



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

UNIVERSIDAD SAN SEBASTIÁN
FACULTAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA
SEDE CONCEPCIÓN

Desarrollo de biomatrices basadas en
pectina/almidón/nanocelulosa para encapsulación de *Lactobacillus* sp.

Tesis para optar al Grado de Magíster en Innovación en Biociencia y Bioingeniería

Felipe Andrés Campos Espinoza

Profesor tutor de tesis: PhD. Johanna Castaño
Profesor co-tutor: PhD. Saddys Rodríguez



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

Felipe Andrés Campos Espinoza,
Se autoriza la reproducción parcial o total de esta tesis con fines académicos, por
cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita
bibliográfica del documento

Concepción, Chile

2021



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

HOJA DE CALIFICACIÓN

En _____, el ___ de _____ de _____ los abajo firmantes
dejan constancia que el (la) estudiante _____
del programa Magíster en Innovación en Biociencia y Bioingeniería de la Facultad
de Ingeniería y Tecnología ha aprobado la tesis para optar al Grado académico de

con nota de _____

Profesor Evaluador

Profesor Evaluador

Profesor Evaluador



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

DEDICATORIA

A DIOS

A MIS PADRES PATRICIA Y FERNANDO

“Para las personas creyentes, Dios está al principio. Para los científicos está al final de todas sus reflexiones”
(Max Planck)



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

AGRADECIMIENTOS

A mi profesora guía, PhD Johanna Castaño Agudelo, por creer en mi, por llenarme de energía y darme su apoyo incondicional. Siempre brindando sabias palabras cuando uno más lo necesita.

A la profesora PhD. Saddys Rodrigues Llamazares por entregar su total apoyo y sabiduría.

De todo corazón muchas gracias por todo.



RESUMEN

El consumo de probiótico a nivel mundial ha alcanzado más de 40 billones de dólares al año 2019 y se proyecta un crecimiento del 7% para el 2025 gracias a los múltiples beneficios reportados tales como, el aumento en la respuesta inmune, la reducción del tiempo de colitis y la ayuda en respuesta alérgicas.

Los productos lácteos son considerados la principal forma de incluir probióticos y representan el 69,9%. A nivel mundial, el 75% de las personas son intolerantes a la lactosa y en américa latina un 57%, por lo que la ingesta de probióticos a través de productos lácteos se ve limitada. Es por esta razón que se plantea en este proyecto de tesis el estudio y desarrollo tecnológico de nuevos productos diferentes a lácteos que permitan el consumo masivo de probióticos y puedan ser consumida por personas intolerantes a la lactosa. Para lo cual se evalúa tecnológica y comercialmente una formulación de un material compuesto basado en polisacáridos de almidón, pectina y nanocelulosa para la fabricación de encapsulados que pueda ser capaz de transportar bacterias probióticas hacia el colon sin alterar su biodisponibilidad.

Se aplica la metodología del Design Thinking como proceso creativo y el modelo de negocio mediante Business Model Canvas. Además, se presenta la estrategia de negocio mediante transferencia tecnológica y se evalúa la viabilidad económica determinando los actores relevantes del proceso productivo y comercial.



Summary

The probiotic consumption has reached more than US40 billion dollars in 2019 worldwide. A 7% rate of growth is projected by 2025 thanks to its multiple benefits such as, the increase in the immune response, the reduction of colitis length and the help in allergic responses.

The dairy products are considered the main source of probiotics and they represent the 69.9%. 75% of people are lactose intolerant worldwide, 57% in Latin America, so the intake of probiotics through dairy products is limited. It is for this reason that in this thesis project we propose the technological research and development of new non-dairy products, creating a new way of massive probiotic consumption especially for lactose intolerant people.

For which a development of a composite material based on starch, pectin and nanocellulose polysaccharides is technologically and commercially evaluated. This composite material will be used to create a capsule that may be able to transport the probiotic bacteria to the colon without disturbing its bioavailability.

The Design Thinking methodology and the Business Model Canvas are applied as creative process and model of business respectively. In addition, the business strategy is presented through technology transfer, and the economic viability is evaluated by establishing the significant agents of the productive and commercial process.



Tabla de contenido

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
SUMMARY	IV
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2 MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN.....	5
CAPÍTULO 3. MATRICES BIOPOLIMÉRICAS	17
3.1 PECTINA.....	18
3.2 ALMIDÓN	20
3.3 NANOCELULOSA.....	23
CAPÍTULO 4: JUSTIFICACIÓN.....	25
CAPÍTULO 5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	28
5.1 HIPÓTESIS	28
5.1.1 BIONEGOCIO	28
5.2: OBJETIVO.....	28
5.2.1 <i>Objetivos Específicos</i>	29
CAPÍTULO 6 METODOLOGÍA	29
6.1 PROCESO CREATIVO.....	29
6.2 MODELO DE NEGOCIOS.....	31
6.3 ESTRATEGIA DE NEGOCIO	36
6.4 TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA	37
6.5 ANÁLISIS ECONÓMICO	40
CAPÍTULO 7 RESULTADOS.....	42
7.1 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO/PROCESO	42
7.2 ENVÍO DE REVIEW	43
7.3 IDENTIFICACIÓN DE COMPETIDORES	44
7.4 DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS	47
7.5 IDENTIFICACIÓN DEL SEGMENTO	49
7.6 IDENTIFICACIÓN DE DOS O MAS EMPRESAS ASOCIADAS	50
7.7 DESCRIPCIÓN DE LA ESTRATEGIA DE MASIFICACIÓN.....	54
7.8 VIABILIDAD ECONÓMICA	56
CAPÍTULO 8 CONCLUSIONES	61
CAPÍTULO 9 REFERENCIAS.....	63



Capítulo 1: Introducción

La tendencia de la población por incorporar en su dieta alimentos que beneficien la salud y prevengan enfermedades ha aumentado. Esto explica la razón por la cual, la ingesta diaria de productos probióticos ha adquirido mayor importancia dentro de los consumidores modernos. Estos presentan efectos positivos, tales como, aumento en la respuesta inmune, reducción del tiempo de colitis, ayuda en respuesta alérgicas y mejoras tanto en el tránsito lento como en la formación de las deposiciones. Los probióticos se han adicionado a múltiples productos alimenticios y suplementos, siendo el principal producto los lácteos y sus derivados (Espitia *et al.*, 2016).

Probiótico es un término que significa "de por vida" y se define como "microorganismos vivos que afectan de manera beneficiosa la salud del huésped al mejorar su equilibrio microbiano" (Fuller, 1989). Más recientemente, los probióticos se han definido como " Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, otorgan un beneficio para la salud del huésped" (FAO / OMS, 2006). Las principales características de los microorganismos probióticos son: alta tolerancia tanto a los ácidos gástricos como a las sales biliares, por lo que pueden desarrollarse en ambientes entre pH 4,5 a 8.5, fácil adherencia a la mucosa o a células epiteliales humanas, actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas y reducción de la adhesión de las enterobacterias en la superficie de la célula, además, poseen actividad hidrolasa y modelación de la actividad inmunitaria (Anal y Singh, 2007; Parvez *et al.*, 2006).



Los beneficios de la ingesta de probióticos en la dieta alimentaria han sido avalados en la literatura científica. Así, por ejemplo, Zhang *et al* (2005) evaluaron el efecto de la ingesta de *Lactobacillus* GG en el reconocimiento bacteriano y la modelación inmune en células epiteliales tanto del intestino delgado como del intestino grueso. El estudio reveló que la producción de interleucina-8, inducida por factores de necrosis tumoral α (TNF- α), se redujo entre un 30% y 50% con la administración de *Lactobacillus* GG. Otra investigación relacionada con la barrera intestinal demostró que cepas de *Escherichia coli* Nissle 1917 inducen la expresión del péptido β -defensina-2 (hBD2) en células humanas, provocando un incremento del 50% en la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en el sistema digestivo (Wehkamp *et al.*, 2006). d'Ettore *et al* (2015) relacionaron que la ingesta de *Streptococcus salivarius ssp. Thermophilus*, *Bifidobacterium spp. Lactobacillus ssp.*, y *Streptococcus faecium* reducía la inflamación en el tracto gastrointestinal

Los microorganismos probióticos se clasifican en bacteria lácticas (BAL) conocidas como bacterias iniciadoras, son capaces de producir ácido láctico y ácido propiónico, además, son fermentadoras de ácido cítrico. Estas contribuyen al aroma, al sabor, a la textura y al valor nutricional de los alimentos fermentados como leches, yogurt y quesos. La segunda clasificación de los probióticos son las bacterias no lácticas (NLB) dado que no son capaces de producir ácido láctico, pero si pueden fermentar la lactosa. Estas bacterias son necesarias en el tracto digestivo dado que pueden participar en la producción de vitaminas B y K. En la Tabla 1.1 se



puede observar la clasificación acorde al microorganismo probióticos utilizados con efecto terapéuticos tras la ingesta del producto.

Tabla 1.1: Clasificación y microorganismos utilizados como probióticos

Clasificación	Probiótico	Producto alimenticio	Efecto terapéutico	Referencia
BAL	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Cápsulas	Disminución colitis colágena	Wildt <i>et al.</i> , 2006
	LA5			
	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Yogurt	Eliminación <i>H. pylori</i>	Wang <i>et al.</i> , 2004
BAL	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leche	Disminución diarrea en niños	Gaon <i>et al.</i> , 2002
NLB	<i>Saccharomyces boulardii</i>			Gaon <i>et al.</i> , 2003
BAL	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Yogurt	Modulación respuesta inmune	De Vrese <i>et al.</i> , 2005
	LGG			
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>			
BAL	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 74-2	Yogurt	Modulación respuesta inmune	Klein <i>et al.</i> , 2008
	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DGCC420		Roessler <i>et al.</i> , 2008	
BAL	<i>Bifidobacterium animalis</i> spp. <i>lactis</i> DN-173010	Leche cultivada	Disminución Síndrome intestino irritable	Collado <i>et al.</i> , 2006
				Guyonnet <i>et al.</i> , 2007
NLB	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Cultivo farmacéutico	Modulación respuesta inmune innata	Wehkamp <i>et al.</i> , 2006
BAL	<i>Bifidobacterium lactis</i> B94	N/A	La tasa de erradicación de <i>H. pylori</i> en niños administrados con el probiótico fue de un 77.1% comparado con el grupo placebo	Ustundag <i>et al.</i> , 2017



			Personas con deterioro cognitivo que fueron administradas mostraron mejoras en pruebas neurocognitivas comparada con el grupo placebo	Sanborn et al., 2020A
BAL	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	N/A		
BAL	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	N/A	Estabilidad en el nivel HbA1c en personas administradas comparado con el grupo placebo en donde estos nivel aumentaron	Sanborn et al., 2020B
BAL NLB	<i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophiles</i>	N/A	Pacientes presentaron un incremento en la regulación de los linfocitos B, linfocitos T y NK, además presentaron una disminución de los niveles CRP y se vio reducido el número de infectado por segunda vez en pacientes con COVID-19	Li et al., 2021

BAL: Bacteria láctica

NLB: Bacteria no láctica



La administración de los probióticos se realiza por vía oral y deben sobrevivir a las condiciones gastrointestinales. Por lo cual, los microorganismos probióticos deben ser encapsulados, para conservar su viabilidad, ya sea en tabletas, cápsulas o recubiertas. Principalmente son agregados en alimentos lácticos o sus derivados y últimamente se han añadido estos microorganismos en chocolates (Konar *et al.*, 2016), helados (Cruz *et al* 2009), jugos (Fernandes y Rodrigues, 2018) entre otros. Además, cabe mencionar que la dosis sugerida para que se logre los efectos terapéuticos, aún no es del todo aceptada por la comunidad científica, pero sí sugieren dosis entre $6 \log \text{cfu d}^{-1}$ y $9 \log \text{cfu d}^{-1}$ (Gomes *et al.*, 2009; Espitia *et al.*, 2016; Mostafa *et al.*, 2020),

Capítulo 2 Métodos de Encapsulación

La encapsulación es un proceso químico y/o físico que permite retener o confinar moléculas bioactivas tales como fármacos, enzimas, hormonas y microorganismos en matrices poliméricas. Las cuales pueden ser liberadas a velocidades controladas bajo la influencia de condiciones específicas de pH, temperatura, campo eléctrico o bien de fuerzas iónicas. La encapsulación de bioactivos ha sido ampliamente aplicada en la industria farmacéutica, agrícola, biomedicina, envasados y alimentos, sobre todo en esta última para la encapsulación de probióticos (Song *et al.*, 2012; Jame y Wang, 2019). Según lo mencionado anteriormente, los probióticos deben ser capaz de tolerar condiciones de pH gástricas, sales biliares presentes en el fluido intestinal, estrés ambiental, daño mecánico, interacción con los alimentos, factores y condiciones de almacenamiento, nivel de oxígeno y redox presente en el



sistema gastrointestinal, de ahí que sean células bioactivas que requieran ser encapsuladas (Pérez-Leonard, 2013; García-Ceja et al. 2015; Menezes *et al.*, 2019). La selección del método de encapsulación de sustancias bioactivas depende del diámetro de partícula, agente encapsulante, sustancia a encapsular, aplicaciones del material encapsulado, mecanismo de liberación y costo de procesamiento (Villena *et al.*, 2009)

2.1 Químicos

Dentro de los principales métodos químicos de encapsulación de probióticos se encuentran: gelificación iónica, coacervación y emulsión

La gelificación iónica ocurre cuando una solución polimérica acuosa compuesta por polielectrolitos de carga opuesta interactúa con iones divalente como Ca^{+2} y Mg^{+2} formando un gel estable debido a los residuos carboxilos no esterificados que están cargados negativamente (Aceval *et al.*, 2016; Kurozawa y Hubinger, 2017). Acorde con Pedroso-Santana y Fleitas-Salazar (2020), la ventaja de utilizar la gelificación iónica es que es un proceso fácil de implementar, de bajo costo, con un menor consumo de tiempo (< 10 horas), proporciona una alta eficiencia (>90%), puede conferir al formulado mucoadhesión y sinergia, pero se obtiene heterogeneidad en el tamaño de partícula con una polidispersión de hasta 0,5 lo cual no solo podría afectar en la cantidad de bioactivo encapsulado sino que además podría limitar la interacción con las estructuras biológicas. Existen dos tipos de gelificación iónica: interna y externa (ionotrópica). En la primera, los iones Ca^{+2} o Mg^{+2} migran desde el exterior hacia el seno del fluido interior originando un reordenamiento estructural



mientras que en el segundo, los iones divalentes migran desde el interior hacia la superficie (Menezes et al 2019; Guedes et al 2018). Chun *et al* (2014) encapsularon *L. plantarum* DKL 109 mediante gelificación iónica en tres formulados de polímeros: i) alginato (Al), ii) alginato/goma arábica (Al-GA) y iii) alginato/goma gellan (Al-GG) con la finalidad de determinar cuál confiere mayor protección y viabilidad del probiótico. La matriz que mostró la mayor tasa de encapsulación fue Al-GA con 98.11%, seguida de Al con 93.90%. Al-GA además se evidenció un incremento en la supervivencia del probiótico en fluidos gastrointestinales y sales biliares, manteniendo la estabilidad del encapsulado y la viabilidad durante 1 mes a temperatura ambiente. Guedes *et al* (2018) microencapsularon *L. acidophilus* en alginato-gelatina (AG) y alginato-gelatina-fructooligosacárido (AGF) por gelificación reportaron una mayor supervivencia durante el almacenamiento en yogur en comparación con *L. acidophilus* libre. La adición de fructooligosacárido no sólo proporcionó mejoras en la resistencia mecánica debido a una mayor interconexión en la red polimérica, sino además actuó como fuente de carbono para el probiótico incorporado en el yogur. Kim *et al* (2016) reportaron que la encapsulación de *L. acidophilus* por gelificación ionotrópica entre el ácido fítico (PA) y quitosano (CS) con extrusión electrostática con CaCO_3 , generó mayor estabilidad en el probiótico a pH 1,5 entre 2, además se obtuvo una mayor supervivencia de los microorganismos en comparación a los encapsulados PA-CS sin CaCO_3 . Con el objetivo de mejorar la supervivencia de *L. plantarum* durante el procesamiento térmico, se prepararon mediante gelificación iónica perlas de proteína de soja (SPI) y alginato (SA). El estudio arrojó que las perlas SA/SPI proporcionaron mejor protección a los fluidos gástricos y sales biliares después de 6 horas de incubación y presentaron mayor



tasa de sobrevivencia al proceso de pasteurización (72°C por 90s) en comparación a los encapsulados por SA y los microorganismos libres (Praepanitchai *et al.*, 2019).

