a la bilis, susceptibilidad a antibióticos y de la colonización en gerbos de Mongolia de las cepas de *Lactobacillus* gástricas 25A y 979C. Tesis de Magíster en Ciencias, mención Microbiología, Universidad de Concepción, Facultad de

Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana.

Martín, M., Morales, M., Gallardo, V., Ruiz, M. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharm*, Vol.50 n^o1; 43-50

McNamara, R. y Carlson, S. 2006. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 75(4–5), 329–349.

Murata, Y., Nakada, K., Miyamoto, E., Kawashima, S. 1993. Release of antibiotics and Seo, Influence of erosion of calcium-induced alginate gel. matrix on the release of Brilliant Blue, *J. Control. Release* 23, 21–26.

Luc, D. V. y Frederic, L. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 13:194-199.

Luchtman, D., y Song, C. 2013. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from child-hood to old age: Findings from animal and clinical studies. *Neuropharmacology*, 64, 550–565.

Rossmesl, M., Medrikova, D., van Schothorst, E. M., Pavlisova, J., Kuda, O., Hensler, M., Bardova, K., Flachs, P., Stankova, B., Vecka, M., Tvrzicka, E., Zak, A., Keijer, J., Kopecky, J. 2014. Omega-3 phospholipids from fish suppress

hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(2), 267–278.

Sahasathian, T., Praphairaksit, N., y Muangsin, N. 2010. Mucoadhesive and Floating Chitosan-coated Alginate Beads for the Controlled Gastric Release of Amoxicillin. *Arch Pharm Res*. Vol 33, No 6, 889-899.

Salas-Jara, M., Sanhueza, E., Retamal-Díaz, A., González, C., Urrutia, H. & García, A. 2016^a. Probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and *Helicobacter pylori* inhibition, *Biofouling*, 32:10, 1245-1257,

Salas-Jara, M., Ilabaca, A., Vega, M, García, A. 2016^b. Biofilm Forming *Lactobacillus*: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms*, 4(3), 35.

Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., Mentis, A. 2004. In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain *Shirota*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(1): 518-526

Sosnik, A. 2014. Alginate particles as platform for drug delivery by the oral route:State-of-the-art. *ISRN Pharmaceutics*. 926157.

Sunanliganon, C., Thong-Ngam, D., Tumwasorn, S., y Klaikeaw, N. 2012. *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. *World Journal of Gastroenterology*. 18(20):2472-2480.

Petermann, P. 2011. Determinación de actividad anti-*Helicobacter pylori* y antiinflamatoria de dos cepas de *Lactobacillus* de aislamiento gástrico en línea celular 82 AGS (adenocarcinoma gástrico). Seminario de título para optar al título de Biólogo. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana.

Pineda, S. 2009. Caracterización microbiológica y detección molecular de bacteriocinas en cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico, aisladas de biopsias gástricas. Tesis de Magíster en Ciencias, mención Microbiología, Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana.

Pineiro, M., y Stanton, C. 2007. Probiotic bacteria: legislative framework requirements to evidence basis. *The Journal of Nutrition*. 137(3 Suppl 2):850S-853S.

Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res Microbiol*. 154:705–712.

Talukdar, M., y Vercammen, J., P. 1993. Evaluation of xanthan gum as a hydrophilic matrix for controlled-release dosage form preparations. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 19(9), 1037-1046

Terraf, M., Juarez Tomas, M., Nader-Macias, M., Silva, C. 2012. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal *lactobacilli* and influence of culture media components. *Journal of Applied Microbiology*. 113(6):1517-1529.

Torres, M., D., Moreira, R., Chenlo, F., Vázquez, M., J. 2012. Water adsorption isotherms of carboxymethyl cellulose, guar, locust bean, tragacanth and xanthangums. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 592–598

Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., Schlemper, R.. 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *The New England Journal of Medicine*. 345(11):784-789.

Van Amsterdam, K., Van Vliet, A., H., Kusters, J., G., Van der Ende, A. 2006. Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(1):131-156.

Vallejos, C., L. Garrido, D. Cáceres, A. M. Madrid, C. Defilippi, C. Defilippi and H. Toledo. 2007. Prevalencia de la resistencia a metrodinazol, claritromicina y tetraciclina en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la Región Metropolitana. *Revista Médica de Chile*. **135**(3):287-293.

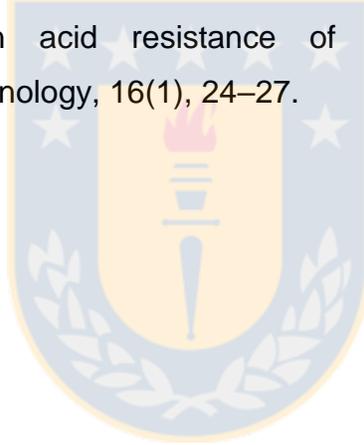
Wen, Y., Dai, J., & Gao, Q. 2014. Effects of omega-3 fatty acid on major cardiovascular events and mortality in patients with coronary heart disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 24(5), 470–475.

Wirtz, V., Dreser, A., Gonzales, R. 2010. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997-2007. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 27(3):219-225.

Wu, Y., Liang, J., Rensing, K., Chou, T., Libera, M. 2014. Extracellular matrix reorganization during cryo preparation for scanning electron microscope imaging of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microsc Microanal.* 20:1348–1355.