La coacervación es una técnica que involucra la atracción electrostática entre biopolímeros y separa las fases de uno o varios hidrocoloides de la solución inicial con la posterior deposición en pequeñas gotas con alto nivel de biomoléculas delimitadas por una membrana. La ventaja de esta metodología es que es una técnica relativamente simple y de bajo costo, no requiere de altas temperaturas ni solventes orgánicos, alta eficiencia de encapsulación (hasta un 99%) y proporciona una liberación controlada del bioactivo, sin embargo, puede ocurrir dentro de rangos acotados de pH, depende de la concentración de los coloides y/o electrolitos (Comunian *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2012; Piacentini *et al.*, 2013). Dependiendo de la cantidad de polímero el proceso se divide en: simple (utiliza solo un polímero) y complejo (requiere de dos o más polímeros) con cargas opuestas, ambos procesos son dependientes del pH. La coacervación compleja ha sido de mayor interés en los estudios de encapsulación de probióticos. Así, Eratte *et al* (2015) encapsularon mediante coacervación compleja *L. casei* junto con ácidos grasos omega-3 en matriz proteína de suero-goma arábica reportando una viabilidad del probiótico significativamente mayor en comparación con los encapsulados sin el ácido graso. Da Silva *et al* (2019) lograron mejorar la encapsulación *L. acidophilus* por coacervación compleja utilizando reticulación enzimática con transglutaminasa. La utilización de esta enzima provocó que se formaran enlaces cruzados covalentes tanto intra como intermoleculares provocando que el tamaño de la partícula no aumentara permitiendo una mayor estabilidad en la encapsulación. Zhao *et al*



(2020) compararon el potencial de encapsulación del probiótico *Lactobacillus reuteri* usando coacervación compleja entre la matriz gelatina tipo A/caseinato de sodio (GE/Cas) y el coacervado de matriz gelatina tipo A/goma arábica (GE/GA) estudiado por Zhao *et al* (2018), para luego aplicar secado por aspersión a todos los coacervatos sintetizados. Encontraron que el pH óptimo para la formación del coacervato GE/Cas es a pH 6.0 cuando la razón del complejo GE/Cas es 2. Además, evidenciaron que el probiótico encapsulado al ser sometido a secado por aspersión sobrevive sin la pérdida de viabilidad, pero cuando son expuestos a fluidos gastrointestinales simulado por 3 horas, a un tratamiento térmico a 80°C por 1 hora con 33% HR y durante el almacenamiento a temperatura ambiente fue decreciendo de acuerdo con el siguiente orden: GE/Cas > Cas > GE/GA > GE. Hernández-Rodríguez *et al* (2013) también utilizaron coacervación compleja como método de encapsulación para *Lactobacillus plantarum* en matriz proteína de suero (W) y k-carragenano (K). Estos investigadores reportaron que el pH para llevar a cabo la coacervación fue entre pH 4.0 y 4.5 con una eficiencia de encapsulamiento del 39.6% y una viabilidad de 9.66 log cfu g⁻¹ tras ser incubación en fluidos gastrointestinales y sales biliares en comparación con las células libres (5.93 log cfu g⁻¹).

La emulsión es un sistema de dos fases (continua y dispersa) que consta de dos líquidos parcialmente miscibles, uno de los cuales es dispersado en el otro en forma de partículas. La emulsificación tiene como ventaja una eficiencia en la encapsulación >70%, alta reproducibilidad, fácil de escalar y una distribución de tamaño semejante, sin embargo, puede presentar bajas en la eficiencia dado que



pueden ser arrastradas a la fase acuosa y posee una remoción de grandes volúmenes de agua (Girija y Kumar, 2016). Shima *et al* (2006) estudiaron el efecto de encapsulación de *L. acidophilus* mediante emulsión agua/aceite/agua reportando una mayor viabilidad de las bacterias encapsuladas (49% después de 2 horas de inmersión en jugo gástrico) en comparación al probiótico libre de tan solo 1.3% a las 0,67 horas. Resultados similares fueron reportados por Pankasemsuk *et al* (2016) al encapsular *L. casei* 01 en matriz alginato/almidón de maíz. Ma *et al* (2020) demostraron la eficiencia de encapsulación mediante emulsificación de *L. plantarum* LIP1 en matrices de leche desnatada/agua/aceite/quimosina, logrando alcanzar una tasa de encapsulación del 87% cuando obtuvieron una relación agua-aceite 1:10. Además, las tasas de supervivencia fueron del 55%, y superiores a los probióticos libres (17%). Zhang *et al* (2015) encapsularon *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 en una emulsión aceite/agua utilizando proteína de suero/grasa de leche anhidra en fase acuosa. Establecieron que la mayor eficiencia de encapsulación (90%) se alcanzó al incorporar pectina a la emulsión y bajo condiciones térmicas (63°C por 30 minutos) la sobrevivencia de *L. salivarius* encapsulado fue de 2,0 log cfu ml⁻¹ mientras que en el probiótico sin encapsular no lograron detectarla. Por otro lado, al almacenar las bacterias encapsuladas a 4°C por 20 días, la viabilidad fue 3 veces mayor que aquéllos sin encapsular.

Dentro de las técnicas mencionadas la más utilizada por la industria es la emulsificación dado que se logran obtener micropartículas más homogéneas y con menor dispersión de tamaño. Luego se utiliza, generalmente la gelificación ionotrópica, para lograr una mejor resistencia mecánica.



2.2 Físicas

Dentro de los principales métodos físicos de encapsulación de probióticos se encuentran: secado por aspersión (SA), liofilización (LI) y extrusión (EX).

El secado por aspersión corresponde a la transformación de un fluido en un material sólido, atomizándolo en forma de pequeñas gotas en un medio de secado a temperatura entre 60°C y 150°C Haffner *et al* 2016. Este método de encapsulación es el más empleado en la industria alimentaria y a nivel investigativo, debido a que es rápido, de bajo costo, adaptable a los equipos en fábrica, presenta monodispersión, puede utilizarse en procesos continuos y en masa, entre otros. Sin embargo, algunos autores han reportado pérdidas en la viabilidad del encapsulado debido a las altas temperaturas utilizadas. Leylak *et al* (2020) optimizaron los parámetros de operación del secado por aspersión para encapsular *L. acidophilus* LA5 en una matriz de suero de leche (WP)/goma arábica (GA) con la finalidad de incorporarlos a un yogurt premium artesanal. Además, evaluaron la viabilidad del probiótico encapsulado durante el almacenamiento a 4°C por 28 días y tras ser incubados a condiciones gastrointestinales simuladas. La eficiencia máxima de encapsulación fue de 93.95% y la eficiencia máxima de producción del 48.36% cuando la temperatura del aire de entrada fue de 140°C, el flujo volumétrico fue de 0.485L h⁻¹ y la relación WP:GA 0.83:0.17. Al ser expuestos a fluidos gastrointestinales obtuvieron una tasa de sobrevivencia del 89.16% y la pérdida de viabilidad de los encapsulados al término del almacenamiento fue solamente de un 2.86%, inferior a los probióticos libres (31.43%). Nunes *et al* (2017) también



encapsularon *Lactobacillus acidophilus* LA5 por medio de SA, pero ellos utilizaron distintas matrices basadas en goma arábica, inulina, almidón resistente (Hi-maize) y trehalosa e investigaron la eficiencia de encapsulación, la resistencia térmica, la viabilidad al ser sometidos a condiciones gastrointestinales y de almacenamiento a 3 diferentes de temperaturas. Concluyeron que las matrices inulina y de maíz presentaron la mayor eficiencia de encapsulación con 93.12% y 94.26%, respectivamente, mientras que la matriz trehalosa proporcionó la mayor protección y resistencia térmica. El almidón resistente mostró mayor protección contra los fluidos gastrointestinales, lo cual fue corroborado con la mayor viabilidad del 92% observada en los probióticos encapsulados. En cuanto a la estabilidad durante el almacenamiento, sólo las micropartículas de trehalosa y almidón resistente presentaron menores pérdidas de viabilidad en frío, alrededor de un 19.4%, en comparación al 29.27% de reducción en las demás matrices. Hernández-López *et al* (2018) estudiaron como optimizar el proceso de secado por aspersion para encapsular *Lactobacillus pentosus* en una mezcla de almidón/pulque. La mayor eficiencia de encapsulación (98%) fue alcanzada a una temperatura de 100 °C y con 30% de sólidos totales, con lo cual obtuvieron una viabilidad de 9 log cfu mL⁻¹ y tras ser expuesto a condiciones de almacenamiento a 4°C el encapsulado mostró alta resistencia a las sales biliares (>98.9%) y al pH bajo (100%).

La liofilización, corresponde a la separación del agua u otro solvente de una disolución por medio de la congelación y posterior sublimación del hielo producido a presión reducida. Este método requiere alto consumo de energía, largos periodos de tiempo, puede provocar que las bacterias resulten cortadas por los cristales de



hielo e impartir condiciones de estrés por alta osmolaridad. Sin embargo, evita la oxidación, tiene polidispersión reducida y es de fácil utilización en la industria (Haffner *et al.*, 2016). Moayyedi *et al* (2017) realizaron encapsulamiento de *L. rhamnosus* ATCC 7469 en matrices de proteína de suero (WPI) adicionándole inulina (WPI/IN) y goma persa (WPI/IN/PG) y utilizando diferentes técnicas: liofilización, secado por aspersion y electropulverización. Ellos estudiaron: i) viabilidad en fluidos gastrointestinales y fluidos biliares simulados, ii) el tipo de encapsulación y iii) el almacenamiento durante 24 semanas a 25°C. Determinaron que la tasa de viabilidad de *L. rhamnosus* fue significativamente mayor en el encapsulamiento por liofilización (60%) que en el secado por aspersion (58.25%) y la electropulverización (51.5%). En el caso del almacenamiento reportaron que el probiótico liofilizado presentó una mejor viabilidad (10.12 log cfu mL⁻¹) comparada con los otros dos métodos. Shu *et al* (2018) encapsularon a *L. acidophilus* por liofilización utilizando crioprotectores e investigaron la supervivencia durante el almacenamiento en condiciones bajas de temperatura. Los crioprotectores evaluados fueron trehalosa, Na₂HPO₄, lactosa y leche desnatada en polvo. Además, estudiaron la viabilidad de los encapsulados incorporados en leche de cabra tanto en polvo como en tabletas durante el almacenamiento por 180 días a 25 °C, 4 °C y -18 °C. Los resultados arrojaron una alta tasa de supervivencia tras la liofilización (93.9%) en comparación con el control que sólo alcanzó el 36.6%, Para las condiciones de almacenamiento de los encapsulados la mayor viabilidad fue reportada a -18°C (11 log cfu g⁻¹) en cambio a temperaturas más altas la viabilidad fue por debajo de los 10 log cfu g⁻¹). Por otra parte, la viabilidad de los probióticos encapsulados a baja temperatura en leche de cabra con formato tabletas fue mayor



sobre lo recomendado ($> 6 \log \text{ cfu g}^{-1}$). Jang *et al* (2019) por medio de la liofilización encapsularon *Lactobacillus plantarum* en ácido-poli- γ -glutámico (γ -PGA₄₀₀) y evaluaron la viabilidad en diversas condiciones de estrés: i) al proceso de liofilización, ii) exposición a fluidos gastrointestinales, y iii) a la adhesión intestinal en Caco-2, el cual son líneas celulares adenocarcinoma colorrectal humano utilizadas como modelo principal de la barrera epitelial Reportaron que el probiótico encapsulado al término del proceso de liofilización redujo la viabilidad en $0.19 \log \text{ cfu mL}^{-1}$. Por otro lado, las bacterias sin encapsular al ser expuestas en fluidos gastrointestinales simulados durante 1 hora no sobrevivieron, mientras que los probióticos encapsulados solo redujeron su viabilidad en $0.3 \log \text{ cfu mL}^{-1}$. En la prueba de adhesión intestinal a Caco-2 se estableció que la mayor tasa de adhesión (35.9%) se logró con los probióticos encapsulados en γ -PGA₄₀₀ al 0.25% en cambio para los no encapsulados solo fue de un 24.52%.

En la Tabla 2.1 se presentan un resumen con los estudios más recientes de encapsulación de probióticos a través de los principales métodos químicos y físicos usados, así como, el tipo de matriz de encapsulación y resultados más relevantes de cada investigación.

Tabla 2.1: Métodos de encapsulación de probióticos.

Métodos de encapsulación	Tipo de encapsulación	Probiótico encapsulado	Matriz de encapsulación	Resultados	Referencia
Químico	Gelificación iónica	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alginato/gelatina; Alginato/gelatina/fructooligosacárido	fructooligosacárido proporciona una red mejorada resultando poros más pequeños y una red más interconectada	Guedes <i>et al</i> 2018



Físico	Gelificación iónica	<i>L. acidophilus</i>	Ácido fítico/quitosano	Mayor estabilidad contra el daño ácido Mayor tasa supervivencia con CaCO ₃	Kim <i>et al</i> 2016
	Coacervación	<i>L. acidophilus</i>	Proteína de suero/pectina	Mayor efecto protector	Gebera <i>et al</i> 2013
	Coacervación	<i>L. paracasei subsp. Paracasei</i> <i>L. paraplantarum</i>	Proteína de suero/goma arábica	Mejora la viabilidad en pH 2. Tasa viabilidad de un 86% coaservato se disuelve a pH 7	Bosnea <i>et al.</i> , 2014
	Secado por aspersión	<i>Bifidobacterium Bd-12</i>	Suero leche	7 log cfu g ⁻¹ durante 6 semanas en postre Baja supervivencia en Bilis	De Castro-Cislaghi <i>et al.</i> , 2012
	Secado por aspersión	<i>L. acidophilus</i> LA-5	Suero en polvo Goma arábica	Tasa encapsulación 93.95% Tasa producción 48.36% Reducción viabilidad entre 10.84% y 24.54%	Leylak <i>et al.</i> , 2020
	Extrusión	<i>L. bulgaricus</i>	Alginato-Leche	Tasa encapsulación 100% Disminución viabilidad de un 7.41%	Shi <i>et al</i> 2013
	Extrusión	<i>S. thermophilus</i> <i>L. bulgaricus</i>	Alginato de sodio	Protección contra condiciones extremas de secado	Seth <i>et al</i> 2017
	Liofilización	<i>L. plantarum</i>	Ácido poli-glutámico	Mejor adherencia en células Caco-2	Jang <i>et al</i> 2019
	Liofilización	<i>L. casei</i> ATCC-393 <i>L. rhamnosus</i> ATCC-9469	Maltodextrina/inulina Maltodextrina/fructooligosacárido	Mayor estabilidad tras la adición de inulina	Rodríguez-Barona <i>et al</i> 2016

Fuente: Elaboración propia

La extrusión como método físico de encapsulación de probióticos consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulante mediante el paso forzado del fluido a través de una aguja de jeringa o boquilla, así los microorganismos son agregados a la solución hidrocoloide, cuya suspensión se hace gotear sobre una



solución de endurecimiento (de Vos *et al.*, 2010; Yañez *et al.*, 2002). Acorde con Burgain *et al* (2011) y Solanki *et al* (2013), la extrusión es una técnica simple y económica, no daña al probiótico, no utiliza solventes nocivos y los encapsulados presentan alta viabilidad, pero a gran escala es difícil de utilizar debido a la formación lenta de microperlas, posee una elección limitada de material de pared o cubierta y presenta alta polidispersidad. El estudio de Seth *et al* (2017) demostró que la microencapsulación por extrusión de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* en alginato de sodio es una técnica eficaz para protegerlas contra condiciones de altas temperatura (148 °C). Se estableció que la tasa de supervivencia es directamente proporcional a la concentración de alginato de sodio e indirectamente a la presión de aire de la boquilla. La tasa de supervivencia alcanzada para *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* fue de 72.8% y 24.8%, respectivamente. Un incremento en la viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 encapsuladas mediante extrusión en alginato/mucilago fue reportado por Dokoohaki *et al* (2019). A 72 °C se obtuvo una disminución de 2 log cfu mL⁻¹ en los probióticos encapsulados en comparación con los probióticos libres (disminución de 7.5 log cfu mL⁻¹). En condiciones fluidos gastrointestinales simuladas la supervivencia del probiótico encapsulado fue de 67.85% mientras que los libres fueron del 62.34%. Al ser almacenados por 21 días a 4°C tras incorporar tanto los encapsulados como las bacterias libres de *L. rhamnosus* en un postre de leche, la tasa de viabilidad disminuyó en un 12.5% para los lactobacilos encapsulados y un 28.57% para las bacterias libres. Mahmoud *et al* (2020) compararon matrices alginato (Alg), alginato/leche desnatada (Alg-Sm), alginato/dextrina (Alg-Dex), alginato/proteína suero de leche desnaturalizado (Alg-DWP) y alginato/quitosano (Alg-Ch) para



encapsular *Lactobacillus plantarum* utilizando la extrusión como técnica de encapsulamiento, Concluyendo que: i) sólo Alg-Sm mantuvo la viabilidad de las bacterias por sobre las $6 \log \text{ cfu g}^{-1}$ durante el proceso de pasteurización ($65 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min), ii) Alg-Ch y Al-sm proporcionaron una mejor supervivencia en fluidos gastrointestinales simulados, iii) Alg-Dex mostraron pérdida de viabilidad a concentraciones de NaCl entre 3% y 5%, iv) el encapsulamiento no afectó la actividad metabólica de las bacterias atrapadas, v) en condiciones de congelamiento sólo Alg-DWP mejoró la supervivencia y vi) observaron un aumento en la viabilidad del probiótico en todos los encapsulados tras ser almacenados en condiciones de refrigeración (4°C) durante 4 semana.

Capítulo 3. Matrices biopoliméricas

La utilización de matrices biopoliméricas para encapsulamiento de bioactivos como los probióticos, es de interés para aplicaciones en la biomedicina dado que son compatibles con la mayoría de los tejidos vivos, poseen superficies hidrofílicas que contribuyen a una reducción en la adherencia de las proteínas o células. Su estructura porosa puede modularse permitiendo una alta capacidad de suministro de bioactivos, además, permite protegerlos del entorno y pueden ser liberados en el colon. Estos encapsulados son biodegradables, pueden ser hidrolizados por enzimas del tracto gastrointestinal, son sensibles tanto al pH como a la temperatura y campo electromagnético por lo que se le atribuye el ser un material inteligente para el transporte y suministro de probióticos.

Dentro estos biomateriales poliméricos, el almidón y la pectina están siendo de gran importancia para la industria e investigadores debido a que el almidón es una materia prima de bajo costo, es el segundo polisacárido más abundante de nuestro planeta, puede ser modificado o bien añadido a otros polímeros (Chávarri *et al.*, 2012; Cruz-Benítez *et al.*, 2019). Ahora bien, al ser biocompatible lo hacen ser un polímero de importancia para diferentes aplicaciones como por ejemplo la adsorción de colorantes y metales, en la agricultura, preservante de alimentos, productos para el cuidado personal, ingeniería de tejido y sistema de liberación de bioactivos.

3.1 Pectina

La pectina (Figura 3.1) es un heteropolisacárido vegetal cuya unidad fundamental es el ácido D-galacturónico unido por enlaces $\alpha(1-4)$ glucosídico con algunos grupos carboxílicos metilados. Existen dos formas: i) alto metoxilo (HM) y ii) bajo metoxilo (LM) (Yoshimura, 2005; Agudelo *et al.*, 2014).

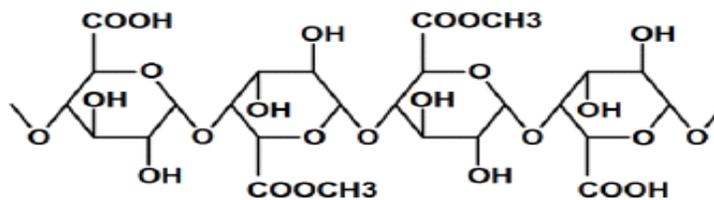


Figura 3.1: Representación química de la pectina. Fuente: Zegeda, 2015



La formación del gel de pectina depende de la estructura, del agente reticulante, de la temperatura y del pH. Para la síntesis del gel utilizando pectinas de alto metoxi (HM) se necesita un pH < 3.5 y altas concentraciones de azúcar (Gawkowska *et al.*, 2018) en cambio al ocupar pectinas de bajo metoxilo (LM) forman geles en presencia de cationes divalentes como Ca^{+2} a pH entre 2 a 6. Se ha evidenciado que a menor concentración de pectina en el sistema encapsulante genera uniones débiles con el agente reticulante haciendo que el gel tenga baja resistencia mecánica, alta porosidad y poca protección para el bioactivo encapsulado. Para contrarrestar esto, se agrega almidón o salvado de arroz para que actúen como relleno y así aumentar el efecto protector para el suministro de los bioactivos (Chan *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2008). Li *et al* (2019) determinaron la eficiencia de encapsulación de *Bifidobacterium breve* CICC6182 en pectina LM y la viabilidad tanto en el almacenamiento a tres temperaturas distintas (-20°C, 4°C y 25°C) por 13 semanas como a la exposición a fluidos gastrointestinales simulado. Los resultados evidenciaron que la eficiencia de encapsulación fue del 99% y después del tratamiento en fluidos gástrico simulados, la viabilidad de los probióticos encapsulados decreció en 1.76 log cfu g⁻¹ en comparación a las bacterias libres (decreció 4.82 log cfu g⁻¹). En tanto para el almacenamiento a bajas de temperatura, las bacterias encapsuladas presentaron una disminución de 1.5 log cfu g⁻¹, comparado con las células libres (4 log cfu g⁻¹). Gebara *et al* (2013) evaluaron la viabilidad de los *Lactobacillus acidophilus* LA5 encapsulados en pectina LM (P) y pectina/suero leche (P-S) en dos condiciones gastrointestinales simulada, CGS1 (pH 1.2 -7) y CGS2 (pH 3-7) y al exponerlos a un tratamiento térmico (80°C por 15 min.). La viabilidad después de la encapsulación



fue de $8 \log \text{ cfu g}^{-1}$ para todos los encapsulados sintetizados. Por otra parte, la viabilidad de las células encapsuladas en P ($5.45 \log \text{ cfu g}^{-1}$) finalizado el tratamiento CGS1 fue mayor que en los encapsulados con P-S ($5.22 \log \text{ cfu g}^{-1}$) mientras que en el simulado CGS2 la viabilidad fue mayor en las bacterias libres ($3.55 \log \text{ cfu g}^{-1}$). Determinando que la adición de pectina LM a la matriz polimérica entrega protección a las bacterias probióticas en condiciones de pH ácidas.

3.2 Almidón

El almidón es un polisacárido de reserva energética más abundante y se encuentra en tubérculos como la papa, el maíz, los cereales y las legumbres. Este polisacárido presenta dos regiones una amorfa y otra cristalina, en donde la amorfa consiste en moléculas de glucosa unidas entre sí por medio de enlaces glucosídicos $\alpha(1-4)$ denominada amilosa (Figura 3.2) que dispone una estructura helicoidal enrollada alrededor de un eje central, por ende los grupos hidroxilos están dispuestos hacia el exterior logrando que el interior sea hidrófoba y la región cristalina de estructura ramificada a través de enlaces glucosídicos $\alpha(1-6)$ cada 15 o 25 unidades de glucosa denominada amilopectina (Ismail *et al.*, 2013). El almidón, se ha considerado durante muchos años como un polímero con un alto potencial para la elaboración de matrices biopoliméricas debido a su bajo costo, disponibilidad y biodegradabilidad. Sin embargo, la naturaleza hidrófila de las cadenas del almidón lo hace sensible a la humedad del medio ambiente; por lo que, la mezcla de almidón termoplástico con polímeros biodegradables menos hidrófilos es una opción para la producción de películas que sean más resistentes al agua (Ismail *et al* 2013).

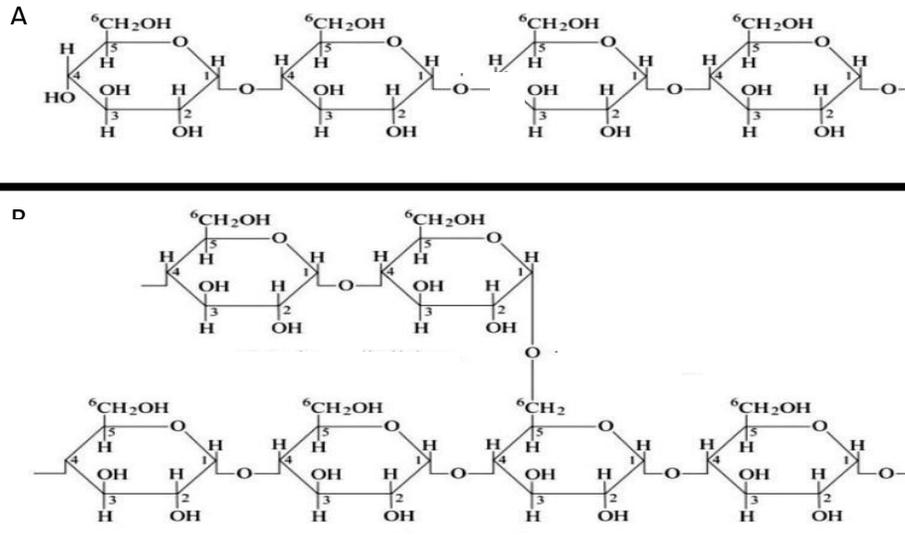


Figura 3.2: Representación esquemática del almidón. A, Amilosa. B, Amilopectina. Fuente: Nawaz *et al.*, 2019., con modificaciones.

El almidón nativo al ser ingerido es hidrolizado por las enzimas pancreáticas y para evitar la degradación se han incorporado otros polímeros como es el caso de la pectina debido su gran utilización en formulaciones como excipientes en medicamentos. Esto se debe a que la pectina es resistente al ácido gástrico y a enzimas gastrointestinales, pero no así a las enzimas colónicas (Dafe *et al* 2017).

En la Tabla 3.1 se puede apreciar una alta tasa de encapsulación en estudios con biomatrices basadas en pectina, alginato y almidón. Además, la gelificación iónica es el método físico-químico más usado en la encapsulación de probióticos.



Tabla 3.1: Matrices basadas en polisacáridos para la encapsulación de probióticos

Matriz de encapsulación	Método de encapsulación	Probiótico encapsulado	Tasa de encapsulamiento	Tasa sobrevivencia	Referencia
Almidón/Alginato	Gelificación iónica interna	<i>L. fermentum</i> CECT5716	97,26 %	76,19%	Martin <i>et al.</i> , 2013
Almidón soluble	Secado por aspersion	<i>L. plantarum</i> FT35	94,9 %	90,9%	Tantratian y Pradeamchai, 2020
Almidón ceroso Almidón modificado	Secado por aspersion	<i>L. pentosus</i>	99,22 %	99,23%	Cruz-Benítez <i>et al.</i> , 2019
Pectina/Salvado de arroz	Gelificación iónica interna	<i>L. plantarum</i>	95 %	86,3%	Chotiko y Sathivel, 2016
Pectina/Suero leche	Gelificación ionotrópica	<i>L. acidophilus</i> LA5	84,35 %	38,24%	Gebara <i>et al.</i> , 2013
Pectina	Liofilización	<i>B. breve</i>	99 %	67.04%	Carine <i>et al.</i> , 2020 Li <i>et al.</i> , 2019

Fuente: Elaboración propia

La utilización de almidón y pectina para la preparación de encapsulados presentan desventajas que son inherentes para la administración de probióticos. La alta solubilidad en agua facilita la liberación prematura de las bacterias probióticas. De ahí la necesidad de contar con refuerzos y/o aditivos que conduzcan a mejorar las propiedades de las matrices. La incorporación nanomateriales como refuerzo de la matriz polimérica proporciona mejoras en las propiedades mecánicas, de barrera y, además, térmicas de la matriz encapsulante. Un ejemplo de estos refuerzos son las nanocelulosas, biopolímero con alta área superficial, y grupos funcionales que permiten la interacción con otras moléculas mediante modificaciones químicas permitiendo así que la matriz polimérica adquiriera mayor rigidez o pueda ser más flexible, pueda disminuir o aumentar el tamaño de poro, puede actuar como

crioprotector y permiten una entrega controlada del bioactivo en el colon (Keivani *et al* 2015; Zhang *et al* 2018; Jayani *et al* 2020; Razavi *et al* 2021; Mettu *et al* 2021).

3.3 Nanocelulosa

La nanocelulosa se puede obtener desde diferentes materias primas siendo estas, plantas, tunicados, bacterias y algas, y están compuestas de celulosa.

La celulosa es un polisacárido natural de estructura lineal que se compone de glucosa unida por enlaces beta (1,4)-glucosídico siendo su unidad repetitiva los dímeros de celulosa denominados celobiosa como se puede apreciar en la Figura 3.3.



Figura 3.3: Representación esquemática de la estructura química, sus uniones por puente de hidrógeno intramolecular e intermolecular en la región cristalina de la celulosa. En verde representa el terminal reductor y en rosa, representa el terminal no reductor. Fuente: Lin & Dufresne, 2014.

Esta cadena lineal de monómeros de glucosa forma una estructura parecida a una silla plana como se puede apreciar en la figura 4, en donde es soportada por fuerzas



de interacción como las Van der Waals, así como también por puentes de hidrógeno unidas de forma intra e intermolecular permitiendo que se construya un arreglo cristalino, además a lo largo de la cadena que unidas forman parte de la estructura conocida como microfibrilla. Esta estructura además de poseer regiones o zonas cristalinas presenta regiones amorfas produciendo una desviación en segmentos acotados generando que las microfibrillas se inclinen y retuerzan (Abdul *et al.*, 2014) La celulosa posee biocompatibilidad, es biodegradable y no es tóxica. Asimismo, ésta posee alta resistencia a la tracción y módulo elástico que estaría entre 130 GPa y 150 GPa, respectivamente, área específica alta, baja densidad (1.6 g/mL), biodegradable, lo cual lo hacen un material con amplias aplicaciones tales como refuerzo en materiales ópticos, electroconductores y biomédicos.

Según la morfología, el tamaño y las técnicas de preparación de la celulosa se pueden clasificar principalmente en 2 categorías (Tabla 3.2): nanocristales de celulosa (CNC o NCC) o también denominadas nanowhiskers y a las nanofibras de celulosa (NFC o NCF).

Tabla 3.2: Subcategoría de las nanocelulas, fuente y tamaño promedio.

Tipo de nanocelulosa	Pseudónimo	Fuente de obtención	Tamaño promedio de la estructura
Nanocristales de celulosa (NCC)	Celulosa nanocristalina (CNC), bigotes o varillas de celulosa, nanowhiskers o whiskers	Madera, algodón, cáñamo, paja de trigo, agave, algas, bacterias	Longitud: 100-250 nm Diámetro: 5-70 nm
Nanofibra de celulosa (NFC)	Celulosa nanofibrilada, (NCF), nanofibra	Madera, remolacha, cáñamo, paja de trigo, vegetales, bacterias.	Longitud: Varios micrómetros Diámetro: 5-60 nm

Fuente: Abdul Khalil et al., 2014



Las nanocelulosas poseen áreas superficiales relativas elevadas en comparación a la celulosa. Esto implica que, al realizar modificaciones superficiales, las nanocelulosas pueden formar estructuras como películas o hidrogeles que son mecánicamente más estables, por lo que están siendo utilizadas como refuerzo o relleno demostrado ser candidatos prometedores para aplicaciones biomédicas como administración de fármacos o drogas o bien como andamios para la regeneración de tejidos.

Una de las particularidades de la superficie de estas nanoestructuras de celulosa es que pueden ser modificadas por métodos químicos para mejorar la adherencia interfacial y dispersión en la matriz polimérica. Las técnicas de modificación más utilizadas son: la esterificación, oxidación, amidación, carbamación, sustitución nucleofílica, sililación e injerto de polímeros (Eyley y Thielemans, 2014; George y Sabapathi, 2015).

Capítulo 4: Justificación

Los probióticos son incorporados principalmente en productos basados en lácteos, como se mencionó anteriormente, sin embargo, no todas las personas pueden tolerar la ingesta de estos productos, manifestándose sintomatologías digestivas de carácter moderada a severa como diarrea, vómitos, cólicos, úlceras bucales, dolor muscular, problemas cutáneos, astenia, aumento de la frecuencia de micción, dolor

de cabeza, borborismos, dolor y distensión abdominal, en donde estos síntomas son provocados por la enfermedad denominada intolerancia a la lactosa.

La intolerancia a la lactosa (IL) es un trastorno que posee una prevalencia variable que depende del grupo étnico, sexo y edad de la persona. Acorde con Fernandez (2017), se estima que a nivel mundial dos tercios de la población tiene este trastorno (Figura 4.1) siendo principalmente los asiáticos (90% y 100%), luego la población africana y árabe (80%) mientras que la población europea solo se ve afectada por un 15%, en cambio la prevalencia en américa latina es de un 57% aproximadamente y en nuestro país estas cifras no distan mucho de estos índices (Accinelli *et al.*, 2017).