Yaşar, B., Abut, E., Kayadı, H., Toros, B., Sezikli, M., Akkan, Z., Keskin, Ö., Övünç, K. 2010. Efficacy of probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *The Turkish Journal of Gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology.* 21(3):212-217.

Zhu, M., Takenaka, S., Sato, M., Hoshino, E. 2001. Influence of starvation and biofilm formation on acid resistance of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology,* 16(1), 24–27.



ANEXOS

Anexo A: Promedios de los duplicados graficados en las Figuras 3.19. (25 °C), y 3.20. (4°C).

Temperatura	Día	Cápsula			
		Planctónica			Biofilm
		Planctónica	con aceite	Biofilm	con aceite
4 °C	0	2.53E+06	1.44E+06	3.65E+08	1.64E+08
	15	1.44E+07	1.54E+07	6.17E+07	6.70E+07
	30	2.40E+05	3.81E+05	1.42E+08	1.66E+08
	45	1.65E+05	3.44E+05	1.92E+08	1.51E+08
	60	1.38E+05	3.02E+05	1.47E+07	2.58E+07
25 °C	0	2.53E+06	1.44E+06	3.65E+08	1.64E+08
	15	1.74E+04	1.77E+04	1.56E+05	9.76E+07
	30	1.00E+00	1.00E+00	2.02E+05	1.72E+04
	45	1.00E+00	1.00E+00	1.37E+05	1.39E+04
	60	1.00E+00	1.00E+00	2.88E+05	1.95E+04

Anexo B: Tabla de datos de absorbancia de los triplicados de la curva de calibración de dextrano (Figura 3.18.)

Concentración de Dextrano (g/L)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
0.01	0.054	0.075	0.065	0.06466667	0.01050397
0.02	0.109	0.133	0.136	0.12600000	0.01479865
0.03	0.153	0.195	0.194	0.18066667	0.02396525
0.04	0.227	0.271	0.28	0.25933333	0.02836077
0.05	0.254	0.294	0.315	0.28766667	0.03098925
0.06	0.37	0.36	0.381	0.37033333	0.01050397
0.07	0.416	0.431	0.456	0.43433333	0.02020726
0.08	0.501	0.481	0.503	0.49500000	0.01216553
0.09	0.546	0.52	0.528	0.53133333	0.01331666
0.1	0.628	0.561	0.558	0.58233333	0.03957693
0.12	0.71	0.689	0.618	0.67233333	0.04821134
0.14	0.858	0.802	0.791	0.8170000	0.03593049
0.16	0.998	0.922	1.002	0.9740000	0.04507771
0.18	1.162	1.06	1.09	1.1040000	0.05242137
0.2	1.292	1.13	1.118	1.1800000	0.09718024

Anexo C: Planilla de cálculo de los mg de EPS/gr cápsula. Se presentaron variaciones en análisis estadístico ya que se trabajo con datos brutos y no con los promedios.g de cápsula de pellet (p) se resuspendió en 1.5 ml de suero fisiológico, y sobrenadante (s) en 1 ml. 15 ul en 150 ul total (10x factor dilucion). Mat: Cápsula sin bacteria, Pla: Cápsula planctónica, Bio: Cápsula planctónica cultivada en caldo MRS por 12 h, Mrs: Cápsula cultivada por 12 h, Ac: Aceite. SD: Desviación estándar.

Fracción de azúcares			Absorbancia 495 nm				Promedio	Concentracion (10x) (x1000 mg/L)	mg de EPS /gr capsula
	G	g/L			SD				
matriz p	0.3422	228.1	0.472	0.366	0.336	0.07145162	0.39133333	651.297641	2.85531627
matriz s	0.3422	342.2	0.083	0.095	0.093	0.0064291	0.09033333	142.937567	0.41770183
Mat ac p	0.345	230	0.298	0.342	0.23	0.05642694	0.29000000	480.155379	2.08763208
Mat ac s	0.345	345	0.104	0.106	0.17	0.03754109	0.12666667	204.301075	0.59217703
Mat mrs p	0.2474	165	0.35	0.349	0.32	0.01703917	0.33966667	564.037606	3.41840973
Mat mrs s	0.2474	247	0.038	0.056	0.028	0.0141892	0.04066667	59.0553398	0.23909044
Mat ac mrs p	0.241	161	0.299	0.37	0.265	0.05357549	0.31133333	516.185329	3.20612006
Mat ac mrs s	0.241	241	0.054	0.062	0.066	0.0061101	0.06066667	92.8334178	0.38520090
Pla p	0.2614	174.3	0.5	0.357	0.33	0.09135827	0.39566667	658.616225	3.77863583
Pla s	0.2614	261.4	0.089	0.109	0.079	0.01527525	0.09233333	146.315375	0.55973747
Pla ac p	0.38	253.3	0.531	0.484	0.413	0.05940539	0.47600000	794.291505	3.13577381
Pla ac s	0.2971	297.1	0.192	0.132	0.19	0.03407834	0.17133333	279.738783	0.94156440
Bio p	0.3497	233.1	0.61	0.72	0.6	0.06658328	0.64333333	1076.90142	4.61991173
Bio s	0.3293	329.3	0.16	0.147	0.118	0.02150194	0.14166667	229.634634	0.69734174
Bio ac p	0.3325	221.6	0.7	0.5	0.53	0.10785793	0.57666667	964.307831	4.35156963
Bio ac s	0.3325	332.5	0.211	0.163	0.186	0.02400694	0.18666667	305.635309	0.91920394