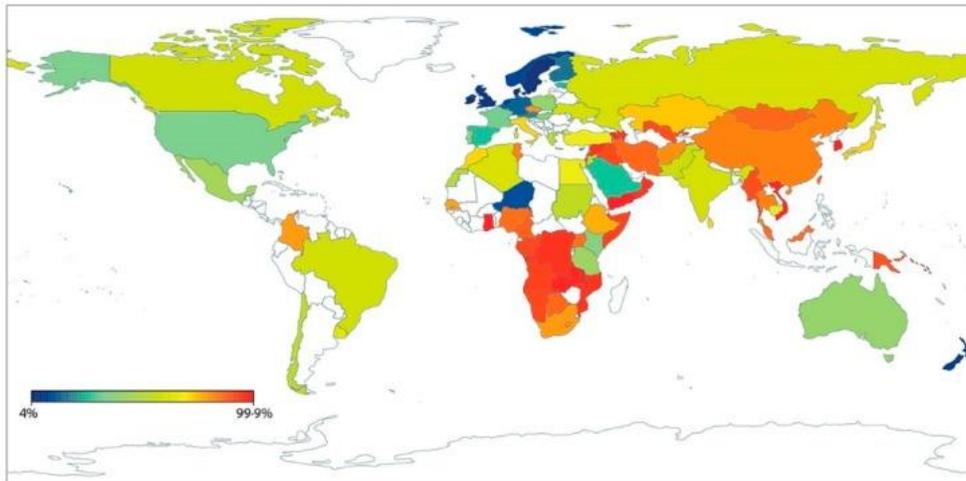


Figura 4.1: Representación gráfica de la distribución geográfica de la población mundial con intolerancia a la lactosa. En azul, individuos lactasa persistentes y en rojo, lactasa no persistente. Fuente: Szilagyi y Ishayek, 2018.



Asimismo, la IL está relacionada con otras patologías en personas adultas, como la osteoporosis (Hodges *et al.*, 2019) y hoy en día es muy difícil de evitar dado que la lactosa no solo se encuentra en la leche, sino que está presente en otros productos de consumo masivo como son: las galletas, cereales, chocolates, pan y productos horneados, sopas y cremas, embutidos y otros productos cárnicos, salsas, dulces, snack y en distintos tipos de fármacos como excipiente (Fassio *et al* 2018).

Es por esto por lo que existe la necesidad/oportunidad de desarrollar biomateriales compuestos e inteligentes capaces de encapsular microorganismos probióticos que puedan ser agregados o añadidos a diferentes productos sin lactosa y de consumo masivo, capaces de soportar los fluidos gastrointestinales y que lleguen al intestino grueso para su liberación. Las matrices biopoliméricas deberán tener propiedades específicas para la encapsulación de probióticos tales como biocompatibles, de fácil adquisición, de soportar condiciones adversas del sistema digestivo, que solo sean hidrolizadas por enzimas del intestino grueso, que sean estables a periodos largos de almacenamiento (> 90 días) tanto en frio como a temperatura ambiente, tenga resistencia mecánica, que la eficiencia encapsulación sea mayor al 95% y que la viabilidad de las bacterias probióticas (> 7 log cfu mL⁻¹) se mantenga durante todo el tracto gastrointestinal.

Es por esto que en este proyecto de tesis se planteará el desarrollo de un encapsulado de *Lactobacillus sp.*, mediante extrusión/gelificación ionotrópica utilizando una matriz biopolimérica de pectina/almidón/nanocelulosa con la finalidad



que la bacteria probiótica pueda soportar las condiciones gastrointestinales adversas y pueda ser liberada controladamente en el colon.

Capítulo 5 Hipótesis y Objetivos

5.1 Hipótesis

5.1.1 Bionegocio

La encapsulación del *Lactobacillus sp.* en la matriz biopolimérica permite la elaboración de un nuevo producto comercial con aplicación en productos diferentes a lácteos y sus derivados, contribuyendo significativamente a la ingesta de probióticos en un mayor número de usuarios con nuevas alternativas de consumo.

5.1.2 Hipótesis científica

La encapsulación de *Lactobacillus sp.*, en matrices poliméricas basadas en pectina/almidón/nanocelulosa permite igual o mayor viabilidad tras ser liberados en el colon en comparación con aquéllos utilizados comercialmente.

5.2: Objetivo

Desarrollar matrices poliméricas basadas en pectina/almidón/nanocelulosa para la encapsulación y administración de *Lactobacillus sp.*, en productos de consumo masivo diferentes a lácteos.

5.2.1 Objetivos Específicos

- I. Preparar y enviar artículo de revisión con estado del arte
- II. Elaborar proceso creativo de la propuesta de valor del producto comercial

ActivBioPlus

Capítulo 6 Metodología

6.1 Proceso creativo

Como proceso creativo se utilizó la metodología del Design Thinking (Figura 6.1).

A continuación, se describen las etapas que se llevó a cabo para el desarrollo del modelo creativo propuesto:

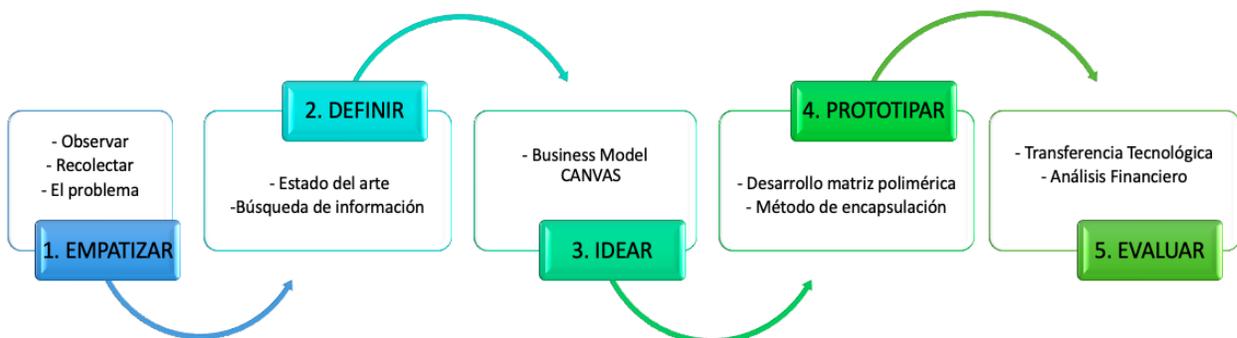


Figura 6.1: Esquematización de las etapas del Design Thinking del proyecto.

1. Empatizar: Para este primer paso se realizó una observación en el entorno detectando la necesidad de adquirir un producto que beneficie a la salud, que sea asequible, económico, sin procedencia animal, que no presente problemas digestivos tras la ingesta de productos lácteos y sus derivados, que sea natural y pueda ser combinado con otros productos alimenticios. A



partir de estas observaciones se pudo determinar que el problema detectado en el mercado es la falta de productos alimenticios (tanto lácteos como no lácteos) que al ser administrados por vía oral no generen reacciones adversas como alergias, colon irritable o algún otro problema digestivo y que además favorezcan la salud de las personas.

2. Definir: En este paso, se realizó la búsqueda de información y del estado del arte sobre compuestos capaces de entregar algún beneficio a la salud, que puedan ser administrados vía oral y que no presenten problema en la digestión de las personas. Tras esta recopilación de datos se determinó que la ingesta regular de bacterias probióticas favorece la salud por lo que la búsqueda estuvo centrada en el desarrollo de una matriz biopolimérica que sea capaz de transportar estas bacterias hacia el intestino grueso. Además, debido a la prevalencia de IL en nuestro país la matriz estaría basada en polisacáridos. Se determinó como candidatos el almidón, la pectina y las nanocelulosas y como bacteria probiótica la más utilizada en la industria alimentaria siendo ésta la *Lactobacillus sp.*
3. Idear: En esta etapa, se confeccionó el modelo de negocio que sustenta el desarrollo y la propuesta de valor de ActivBioPlus. Se propuso como propuesta de valor el desarrollo de un encapsulados de *Lactobacillus sp* basados en matriz polisacáridos de pectina/almidón/nanocelulosa como un suplemento alimentario que ser consumido por personas intolerantes a la lactosa y pueda ser integrado como un ingrediente a alimentos de consumo



masivo como tortas, bebidas de fantasía, jugos, cereales entre otros.

Se estableció el segmento de clientes, los canales, la estructura de ingresos y costos asociados, las alianzas estratégicas que permiten el desarrollo del producto, la relación con el cliente, proveedores claves y los recursos y actividades que son importantes para que el producto pueda ser creado.

4. Prototipar: Se estableció el prototipo a desarrollar el cual consistió en la encapsulación de *Lactobacillus acidophilus* mediante la matriz biopolimérica de pectina/almidón/nanocelulosa por medio de la extrusión seguida de una gelificación ionotrópica con cloruro cálcico para finalmente realizar liofilización y así obtener un polvo.
5. Evaluar: Se definió como estrategia de negocio el modelo lineal de la transferencia tecnológica desde la Universidad hacia la empresa. Además, se determinó la viabilidad económica del proyecto utilizando como herramientas el VAN, TIR y ROI a un plazo de 5 años

6.2 Modelo de negocios

Business Model Canvas fue utilizado como modelo de negocio (Figura 6.2).

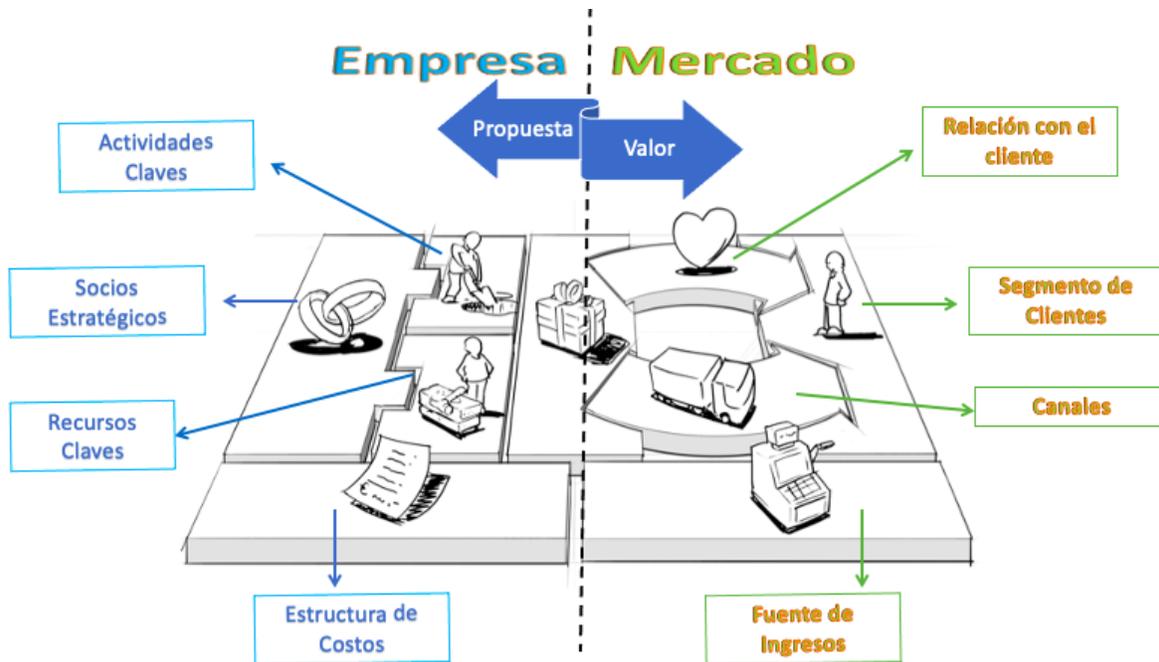


Figura 6.2: Representación del Business Model Canvas. Fuente: Osterwalder & Pgneur, 2011 con modificaciones.

Para visualizar de mejor forma los bloques del Business Model Canvas se dividió en dos áreas: Empresa y Mercado tal como se describen a continuación:

A. Empresa

- Estructura de costos:

Se identificaron los costos asociados que implican a los recursos y actividades claves que son importantes para el desarrollo del producto, asociaciones implicadas en la fabricación y equipos necesarios, remuneraciones de los colaboradores, entre otros (Tabla 6.1)

Debido a que los equipos e insumos como materias primas son importados se utilizó como moneda de paridad el dólar americano (USD) tasado en peso chileno



(CLP) a \$734 con fecha 8 de junio de 2021 para efecto del análisis financiero lo cual se puede observar en la Tabla 6.1. Estos precios incluyen impuestos, seguros, flete e impuestos aduaneros.

Tabla 6.1: Costos asociados al desarrollo del producto ActivBioPlus

Ítem	Sub ítem	Cantidad	Unidad	Costo Unitario (USD)
Materia Prima	Almidón	100	Kg	20
	Pectina	150	Kg	41
	Nanocelulosa	25	Kg	100
	Cloruro de Calcio	25	Kg	5
	Medio MRS	5	Kg	200
	Probiótico	25	Kg	16
Arriendo	Maquinaria y Terreno	60	Mes	2100
Remuneración	Líder Proyecto	1	Mes	2452.32
	Profesional	1	Mes	2082.4
	Técnico	2	Mes	1771.12
	Otros	2	Mes	780.45
Certificados de Calidad	Laboratorio ETFA	20	Unidad	1021.8
Difusión	Marketing	6	Anual	1362.4

Fuente: Elaboración propia

- Recursos Claves:

Los recursos claves que fueron considerados necesarios para dar cumplimiento a la propuesta de valor de ActivBioPlus son los colaboradores como el Líder de proyecto, los profesionales, los técnicos y otro personal categorizado como alumnos tesistas tanto de pregrado como de postgrados, lo que permitiría una mejora continua en el producto.

También otro recurso importante que fue considerado es la emisión de certificado de calidad e inocuidad alimentarios avalados por laboratorios ETFA acreditados bajo normas internacionales, como INTA de la Universidad de Chile, Empresa SGS Chile y AENOR Chile.



- Socios Claves o Estratégicos:

Los socios estratégicos que permitirían el desarrollo de ActivBioPlus fueron seleccionado por su vasta trayectoria en el desarrollo de I+D+i y por sus capacidades tecnológicas siendo el Centro de Polímeros Avanzados (CIPA) quien se encargará del desarrollo de esta tecnología, además de la Universidad San Sebastián como pilar fundamental en el Know-How. Otra de las empresas que formará parte de la alianza estratégica será AENOR Chile como empresa certificadora de la inocuidad de ActivBioPlus.

- Actividades Clave:

Se propuso como actividades clave el marketing tradicional y el marketing digital siendo este último de gran importancia para la difusión del producto en las redes sociales para alcanzar el nicho de mercado propuesto.

Se contará con certificados de inocuidad alimentaria emitidos por la entidad certificadora correspondiente. Se propondrá el desarrollo de una página web para dar a conocer a ActivBioPlus a los clientes.

B. Mercado

- Relación con el Cliente:

Se establecerá principalmente una relación directa con el cliente permitiendo un vínculo estrecho (contratos a medio y largo plazo) y personal en donde se estará siempre en contacto con los clientes preguntando y asesorando en todo momento



Para ello se contará con encuestas semestrales y bianuales enviadas digitalmente por medio de email que permitirá una mejora continua en el producto basado en la experiencia del cliente, además de una línea directa vía telefónica u otro medio como Whatsapp empresarial o Telegram.

- Segmento de Clientes:

ActivBioPlus estará dirigido a mejorar la calidad de vida de las personas con algún problema digestivo que tras la ingesta de lactosa tanto directa como indirecta se vean perjudicadas, pero también a personas que consuman productos que beneficien su calidad salud.

- Fuente de Ingreso:

Se propone como principal fuente de ingreso fondos concursables tanto públicos como privados. También el levantamiento de capital por medio de inversionistas a través de crowdfunding, inversores ángeles, propiedad intelectual, transferencia tecnológica y venta indirecta de ActivBioPlus

- Canales:

Como canales se contará con la cadena de distribución del Retail, de las farmacéuticas y de las tiendas especializadas para que así, la experiencia del cliente sea positiva y agradable con la finalidad de abarcar todo el territorio nacional. También el producto se ofrecerá por medio de la página web.

6.3 Estrategia de negocio

La Figura 6.3 muestra un modelo lineal de transferencia tecnológica (Universidad - Empresa) a implementar a partir del desarrollo del proyecto.

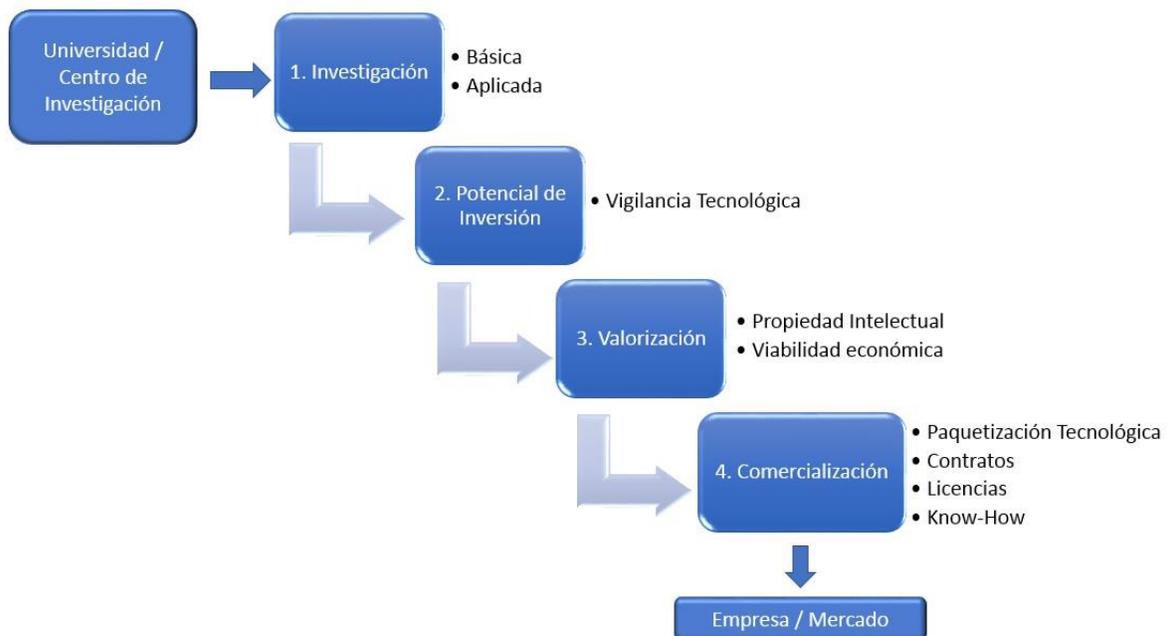


Figura 6.3: Esquemización de la estrategia de negocio a utilizar. Fuente: Elaboración propia

A continuación, se definen las etapas de la estrategia de negocio:

1. Investigación: En esta fase se llevó a cabo la investigación básica/aplicada que conllevó al desarrollo de esta propuesta acorde al paso I del proceso creativo.
2. Potencial de inversión: En este paso se realizó la vigilancia tecnológica según el punto 6.3 de esta propuesta el cual se describen las herramientas, motores de búsqueda y base de datos empleadas.



3. Valorización: En esta fase, tras los resultados recopilados por la vigilancia tecnológica, se desarrolló la viabilidad económica tal como se describe en el apartado 6.5 en donde se mencionan las herramientas financieras utilizadas con la finalidad de verificar la sostenibilidad de esta propuesta para luego dar paso a la protección y patentamiento de los resultados y del producto ante el Instituto Nacional de Propiedad Intelectual (INAPI) en Chile y/u organismo extranjero en Europa y Estados Unidos.
4. Comercialización: Para la comercialización se propone desarrollar paquetes tecnológicos asociados al licenciamiento y al know-how del producto por medio de contratos a mediano y largo plazo para así dar paso a la transferencia del conocimiento del producto hacia la empresa.
5. Empresa mercado: Se espera que la transferencia, una vez terminado la etapa de negociación la transferencia, sea implementada exitosamente en la empresa para dar paso a la fabricación del producto y su posterior comercialización en el mercado

6.4 Transferencia tecnológica

El procedimiento de vigilancia tecnológica que se estableció para el desarrollo del proyecto contempló la recopilación de información, revisión y análisis tanto en motores de búsqueda, bases de datos especializadas como también la utilización de herramientas tales como:

- Scopus: Base de datos especializada bibliográfica con resúmenes y citas de artículos revistas científica revisadas por expertos. Contiene más de 3700 revistas indexadas, más de 21000 libros y más de 8 millones de actas de congreso abarcando distintas áreas del saber cómo tecnología, ciencia



y ciencias sociales

- Web of Science (WoS): Es una base de datos especializada en información científica perteneciente a la empresa Clarivate Analytics e integrado a la ISI Web of Knowledge. Permite la facilidad de conectar y dar acceso a revistas científicas, libros de todo el campo del conocimiento académico indexando a 10000 revistas de ciencia, tecnología, ciencias sociales, artes y humanidades.

Además, de las siguientes herramientas de transferencia tecnológica y búsqueda de patentes como:

- Observatorio Virtual de Transferencia Tecnológica de Universidad de Alicante (<https://ovtt.org>): Es una plataforma virtual que facilita la entrega de información científica, tecnológica y estratégica brindando conocimiento a la transferencia, innovación y el emprendimiento para detectar nuevas oportunidades de negocio y mejorar la toma de decisiones. Lens (<https://lens.org>) Plataforma virtual que reúne trabajos académicos indexados, posee búsqueda de patentes con indexación de citas, búsqueda de secuencias biológicas y colecciones de obras.
- World Intellectual Property Organization (WIPO): Plataforma virtual mundial de servicios de políticas, información y cooperación en materia de propiedad intelectual.
- Google Patent: Es un motor de búsqueda de patentes y solicitudes de patentes de Google Inc.



La Tabla 6.2 muestra las principales patentes de invención relacionadas con la obtención de encapsulados probióticos en biomatrices polimérica y la diferencia con la propuesta en este proyecto. De lo anterior se puede concluir que la matriz pectina/almidón/nanocelulosa no ha sido desarrollada ni patentada en la actualidad, por lo cual el desarrollo basado en esta propuesta generará una ventaja competitiva.

Tabla 6.2: Patentes internacionales referentes a matriz polimérica utilizada, método de encapsulación y probiótico encapsulado.

Patente	Matriz polimérica utilizada	Método de encapsulación	Probiótico utilizado
CN103283975A	Almidón/goma arábica/maltodextrina	Secado por aspersión	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i>
US8540980B2	Hidroximetilcelulosa/pectina/almidón	Liofilización	<i>Lactobacillus sp.</i>
JP2018501275A	Maltodextrina/almidón/celulosa microcristalina	Liofilización	<i>Lactobacillus sp</i> <i>Bifidobacterium sp.</i>
TWM559069U	Trehalosa/polidextrosa	Liofilización	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Bifidobacterium sp.</i>
ES2350436A1	Alginato/quitosano/frustooligosacarido	Extrusión	<i>Lactobacillus sp</i> <i>Bifidobacterium sp.</i>
CN102228235A	Alginato/almidón	Extrusión/gelificación ionotrópica/liofilización	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Bifidobacterium sp.</i>
CN112544978A	Alginato/suero de leche/nanocristales de celulosa	Gelificación	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Bifidobacterium sp</i>
CN1090259245A	Almidón/Inulina/pectina/maltodextrina	Secado en Frio	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Bifidobacterium sp</i>
PROPUESTA	Pectina/almidón/nanocelulosa	Extrusión/gelificación ionotrópica	<i>Lactobacillus sp..</i>

Fuente: Elaboración propia



Finalmente, se utilizó como una herramienta Google Alert (<https://google.cl/alerts>) en donde permitió supervisar en la web nuevos contenidos mediante notificaciones push enviadas al correo electrónico una vez al día.

Tanto en la búsqueda de patentes, alertas y detección de señales se emplearon las siguientes palabras claves:

- Polysaccharide
- Probiotic
- Probiotic Encapsulation
- Starch
- Pectin
- Nanocellulose

6.5 Análisis económico

Se realizó el análisis económico por medio de la estimación del flujo de caja del proyecto por medio del análisis de sensibilidad evaluando el Valor Actual Neto (VAN), la Tasa Interna de Retorno (TIR), el Retorno sobre la Inversión (ROI) y el Payback en dos escenarios posibles.

Para el calculo del VAN se utilizó la fórmula que se muestra a continuación:



$$VAN = \sum_{t=1}^n \frac{F_t}{(1+k)^t} - I_0 \quad (1)$$

En donde F_t corresponde al flujo neto en un periodo de tiempo t , I_0 es la inversión inicial y el término k es la tasa de descuento que para fines de evaluación se asumió a 12%. Debido a que en el índice IPSA durante los últimos 5 años (2015-2020) su variación fue negativa a en comparación con el índice bursátil Dow Jones de Norteamérica en donde su variación promedio anual no supera el 5% además cabe mencionar que la inflación en nuestro país se encuentra en un 3%, por tanto, la tasa de descuento esta acorde con proyectos de plazo 5 años.

La TIR se calculó de la siguiente forma:

$$\sum_{t=0}^n \frac{FC_t}{(1+TIR)^t} = 0 \quad (2)$$

FC_t corresponde al flujo de caja cuando VAN equivale a cero en un periodo de tiempo n .

Otro parámetro utilizado fue el Retorno sobre la Inversión dado que nos entrega información sobre la rentabilidad del proyecto. Este fue calculado en un periodo de 5 años acorde a la siguiente fórmula:

$$ROI = \frac{Ganancia - Inversión}{Inversión} \times 100 \quad (3)$$



Cómo último parámetro se utilizó el payback para conocer el periodo de tiempo en que la inversión retorna. Para ello se calculo de la siguiente manera:

$$\text{Payback} = \frac{\text{Inversión}}{\text{Flujos de caja}} \quad (4)$$

Capítulo 7 Resultados

7.1 Descripción del producto/proceso

ActivBioPlus es el producto comercial fabricado a partir de microperlas de una matriz biopolimérica de pectina/almidón/nanocelulosa que encapsularan bacterias probióticas del género *Lactobacillus spp*, mediante extrusión/gelificación ionotrópica siendo, al final del proceso, liofilizadas para obtención de un formato en polvo (Figura 7.1). El cual podrá ser comercializado de forma directa como suplemento alimenticio o bien de manera indirecta incorporadas como un ingrediente en la elaboración de distintos alimentos de consumo masivo como chocolates, jugos, bebidas de fantasía, aguas y tortas, entre otros.

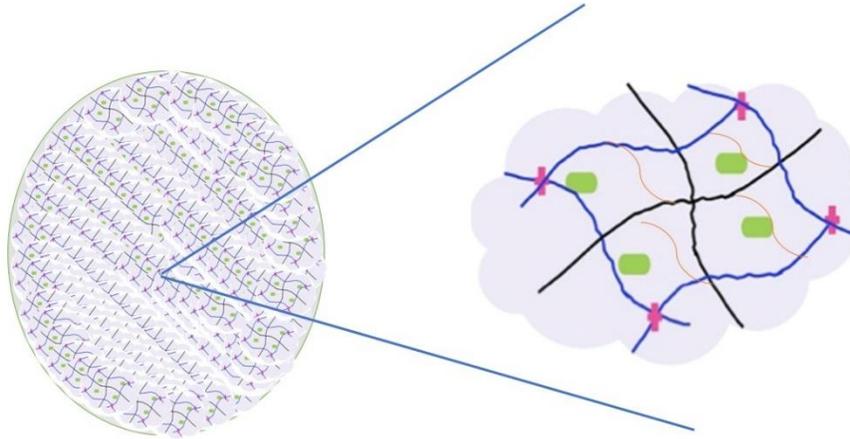


Figura 7.1: Representación esquemática de una microperla ActivBioPlus antes de ser liofilizadas. En verde, bacterias probióticas. En azul, pectina LM. En negro, almidón. En naranja, nanocelulosas.

Cabe mencionar que ActivBioPlus contará con certificados de calidad y de inocuidad alimentaria siendo su formato de presentación liofilizado/polvo para facilitar el transporte, el envasado y sea atractivo para el cliente.

7.2 Envío de Review

Como parte de esta propuesta de tesis se realizó un análisis de la revisión del estado del arte y bibliográfico actualizado que aborda tipos y usos de bacterias probióticas, principales métodos y matrices de encapsulación utilizados en la industria alimentaria.

Su estado actual es el siguiente:

Título: Polysaccharides for probiotics bacteria microencapsulation: mini review

Revista: Food Science and Technology (Campinas-Brasil)



Estado revisión: En revisión con un comentario por parte de los revisores expertos de la revista

7.3 Identificación de competidores

Los principales competidores directos de ActivBioPlus son productos comercializados en su mayoría en formato cápsula y son fabricados por distintas farmacéuticas como Maver, NewScience, Pharma Investi y Axon pharma. Mientras que los productos sustitos o indirecto están relacionados con multivitamínicos y productos de consumo masivo como dulces, yogurt, quesos, bebidas lácteas, leche en polvo y leche cultivada de empresas farmacéuticas como Wellness Science y empresas alimentarias como Danone, Colún, Soprole, Nestlé y Loncoleche.

Las diferencias funcionales de ActivBioPlus radican en ser un producto multifacético debido a que se podrá administrar tanto en polvo como en cápsulas, además, de poder integrarse a distintos productos de consumo masivo como bebidas, jugos, chicle, tortas, entre otros; sin que sus propiedades organolépticas se vean alteradas.

Dentro de las diferencias productivas y operacionales es que el producto ActivBioPlus constara de materias primas certificadas de calidad orgánica, de bajo costo y escalable dado que la metodología de encapsulamiento que se utilizará permitirá que las concentraciones del probiótico ($6,5 \log \text{ cfu d}^{-1}$) sean bajas y se mantengan por todo el sistema digestivo hasta llegar al intestino grueso

En la Tabla 7.1 se identifican los principales competidores y sustitutos de ActivBioPlus.

Tabla 7.1: Clasificación de productos comercializados según el tipo de competidor e identificación de la empresa fabricante, el formato de venta, matriz polimérica y probiótico utilizado.

Tipo Competidor	Empresa	Producto	Formato	Matriz polimérica	Probiótico
Directo	Newciece	Probiotix®	Cápsulas	Fructooligosacáridos Celulosa microcristalina gelatina	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>
Directo	Wellplus	ProbioticPlus®	Cápsulas	Celulosa microcristalina	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>
Directo	Swason	Ultime 16 Strain Probiotic	Cápsulas	Fructooligosacárido Celulosa microcristalina gelatina	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
Directo	VitaminLife Wellness Science	Daily Biotic Fiber	Cápsulas	Inulina Celulosa microcristalina gelatina	<i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i>
Directo	Nestle	NanCare Protect	Cápsulas	Suspensión líquida	<i>B animalis subsp.</i> <i>Lactis</i>
Directo	Nestle	Nancare Comfort	Cápsulas	Maltodextrina	<i>L. reuteri</i>
Directo	Laboratorio Maver	diavital®	Cápsulas	Maltodextrina Aceite palma Aceite coco	<i>L. reuteri</i>
Directo	Pharma Investi	Vintix®	Cápsulas	Manitol Gelatina Almidón modificado	<i>S. boulardii</i>
Directo	Pharma Investi	Multiflora® Plus	Cápsulas	Fructooligosacárido	<i>Bifidobacterium sp.</i> <i>Lactobacillus sp.</i>
Directo	Axon pharma	Alflorex®	Cápsulas	Almidón Hidropropilmetilcelulosa	<i>B. infantis</i>
Directo	ITF LABOMED	Prodefen	Polvo	Fructooligosacárido Maltodextrina Isomaltol	<i>L. rhamnosus GG</i> <i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. infantis</i> <i>S. thermophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>B. breve</i>
Indirecto o Sustituto	Axon pharma	Muno	Polvo	Multivitámico Maltodextrina Almidón de maíz Fructooligosacárido	<i>L. rhamnosus GG</i> <i>B. lactis</i>
Indirecto o Sustituto	P&G Health	BION3	Tableta	Celulosa microcristalina Goma de acacia Hidropropilcelulosa Inulina Almidón modificado	<i>L. gasseri</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. longum</i>
Indirecto o sustituto	VitaminLife WellnessScienc e	Probiotic Gummies	Dulce (gomitas)	Pectina Maltitol Isomaltol	<i>B. coagulans</i>
Indirecto o sustituto	Danone	Activia®	Yogurt	N/A	<i>B. animalis</i>
Indirecto o sustituto	Colún	Protein Plus	Yogurt	N/A	<i>B. lactis</i>
Indirecto o sustituto	Colún	Colun light	Queso	N/A	<i>B. BB-12</i>



Indirecto o sustituto	Soprole	Uno al día	Bebida láctea	N/A	<i>L. rhamnosus</i>
Indirecto o sustituto	Nestlé	Nestúm	Leche en polvo Cereal Fórmula láctea	N/A	<i>L. paracasei</i> <i>B. animales</i> <i>subsp. Lactis</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>B. longum</i>
Indirecto o sustituto	Loncoleche	Cultivada	Leche cultivada	N/A	<i>L. acidophilus</i> <i>B. animales</i> <i>subsp. lactis</i>

Fuente: Elaboración propia

Las ventajas competitivas de ActivBioPlus provienen de su simiente pensada en personas que tienen problemas digestivos, alergias e intolerancia a la lactosa. Es por eso que este producto presenta las siguientes ventajas.

- A. Apto para celíacos: Debido a su bioformulación ActivBioPlus presentará cero gluten, dado que se utilizará solamente almidón de papa como materia prima. En comparación a los excipientes en formulaciones farmacéuticas que en su mayoría utilizan almidón de trigo.
- B. Apto para consumidores intolerantes a la lactosa: ActivBioPlus en su formulación no presentará proteínas proveniente de la leche ni azúcares como la lactosa permitiendo una adecuada digestión en personas con IL.
- C. Bajo índice glicémico: El formulado presentará bajo índice glicémico debido a que las enzimas amilasas no podrán hidrolizar el encapsulado logrando que ActivBioPlus llegue íntegro al intestino grueso siendo incapaz de ser absorbidos por cuerpo. Esto permitirá que personas diabéticas e insulino



resistente puedan consumir el producto sin que sus niveles de glicemia se vean afectadas. En comparación con los productos que se encuentran en el mercado en donde en sus ingredientes o excipientes contienen dextrosas y maltodextrina que son compuestos con alto índice glicémico (Campbell et al., 2018)

D. Almacenamiento: ActivBioPlus se podrá almacenar a temperatura ambiente (25°C) por más de 90 días y en frío por más de 120 días. Esto implicaría que la tasa de viabilidad (99%) de nuestro producto sea óptima permitiendo conservar las propiedades del encapsulado y puedan ser ingeridos sin mayores problemas. Esto representa una ventaja ya que actualmente los productos de la competencia pueden ser almacenados durante 30 días o 60 días como es el caso de los productos lácteos y sus derivados.

E. Tolerancia a condiciones gastrointestinales: Dada su formulación, ActivBioPlus podrá tolerar las condiciones gastrointestinales permitiendo tener una tasa de viabilidad de 99% al llegar al intestino grueso. Esto permitiría tener una tasa de efectividad mayor al 95%

7.4 Descripción de las etapas

Las etapas a seguir para que el producto esté disponible en el mercado son los que se describen a continuación:



- Etapa negociación y comercialización: En esta etapa se definirán los contratos, licencias y paquetes tecnológicos para que ActivBioPlus pueda ser transferido a la empresa y se proceda a la industrialización y escalamiento del producto
- Etapa Redefinición: Etapa en la cual se procederá con la industrialización, escalamiento, certificación de calidad e inocuidad alimentaria. En este punto, el producto podrá ser modificado por la empresa para su adaptación al mercado, se revisaran las normativas vigentes sobre la comercialización de los probióticos tanto en Europa y EEUU como en Chile.
- Etapa de ingeniería del producto: Se procederá con la revisión del diseño del producto y con la predicción de fiabilidad o confiabilidad pudiendo ser simulaciones y analogías de campos, optimización del producto, realización de redundancias y metodologías de taguchi para robustecer el diseño (formulado) de ActivBioPlus. También se procederá a mejoras en la realización de análisis de seguridad del producto. Además en esta etapa se deberá realizar la búsqueda de proveedores y colaboradores.
- Etapa de verificación: Se procederá al testeo del producto-mercado, observando oportunidades y mejoras. Se robustecerá las especificaciones de industrialización en la cadena de suministro. Se realizarán sondeos de comercialización



- Etapa de desarrollo: Redefinición de los costos e inversión para su masificación, escalabilidad, sostenibilidad y sustentabilidad. Se realizarán las estrategias de marketing, comunicación y promoción. Se definirán las redes comerciales tanto canales de distribución como de ventas. Se podrá reacondicionar el producto y servicio de preventa y postventa.
- Etapa de aprovisionamiento: Se desarrollará la planificación de pedidos del producto y la configuración de la red comercial y se realizará el seguimiento y control del producto.
- Etapa de finalización Se realizarán los ajustes necesarios tanto al producto y como al formato final. Se desarrollará el soporte de comercialización (físicos y online).

El tiempo estimado corresponden a un 1,5 año desde la etapa de redefinición.

7.5 Identificación del segmento

El mercado mundial de los probióticos en el año 2018 se estimó en 48.38 billones de US\$ y que para el 2025 se espera un crecimiento aproximado de un 6,9% según el reporte de Gran View Research Inc., publicado en Junio del 2019 y dentro de los probióticos el género Lactobacilo representa el 61.9% en ventas siendo los productos lácteos, yogures y bebidas cultivadas los más consumidos y utilizados por los consumidores



Además, la tendencia a nivel mundial sobre el consumo de productos alimenticios para la salud y bienestar está en crecimiento dado que en el 2013 alcanzó US\$ 190 mil millones con un crecimiento anualizado de un 5% y se prevé inclusive dada la pandemia por Sars-Covid-19 durante este último tiempo podría llegar entre 15 % a un 25% de crecimiento para el 2025. En nuestro país el mercado de los suplementos alimenticios alcanzó en el mismo año (2013) \$51 mil millones con un alza anual de 3,2% en donde se pronostica un crecimiento anualizado hasta el año 2025 entre 10 a un 20% acorde dada el consumo por suplementos que beneficien el sistema inmunológico

El mercado potencial estará determinado principalmente por hombres entre 25 y 45 años y mujeres entre 20 a 65 años, que buscan mejorar el bienestar personal o familiar por medio de productos naturales. Estos se encuentran localizados principalmente en las zonas urbanas de Chile y tienden a pertenecer a los segmentos socioeconómicos ABC1 y C2.

7.6 Identificación de dos o mas empresas asociadas



El Centro de Investigación de Polímeros Avanzados fue creada el 2003 bajo el alero de la Universidad del Biobío, Universidad de Concepción, Gobierno



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

Regional del Biobío y ANID (ex CONICYT). Posee el equipamiento necesario a escala piloto para el desarrollo de ActivBioPlus.

La participación de CIPA en el proyecto estará ligada al escalamiento, ensayos y pruebas de laboratorio permitiendo la mejora continua del producto optimizando la encapsulación, materias primas y el crecimiento del probiótico.



Creada en el año 1988 Analab Chile S.A., es una empresa privada chilena orientada al análisis y certificación de calidad de diversos productos, tanto en la actividad exportadora como en la producción de consumo nacional. Cuenta con la infraestructura, el conocimiento y la experiencia para satisfacer las necesidades analíticas de la industria de alimentos de uso humano y animal, industria de agroquímicos y fertilizantes, de la industria vitivinícola, y de los fabricantes de insumos y aditivos para estos sectores industriales.

La participación de Analab Chile S.A en el proyecto es facilitar la certificación y ensayos de laboratorio que permita obtener una certificación a demostrar ante las autoridades sanitaria sobre el alcance y seguridad de ActivBioPlus



Desde 1892 comprometidos con la salud pública del país





El Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) es un Servicio público, que posee autonomía de gestión y está dotado de personalidad jurídica y de patrimonio propio, dependiendo del Ministerio de Salud para la aprobación de sus políticas, normas y planes generales de actividades, así como en la supervisión de su ejecución.

El ISP participara dentro de nuestro proyecto como ente fiscalizador toxicológico y registro para poder vender en el país



Laboratorio Chile, en sus 121 años de vida, siempre ha estado preocupado de la salud de los chilenos. Es el primer laboratorio que respondió al llamado del Estado para producir y poner a disposición de los chilenos, los productos de primera necesidad a través del formulario nacional. Además, es el mayor productor de medicamentos en Chile, 1 de cada 4 medicamentos que se consumen en el país es elaborado por Laboratorio Chile | Teva. Posee más de 500 trabajadores, se encuentra catalogada como gran empresa y tiene ventas por US\$ 23, 49 mil millones. Es líder en bioequivalencia con más de 180 productos bioequivalentes a disposición de los chilenos, asegurando calidad y acceso a la última tecnología. Cuenta con la más alta calidad y certificación GMP en nuestro país.

La participación de Laboratorios Chile S.A esta centrada en la industrialización, masificación y comercialización mayoritario sobre ActivBioPlus. Para esto la



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

empresa proporcionará la indumentaria y equipamiento junto a sus profesionales para el escalamiento industrial de nuestro prototipo.



Tienda especializada enfocada en el bienestar y la nutrición de las personas, están comprometidos con brindar a cada persona una experiencia y asesoría excepcional, ya que permite acceder a los mejores y más innovadores productos que mejoran la calidad de vida de las personas. Tiene más de 30 tiendas a lo largo de todo Chile. Su participación está vinculada a la venta de producto final en todas sus sucursales partiendo primero en Concepción, luego en Santiago y finalmente su distribución y comercialización a lo largo de todas sus tiendas.



Empresa comercializadora y distribuidora de materias primas naturales y sintéticas pensadas para el área alimentos, farmacéutica, fragancias, veterinarias, envases y contenedores. Presenta importaciones y ventas por más de US\$ 1 millón. Participará en este proyecto como un proveedor de materia prima.



DuPont Nutrition & Biosciences es un líder mundial de soluciones innovadoras y sostenibles en las industrias alimentaria, sanitaria, farmacéutica y biotecnológica. Con más de 10,000 empleados trabajando en ubicaciones alrededor del mundo, enfocados en servir a los clientes a través de la excelencia científica e innovaciones esenciales y sostenibles. Son líderes en innovación, basados en una sólida percepción del consumidor y del mercado, con un conocimiento profundo de la mejor ciencia y una de las carteras más amplias de la industria. Dupont participará del proyecto como un proveedor de los probióticos siendo un aliado estratégico importante.

7.7 Descripción de la estrategia de masificación

Se realizará una alianza estratégica entre la Universidad San Sebastián (USS) y el Centro de investigación de polímeros avanzados (CIPA) para el desarrollo de la tecnología en la fase de experimentación.

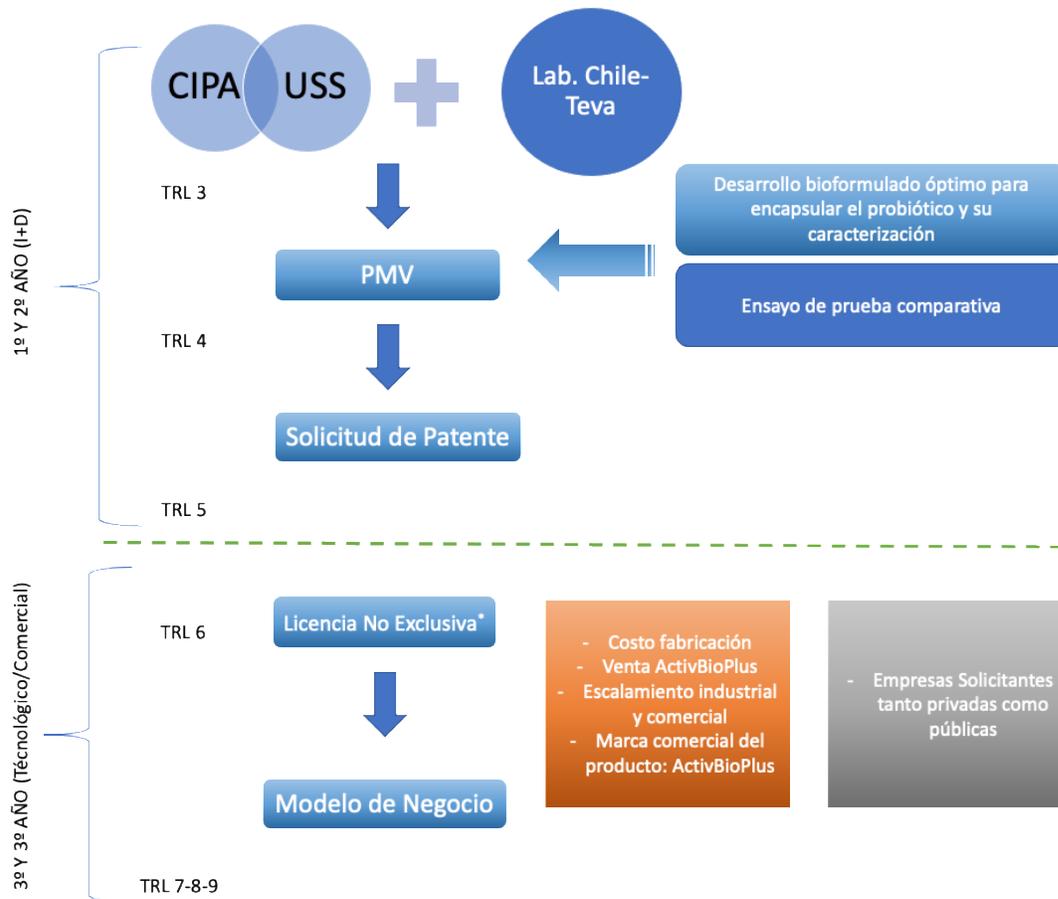
CIPA facilitará su experticia en ayudar en el desarrollo de las pruebas pilotos y en el rediseño del producto en conjunto con la USS. Además la USS apoyará con su staff de especialistas encargados en la estandarización, diseño y pruebas pilotos del producto

Tras obtener el producto mínimo viable (PMV) durante la ejecución del proyecto las beneficiarias del proyecto realizarán los estudios de patentabilidad ante INAPI o bien



se determinara por solicitar una PCT como estrategia de patentamiento. Los titulares estarán compuesta por la USS, CIPA en primer lugar o bien se adicionara a la titularidad a Laboratorio Chile-Teva de acuerdo al contrato establecido ante las instituciones. Por lo cual se registrará un acuerdo mediante co-propiedad, que defina los porcentaje de participación, así como la administración y gestión que hacen referencia a dichos derechos y/o acuerdos contractuales. Las oficinas de transferencia y licenciamiento pertinentes de la USS-OTL, CIPA y si corresponde al área de patente de laboratorio Chile-Teva serán las encargadas de administrar y gestionar los derechos de propiedad intelectual tanto en Chile como en el extranjero si así concuerdan como pueden observar en la Figura 7.2.

USS y CIPA levantarán capital por medio de fuentes estatales y privados para los avances preliminares y futuros con la finalidad de llevar acabo los ensayos de escalamiento y estudios necesarios para culminar las validaciones pertinentes.



*Puede ser que sea exclusiva si Laboratorio Chile-Teva participa como entidad solicitante de titularidad de patente

Figura 7.2: Modelo representativo de la transferencia tecnológica

7.8 Viabilidad económica

Los egresos se desglosaron en dos, directos e indirectos de modo de determinar y analizar los costos que se pueden producir durante el proyecto siendo estos los siguientes:

- Egresos Directos

Están relacionados de manera directa con la capacidad de producción pudiendo sufrir modificaciones tanto en crecimiento como en disminución dado que están



ligados con la demanda. Esto hace referencia a los costos relacionados con la compra de materias primas y certificados de calidad (Tabla 7.2).

Tabla 7.2: Egresos directos de ActivBioPlus

Costo	Ítem	Sub ítem	Cantidad	Unidad	Costo Unitario (USD)
Directo	Materia Prima	Almidón	100	Kg	20
		Pectina	150	Kg	41
		Nanocelulosa	50	Kg	100
		Cloruro de Calcio	50	Kg	5
		Medio MRS	40	Kg	200
		Probiótico	10	Kg	16
	Certificados de Calidad	Laboratorio ETFA	20	Unidad	1021,8

Fuente: Elaboración propia

Materias Primas y Certificado de Calidad

El costo de las materias primas para la producción de ActivBioPlus están ligadas a un contrato de 5 años sin reajuste por parte del proveedor, en donde para mantener el precio durante toda la vigencia del proyecto se deben realizar compras acordes a las cantidades establecidas en la Tabla 7.2.

Con respecto al certificado de calidad e inocuidad que será emitido por el laboratorio ETFA se establecerá un contrato a 5 años sin reajuste por parte del proveedor si se mantiene como mínimo la cantidad evidenciada en la Tabla 7.2

- Egresos Indirectos

Los egresos indirectos están relacionados de forma indirecta con la producción,



siendo estos las remuneraciones, arriendo y marketing (Tabla 7.3).

Tabla 7.3: Egresos indirectos de ActivBioPlus

Costo	Ítem	Sub ítem	Cantidad	Unidad	Costo Unitario (U\$D)
Indirecto	Arriendo	Maquinaria y Terreno	12	Mes	2100
	Remuneración	Líder Proyecto	12	Mes	2452,32
		Profesional	12	Mes	2082,4
		Técnico	12	Mes	1771,12
		Otros	12	Mes	780,45
	Marketing y Difusión	Marketing	6	Anual	1362,4

Fuente: Elaboración propia

Arriendo

Corresponde al valor de arrendamiento de la dependencia de CIPA incluyendo el uso de equipamiento de laboratorio y de los equipos a escala piloto. Este convenio con el centro de investigación tiene un plazo de 5 años.

Remuneraciones

La remuneración de los colaboradores tendrá carácter definido mientras dure el proyecto y contra boleta de honorarios válida para el SII. Las retenciones pertinentes quedarán a cargo de la empresa quien velara que los pagos sean de forma de vale vista o transferencia electrónica de acuerdo mutuo con el colaborador. Y se realizarán en un plazo no superior a los primeros 5 días de cada mes



Marketing

El servicio de marketing constará de publicaciones en diario de circulación tanto regional como nacional, en redes sociales y eventos que permitan dar a conocer el producto ActivBioPlus a las empresas y personas.

- Ingresos

Existen actualmente en nuestro país 4,833,412 personas segmentadas en el estrato socioeconómico ABC1 y C2 representando el 25% del total de la población en Chile, por tanto, se espera poder llegar al segundo mes de funcionamiento al menos al 0,25% del segmento mencionado anteriormente. Cada año de funcionamiento se espera un incremento en la demanda en un 50% con respecto al año anterior durante los 5 años de funcionamiento del proyecto.

En la Tabla 7.4 se muestran los ingresos esperados por cantidad vendida durante el funcionamiento del proyecto.

Tabla 7.4: Ingresos esperados por año en ejercicio según cantidad y precio de venta

Concepto /Año	0	1	2	3	4	5
Cantidad Venta	12.084	18.125	27.188	40.782	61.173	91.759
Precio Venta (Sin IVA)	\$7.555,00	\$7.555,00	\$7.555,00	\$7.555,00	\$7.555,00	\$7.555,00
Total CLP	\$91.291.069,15	\$136.936.603,73	\$205.404.905,59	\$308.107.358,38	\$462.161.037,57	\$693.241.556,36
Total USD	\$124.375	\$186.562	\$279.843	\$419.765	\$629.647	\$944.471

Fuente: Elaboración propia



En la Tabla 7.5 se muestra el flujo de caja correspondiente a los 5 años de funcionamiento del proyecto dando a conocer una proyección de la utilidad generada durante ese periodo de tiempo. Se obtuvo un VAN (30%) de \$85.947,89 USD con un TIR de 140%, ROI de 528% y un payback de 2.97 años. Sugiriendo que el proyecto es rentable cuando el precio de venta es de \$7,555 (sin IVA).

Tabla 7.5: Flujo de caja de ActivBioPlus durante los 5 años del proyecto

Concepto / Años	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Ingresos	\$124,375	\$186,562	\$279,843	\$419,765	\$629,647	\$944,471
Costos Directos	\$41,996	\$42,153	\$42,315	\$42,483	\$42,661	\$42,852
Costos Indirectos	\$118,410	\$124,330	\$130,547	\$137,074	\$143,928	\$151,124
Imprevistos (5%)	\$6,219	\$9,328	\$13,992	\$20,988	\$31,482	\$47,224
Inversión	\$160,406	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Utilidad antes de impuesto	-\$42,250	\$10,750	\$92,989	\$219,219	\$411,576	\$703,271
Impuesto (27%)	\$0	\$2,903	\$25,107	\$59,189	\$111,126	\$189,883
Utilidad después de impuesto	-\$42,250	\$7,848	\$67,882	\$160,030	\$300,450	\$513,388
Flujo de caja acumulado	-\$42,250	-\$34,402	\$33,480	\$193,509	\$493,960	\$1,007,347

Fuente: Elaboración propia

Se realizó un análisis de sensibilidad al flujo de caja, reduciendo el precio de venta en un 5%, y una disminución de un 13,73 % en los clientes. Se detectó que al disminuir el precio de venta se obtiene un VAN (30%) de -\$ 88,36 una TIR de 89%, ROI de 370% al final del periodo y un payback de 3,345 años (Tabla 7.6).



Tabla 7.6: Flujo caja al reducir el precio de venta en un 13,73% de ActivBioPlus

Concepto / Años	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Ingresos	\$107,303	\$160,955	\$241,432	\$362,148	\$543.,22	\$814,833
Costos Directos	\$41,996	\$42,153	\$42,315	\$42,483	\$42,661	\$42,852
Costos Indirectos	\$118,410	\$12.,330	\$130,547	\$137,074	\$143,928	\$151,124
Imprevistos (5%)	\$5,365	\$8,048	\$12.,72	\$18,107	\$27,161	\$40,742
Inversión	\$160,406	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Utilidad antes de impuesto	-\$58,468	-\$13,577	\$56,498	\$164,483	\$329,472	\$580,114
Impuesto (27%)	\$0	\$0	\$15,254	\$44,410	\$88,957	\$156,631
Utilidad después de impuesto	-\$58,468	-\$13,577	\$41,244	\$120,072	\$240,514	\$423,483
Flujo de caja acumulado	-\$58,468	-\$72,045	-\$30,801	\$89,271	\$329,785	\$753,269

Fuente: Elaboración propia

En cambio, al disminuir en un 13.72% el número de clientes objetivos se obtuvo un VAN (30%) de -\$48.35 USD, un TIR del 89%, un ROI del 370% y un payback a los 2,47 años. Lo que indicaría que las variables número de cliente y el precio de venta son importantes en la variación del flujo de caja, por tanto, se debe tener en cuenta que al menos el precio de venta debe estar como mínimo en \$6,520 y abarcar al menos el 0,25% del segmento de clientes.

Capítulo 8 Conclusiones

Los probióticos aportan grandes beneficios a la salud humana, además de mejorar el valor nutricional de los alimentos. La principal vía para aumentar la viabilidad de los microorganismos probióticos es la encapsulación a través de técnicas químicas y/o físicas que, además, de favorecer la estabilidad frente a factores adversos,



condiciona, según sus características, su aplicación e incorporación en matrices alimentarias de distintas calidades.

La combinación de matrices compuestas de dos polisacáridos y /o polisacárido/no polisacárido proporciona un efecto sinérgico en las propiedades de los encapsulados, favoreciendo la viabilidad del encapsulado y mejorando la protección contra condiciones extremas a diferencia de aquellas matrices basadas solamente en un polisacárido.

El sistema basado en pectina /almidón /nanocelulosa presenta una alternativa viable y económica de encapsulación de probióticos con alta viabilidad y capacidad prebiótica e inmunoestimulante. Además, permitió dar una mayor aproximación para ser utilizada en ingredientes para consumo masivo.

La vigilancia tecnología demostró ser una buena herramienta tecnológica para obtener información nueva permitiendo así una rápida toma de decisiones futuras.

La metodología del Design Thinking permitió el desarrollo del proceso creativo de este proyecto lo cual conlleva a la utilización del Business Model Canvas como modelo de negocio y la transferencia tecnológica como estrategia de negocio.

La evaluación económica determinó la viabilidad de ActivBioPlus propuesto dando positivo para su realización y aceptación, pero es crucial la captación de clientes al inicio del proyecto, mantenerlos durante todo el periodo propuesto como también aumentar el número de cliente por año. Otra variable a tener en cuenta es el precio de entrada dado que bajo los \$6,520 CLP el proyecto será rechazado.



Capítulo 9 Referencias

Accinelli, R. A., Herrera, S., Canales, Y., & López, L. M. (2017). Malabsorción de lactosa en adolescentes de un club de fútbol. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(4), 755.

<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.344.3037>

Agudelo, A., Varela, P., Sanz, T., & Fiszman, S. M. (2014). Native tapioca starch as a potential thickener for fruit fillings. Evaluation of mixed models containing low-methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 35, 297–304.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.004>

Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>

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(4), 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>

Chávarri, M., Marañón, I., & Villarán, M. C. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. *Probiotics*. <https://doi.org/10.5772/50046>

Chotiko, A., & Sathivel, S. (2016). Three protective agents for pectin-rice bran capsules for encapsulating *Lactobacillus plantarum*. *Food Bioscience*, 16, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.10.001>



- Comunian, T. A., Thomazini, M., Alves, A. J. G., de Matos Junior, F. E., de Carvalho Balieiro, J. C., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. *Food Research International*, *52*(1), 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.028>
- Cruz, A. G., Antunes, A. E. C., Sousa, A. L. O. P., Faria, J. A. F., & Saad, S. M. I. (2009). Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, *42*(9), 1233–1239. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.020>
- Cruz-Benítez, M. M., Gómez-Aldapa, C. A., Castro-Rosas, J., Hernández-Hernández, E., Gómez-Hernández, E., & Fonseca-Florido, H. A. (2019). Effect of amylose content and chemical modification of cassava starch on the microencapsulation of *Lactobacillus pentosus*. *LWT*, *105*, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.069>
- d’Ettorre, G., Ceccarelli, G., Giustini, N., Serafino, S., Calantone, N., Girolamo, G. D., Bianchi, L., Bellelli, V., Ascoli-Bartoli, T., Marcellini, S., Turriziani, O., Brenchley, J. M., & Vullo, V. (2015). Probiotics Reduce Inflammation in Antiretroviral Treated, HIV-Infected Individuals: Results of the “Probio-HIV” Clinical Trial. *PLOS ONE*, *10*(9), e0137200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137200>
- da Silva, T. M., de Deus, C., de Souza Fonseca, B., Lopes, E. J., Cichoski, A. J., Esmerino, E. A., de Bona da Silva, C., Muller, E. I., Moraes Flores, E. M., & de Menezes, C. R. (2019). The effect of enzymatic crosslinking on the viability of probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus*) encapsulated by complex coacervation. *Food Research International*, *125*, 108577. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108577>



- Dafe, A., Etemadi, H., Dilmaghani, A., & Mahdavinia, G. R. (2017). Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.060>
- De Castro-Cislaghi, F. P., Silva, C. D. R. E., Fritzen-Freire, C. B., Lorenz, J. G., & Sant'Anna, E. S. (2012). Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, 113(2), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.006>
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>
- de Vrese, M., Rautenberg, P., Laue, C., Koopmans, M., Herremans, T., & Schrezenmeir, J. (2005). Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. *European Journal of Nutrition*, 44(7), 406–413. <https://doi.org/10.1007/s00394-004-0541-8>
- Dokoohaki, Z. N., Sekhavatizadeh, S. S., & Hosseinzadeh, S. (2019). Dairy dessert containing microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) with quince seed mucilage as a coating material. *LWT*, 115, 108429. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108429>
- El-Sayed, H. S., Salama, H. H., & Edris, A. E. (2020). Survival of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 in spray dried functional yogurt powder during processing and



storage. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(7), 461–467.

<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.08.003>

Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T. R., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. P. (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. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.037>

Espitia, P. J. P., Batista, R. A., Azeredo, H. M. C., & Otoni, C. G. (2016). Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International*, 90, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.026>

Etchepare, M. de A., Raddatz, G. C., Cichoski, A. J., Flores, É. M. M., Barin, J. S., Queiroz Zepka, L., Jacob-Lopes, E., Grosso, C. R. F., & de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *Journal of Functional Foods*, 21, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.025>

Fernandes Pereira, A. L., & Rodrigues, S. (2018). Chapter 15—Turning Fruit Juice Into Probiotic Beverages. In G. Rajauria & B. K. Tiwari (Eds.), *Fruit Juices* (pp. 279–287). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00015-1>

Fernandez-Gutierrez, M. M., Roosjen, P. P. J., Ultee, E., Agelink, M., Vervoort, J. J. M., Keijser, B., Wells, J. M., & Kleerebezem, M. (2017). *Streptococcus salivarius* MS-oral-D6 promotes gingival re-epithelialization in vitro through a secreted serine protease. *Scientific Reports*, 7(1), 11100. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11446-z>

Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Health Organization (Eds.). (2006). *Probiotics in food: Health and nutritional properties and*



guidelines for evaluation. Food and Agriculture Organization of the United Nations :
World Health Organization. <http://www.fao.org/publications/card/en/c/7c102d95-2fd5-5b22-8faf-f0b2e68dfbb6>

Frakolaki, G., Katsouli, M., Giannou, V., & Tzia, C. (2020). Novel encapsulation approach for Bifidobacterium subsp. Lactis (BB-12) viability enhancement through its incorporation into a double emulsion prior to the extrusion process. *LWT*, 130, 109671. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109671>

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(1), 365–378.

Gaon, D., Garcia, H., Winter, L., Rodriguez, N., Quintas, R., Gonzalez, S. N., & Oliver, G. (2003). EFFECT OF LACTOBACILLUS STRAINS AND SACCHAROMYCES BOULARDII ON PERSISTENT DIARRHEA IN CHILDREN. *Medicina (Buenos Aires)*, 63(2), 293–298.

Gaon, D., Garmendia, C., Murrielo, N. O., de Cucco Games, A., Cerchio, A., Quintas, R., González, S. N., & Oliver, G. (2002). Effect of Lactobacillus strains (L. casei and L. Acidophilus Strains cerela) on bacterial overgrowth-related chronic diarrhea. *Medicina*, 62(2), 159–163.

García-Ceja, A., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.071>



Gawkowska, D., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2018). Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review. *Polymers*, 10(7).

<https://doi.org/10.3390/polym10070762>

Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012). Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. *Pharmaceutics*, 4(1), 149–163.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics4010149>

Gbassi, G. K., Vandamme, T., Yolou, F. S., & Marchioni, E. (2011). In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *International Dairy Journal*, 21(2), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.09.006>

<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.09.006>

Gebara, C., Chaves, K. S., Ribeiro, M. C. E., Souza, F. N., Grosso, C. R. F., & Gigante, M. L. (2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 51(2), 872–878.

Food Research International, 51(2), 872–878.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.008>

Ghobashy, M. M., Abd El-Wahab, H., Ismail, M. A., Naser, A. M., Abdelhai, F., El-Damhougy, B. Kh., Nady, N., Meganid, A. S., & Alkhursani, S. A. (2020).

Characterization of Starch-based three components of gamma-ray cross-linked hydrogels to be used as a soil conditioner. *Materials Science and Engineering: B*, 260, 114645. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2020.114645>

<https://doi.org/10.1016/j.mseb.2020.114645>

Girija, A. R., & Sakthi Kumar, D. (2016). Novel paradigm of design and delivery of nutraceuticals with nanoscience and technology. In *Nutraceuticals* (pp. 343–385).

Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804305-9.00010-5>



- Gomes da Cruz, A., Alonso Buriti, F. C., Batista de Souza, C. H., Fonseca Faria, J. A., & Isay Saad, S. M. (2009). Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20(8), 344–354. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.001>
- González, K., García-Astrain, C., Santamaria-Echart, A., Ugarte, L., Avérous, L., Eceiza, A., & Gabilondo, N. (2018). Starch/graphene hydrogels via click chemistry with relevant electrical and antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, 202, 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.007>
- González, K., Guaresti, O., Palomares, T., Alonso-Varona, A., Eceiza, A., & Gabilondo, N. (2020). The role of cellulose nanocrystals in biocompatible starch-based clicked nanocomposite hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.050>
- Grand View Research. (n.d.). *Probiotics Market Size, Share, Research Report, 2019-2025* [Market analysis report]. Probiotic Market Size, Share & Trends Analysis Report by Product, by Ingredient, by End Use, by Distribution Channel, and Segment Forecasts, 2019-2025. Retrieved January 14, 2021, from <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/probiotics-market>
- Greene, J. D., & Klaenhammer, T. R. (1994). Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4487–4494.
- Guo, Liu, Zhan, & Wu, L. (2005). Preparation and Properties of a Slow-Release Membrane-Encapsulated Urea Fertilizer with Superabsorbent and Moisture Preservation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44(12), 4206–4211. <https://doi.org/10.1021/ie0489406>



Gutiérrez-Zamorano, C., González-Ávila, M., Díaz-Blas, G., Smith, C. T., González-Correa, C., & García-Cancino, A. (2019). Increased anti-*Helicobacter pylori* effect of the probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain encapsulated in carrageenan evaluated in gastric simulations under fasting conditions. *Food Research International*, 121, 812–816.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.064>

Guyonnet, D., Chassany, O., Ducrotte, P., Picard, C., Mouret, M., Mercier, C.-H., & Matuchansky, C. (2007). Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: A multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(3), 475–486.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03362.x>

Haffner, F. B., Diab, R., & Pasc, A. (2016). Encapsulation of probiotics: Insights into academic and industrial approaches. *Materials 2016*, Vol. 3, Pages 114-136.

<https://doi.org/10.3934/matersci.2016.1.114>

Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1638–1649.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.002>

Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of β -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.05.005>



- Hennink, W. E., & van Nostrum, C. F. (2002). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *54*(1), 13–36. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00240-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00240-X)
- Hernández-López, Z., Rangel-Vargas, E., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Cadena-Ramírez, A., Acevedo-Sandoval, O. A., Gordillo-Martínez, A. J., & Falfán-Cortés, R. N. (2018). Optimization of a spray-drying process for the production of maximally viable microencapsulated *Lactobacillus pentosus* using a mixture of starch-pulque as wall material. *LWT*, *95*, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.075>
- Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D. J., & Vernon-Carter, E. J. (2014). *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate: κ-carrageenan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, *36*, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.018>
- Hoare, T. R., & Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, *49*(8), 1993–2007. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.01.027>
- Hu, J., Zhang, L., Lin, W., Tang, W., Chan, F. K. L., & Ng, S. C. (2021). Review article: Probiotics, prebiotics and dietary approaches during COVID-19 pandemic. *Trends in Food Science & Technology*, *108*, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.009>
- Huang, G.-Q., Sun, Y.-T., Xiao, J.-X., & Yang, J. (2012). Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry*, *135*(2), 534–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.140>
- Huertas, R. A. P. (2010). *Revisión: Microencapsulación de Alimentos*. *63*, 16.



- Huq, T., Frascini, C., Khan, A., Riedl, B., Bouchard, J., & Lacroix, M. (2017). Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. *Carbohydrate Polymers*, 168, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.032>
- Ismail, H., Irani, M., & Ahmad, Z. (2013). Starch-Based Hydrogels: Present Status and Applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62(7), 411–420. <https://doi.org/10.1080/00914037.2012.719141>
- Jackson, J. K., Letchford, K., Wasserman, B. Z., Ye, L., Hamad, W. Y., & Burt, H. M. (2011). The use of nanocrystalline cellulose for the binding and controlled release of drugs. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 321–330. <https://doi.org/10.2147/IJN.S16749>
- James, A., & Wang, Y. (2019). Characterization, health benefits and applications of fruits and vegetable probiotics. *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 770–780. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1652693>
- Jang, W. J., Choi, S.-Y., Lee, J. M., Lee, G. H., Hasan, M. T., & Kong, I.-S. (2019). Viability of *Lactobacillus plantarum* encapsulated with poly- γ -glutamic acid produced by *Bacillus* sp. SJ-10 during freeze-drying and in an in vitro gastrointestinal model. *LWT*, 112, 108222. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.120>
- Jayani, T., Sanjeev, B., Marimuthu, S., & Uthandi, S. (2020). Bacterial Cellulose Nano Fiber (BCNF) as carrier support for the immobilization of probiotic, *Lactobacillus acidophilus* 016. *Carbohydrate Polymers*, 250, 116965. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116965>



Jenkins, A. D., Kratochvíl, P., Stepto, R. F. T., & Suter, U. W. (1996). Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry*, 68(12), 2287–2311. <https://doi.org/10.1351/pac199668122287>

Johnson, R. K., Zink-Sharp, A., Renneckar, S. H., & Glasser, W. G. (2009). A new bio-based nanocomposite: Fibrillated TEMPO-oxidized celluloses in hydroxypropylcellulose matrix. *Cellulose*, 16(2), 227–238. <https://doi.org/10.1007/s10570-008-9269-6>

Karimian, A., Parsian, H., Majidinia, M., Rahimi, M., Mir, S. M., Samadi Kafil, H., Shafiei-Irannejad, V., Kheyrollah, M., Ostadi, H., & Yousefi, B. (2019). Nanocrystalline cellulose: Preparation, physicochemical properties, and applications in drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 850–859. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.117>

Kaşgöz, H., Kaşgöz, A., Şahin, Ü., Temelli, T. Y., & Bayat, C. (2006). Hydrogels with Acid Groups for Removal of Copper(II) and Lead(II) Ions. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 45(1), 117–124. <https://doi.org/10.1080/03602550500373691>

Katsoulos, C., Karageorgiadis, L., Vasileiou, N., Mousafeiropoulos, T., & Asimellis, G. (2009). Customized hydrogel contact lenses for keratoconus incorporating correction for vertical coma aberration. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 29(3), 321–329. <https://doi.org/10.1111/j.1475-1313.2009.00645.x>

Keivani Nahr, F., Mokarram, R. R., Hejazi, M. A., Ghanbarzadeh, B., Sowti Khiyabani, M., & Zoroufchi Benis, K. (2015a). Optimization of the nanocellulose based cryoprotective medium to enhance the viability of freeze dried *Lactobacillus*



plantarum using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.004>

Keivani Nahr, F., Mokarram, R. R., Hejazi, M. A., Ghanbarzadeh, B., Sowti Khiyabani, M., & Zoroufchi Benis, K. (2015b). Optimization of the nanocellulose based cryoprotective medium to enhance the viability of freeze dried *Lactobacillus plantarum* using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.004>

Kim, J. U., Kim, B., Shahbaz, H. M., Lee, S. H., Park, D., & Park, J. (2017). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by ionic gelation with electrostatic extrusion for enhancement of survival under simulated gastric conditions and during refrigerated storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 519–530. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13308>

Kim, S. J., Shin, S. R., Kim, N. G., & Kim, S. I. (2005). Swelling Behavior of Semi-Interpenetrating Polymer Network Hydrogels Based on Chitosan and Poly(acrylamide). *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 42(8), 1073–1083. <https://doi.org/10.1081/MA-200065934>

Klein, A., Friedrich, U., Vogelsang, H., & Jahreis, G. (2008). *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62(5), 584–593. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602761>

Kok, J., van Gijtenbeek, L. A., de Jong, A., van der Meulen, S. B., Solopova, A., & Kuipers, O. P. (2017). The Evolution of gene regulation research in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1), S220–S243. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux028>



- Konar, N., Toker, O. S., Oba, S., & Sagdic, O. (2016). Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. *Trends in Food Science & Technology*, *49*, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.002>
- Kos, T., Anžlovar, A., Kunaver, M., Huskić, M., & Žagar, E. (2014). Fast preparation of nanocrystalline cellulose by microwave-assisted hydrolysis. *Cellulose*, *21*(4), 2579–2585. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0315-2>
- Kwiecień, I., & Kwiecień, M. (2018). Application of Polysaccharide-Based Hydrogels as Probiotic Delivery Systems. *Gels*, *4*(2). <https://doi.org/10.3390/gels4020047>
- Le Maréchal, C., Peton, V., Plé, C., Vroland, C., Jardin, J., Briard-Bion, V., Durant, G., Chuat, V., Loux, V., Foligné, B., Deutsch, S.-M., Falentin, H., & Jan, G. (2015). Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties. *Journal of Proteomics*, *113*, 447–461. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.018>
- Lebeer, S., Bron, P. A., Marco, M. L., Van Pijkeren, J.-P., O'Connell Motherway, M., Hill, C., Pot, B., Roos, S., & Klaenhammer, T. (2018a). Identification of probiotic effector molecules: Present state and future perspectives. *Current Opinion in Biotechnology*, *49*, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.007>
- Lebeer, S., Bron, P. A., Marco, M. L., Van Pijkeren, J.-P., O'Connell Motherway, M., Hill, C., Pot, B., Roos, S., & Klaenhammer, T. (2018b). Identification of probiotic effector molecules: Present state and future perspectives. *Current Opinion in Biotechnology*, *49*, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.007>
- Lee, Y.-J., & Braun, P. V. (2003). Tunable Inverse Opal Hydrogel pH Sensors. *Advanced Materials*, *15*(78), 563–566. <https://doi.org/10.1002/adma.200304588>



Lei, M., Jiang, F.-C., Cai, J., Hu, S., Zhou, R., Liu, G., Wang, Y.-H., Wang, H.-B., He, J.-R., & Xiong, X.-G. (2018). Facile microencapsulation of olive oil in porous starch granules: Fabrication, characterization, and oxidative stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 755–761.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.051>

Leylak, C., Özdemir, K. S., Gurakan, G. C., & Ogel, Z. B. (2021). Optimisation of spray drying parameters for *Lactobacillus acidophilus* encapsulation in whey and gum Arabic: Its application in yoghurt. *International Dairy Journal*, 112, 104865.

<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104865>

Li, A., Zhang, J., & Wang, A. (2007). Utilization of starch and clay for the preparation of superabsorbent composite. *Bioresource Technology*, 98(2), 327–332.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.026>

Li, J., & Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews. Materials*, 1(12). <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>

Li, J., Wei, X., Wang, Q., Chen, J., Chang, G., Kong, L., Su, J., & Liu, Y. (2012). Homogeneous isolation of nanocellulose from sugarcane bagasse by high pressure homogenization. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1609–1613.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.038>

Li, M., Jin, Y., Wang, Y., Meng, L., Zhang, N., Sun, Y., Hao, J., Fu, Q., & Sun, Q. (2019). Preparation of *Bifidobacterium breve* encapsulated in low methoxyl pectin beads and its effects on yogurt quality. *Journal of Dairy Science*, 102(6), 4832–4843.

<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15597>



Lim, H. L., Hwang, Y., Kar, M., & Varghese, S. (2014). Smart hydrogels as functional biomimetic systems. *Biomater. Sci.*, 2(5), 603–618.

<https://doi.org/10.1039/C3BM60288E>

Lin, N., & Dufresne, A. (2014). Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal*, 59, 302–325.

<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>

Liu, H., Xie, M., & Nie, S. (2020). Recent trends and applications of polysaccharides for microencapsulation of probiotics. *Food Frontiers*, 1(1), 45–59.

<https://doi.org/10.1002/fft2.11>

Liu, J., Li, Q., Su, Y., Yue, Q., Gao, B., & Wang, R. (2013). Synthesis of wheat straw cellulose-g-poly (potassium acrylate)/PVA semi-IPNs superabsorbent resin.

Carbohydrate Polymers, 94(1), 539–546.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.089>

Luan, Q., Zhou, W., Zhang, H., Bao, Y., Zheng, M., Shi, J., Tang, H., & Huang, F. (2018). Cellulose-Based Composite Macrogels from Cellulose Fiber and Cellulose Nanofiber as Intestine Delivery Vehicles for Probiotics.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66(1), 339–345. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04754>

M, V., & G, P. (2011). Introduction to the special issue “Probiotic bacteria and human gut microbiota”. *Genes & Nutrition*, 6(3), 203–204. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0241-y>

Ma, L., Shang, Y., Zhu, Y., Zhang, X., E, J., Zhao, L., & Wang, J. (2020). Study on microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 by emulsification method.

Journal of Food Process Engineering, 43(8), e13437.

<https://doi.org/10.1111/jfpe.13437>



Ma, S., Yu, B., Pei, X., & Zhou, F. (2016). Structural hydrogels. *Polymer*, 98, 516–535. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.06.053>

Ma, Z., Li, Q., Yue, Q., Gao, B., Xu, X., & Zhong, Q. (2011). Synthesis and characterization of a novel super-absorbent based on wheat straw. *Bioresource Technology*, 102(3), 2853–2858. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.072>

Ma, Z.-H., Yu, D.-G., Branford-White, C. J., Nie, H.-L., Fan, Z.-X., & Zhu, L.-M. (2009). Microencapsulation of tamoxifen: Application to cotton fabric. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69(1), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.11.005>

Mahmoud, M., Abdallah, N. A., El-Shafei, K., Tawfik, N. F., & El-Sayed, H. S. (2020). Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Heliyon*, 6(3), e03541. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03541>

Mandal, A., & Chakrabarty, D. (2011). Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1291–1299. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.030>

Mandal, S., Puniya, A. K., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16(10), 1190–1195. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.005>

Mao, Y., Li, P., Yin, J., Bai, Y., Zhou, H., Lin, X., Yang, H., & Yang, L. (2020). Starch-based adhesive hydrogel with gel-point viscoelastic behavior and its application in wound sealing and hemostasis. *Journal of Materials Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.02.071>



Marco, M. L., Pavan, S., & Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.005>

Marques da Silva, T., Sonza Pinto, V., Ramires Fonseca Soares, V., Marotz, D., Cichoski, A. J., Queiroz Zepka, L., Jacob Lopes, E., de Bona da Silva, C., & de Menezes, C. R. (2021a). Viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* by complex coacervation associated with enzymatic crosslinking under application in different fruit juices. *Food Research International*, 141, 110190. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110190>

Marques da Silva, T., Sonza Pinto, V., Ramires Fonseca Soares, V., Marotz, D., Cichoski, A. J., Queiroz Zepka, L., Jacob Lopes, E., de Bona da Silva, C., & de Menezes, C. R. (2021b). Viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* by complex coacervation associated with enzymatic crosslinking under application in different fruit juices. *Food Research International*, 141, 110190. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110190>

Marteau, P., Cuillerier, E., Meance, S., Gerhardt, M. F., Myara, A., Bouvier, M., Bouley, C., Tondu, F., Bommelaer, G., & Grimaud, J. C. (2002). *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: A double-blind, randomized, controlled study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16(3), 587–593. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2002.01188.x>

Martin, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.019>



- Martín, R., Martín, R., Chain, F., Chain, F., Miquel, S., Miquel, S., Natividad, J. M., Natividad, J. M., Sokol, H., Sokol, H., Verdu, E. F., Verdu, E. F., Langella, P., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2014). Effects in the use of a genetically engineered strain of *Lactococcus lactis* delivering in situ IL-10 as a therapy to treat low-grade colon inflammation. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *10*(6), 1611–1621. <https://doi.org/10.4161/hv.28549>
- Meneguín, A. B., Ferreira Cury, B. S., dos Santos, A. M., Franco, D. F., Barud, H. S., & da Silva Filho, E. C. (2017). Resistant starch/pectin free-standing films reinforced with nanocellulose intended for colonic methotrexate release. *Carbohydrate Polymers*, *157*, 1013–1023. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.062>
- Menezes, M. F. da S. C. de, Silva, T. M. da, Etchepare, M. de A., Fonseca, B. de S., Souza, V. P., Codevilla, C. F., Barin, J. S., Silva, C. de B. da, Menezes, C. R. de, Menezes, M. F. da S. C. de, Silva, T. M. da, Etchepare, M. de A., Fonseca, B. de S., Souza, V. P., Codevilla, C. F., Barin, J. S., Silva, C. de B. da, & Menezes, C. R. de. (2019). Improvement of the viability of probiotics (*Lactobacillus acidophilus*) by multilayer encapsulation. *Ciência Rural*, *49*(9). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20181020>
- Meng, R., Wu, Z., Xie, H.-Q., Xu, G.-X., Cheng, J.-S., & Zhang, B. (2020). Preparation, characterization, and encapsulation capability of the hydrogel cross-linked by esterified tapioca starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, *155*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.141>
- Mettu, S., Hathi, Z., Athukoralalage, S., Priya, A., Lam, T. N., Ong, K. L., Choudhury, N. R., Dutta, N. K., Curvello, R., Garnier, G., & Lin, C. S. K. (2021a). Perspective on



Constructing Cellulose-Hydrogel-Based Gut-Like Bioreactors for Growth and Delivery of Multiple-Strain Probiotic Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(17), 4946–4959. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00468>

Mettu, S., Hathi, Z., Athukoralalage, S., Priya, A., Lam, T. N., Ong, K. L., Choudhury, N. R., Dutta, N. K., Curvello, R., Garnier, G., & Lin, C. S. K. (2021b). Perspective on Constructing Cellulose-Hydrogel-Based Gut-Like Bioreactors for Growth and Delivery of Multiple-Strain Probiotic Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(17), 4946–4959. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00468>

Miquel, S., Beaumont, M., Martín, R., Langella, P., Braesco, V., & Thomas, M. (2015). A proposed framework for an appropriate evaluation scheme for microorganisms as novel foods with a health claim in Europe. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0229-1>

Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L., Chatel, J., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J., & Langella, P. (2013). Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Current Opinion in Microbiology*, 16(3), 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.003>

Moayyedi, M., Eskandari, M. H., Rad, A. H. E., Ziaee, E., Khodaparast, M. H. H., & Golmakani, M.-T. (2018). Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469. *Journal of Functional Foods*, 40, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.016>

Mohammadinejad, R., Maleki, H., Larrañeta, E., Fajardo, A. R., Nik, A. B., Shavandi, A., Sheikhi, A., Ghorbanpour, M., Farokhi, M., Govindh, P., Cabane, E., Azizi, S., Aref, A. R., Mozafari, M., Mehrali, M., Thomas, S., Mano, J. F., Mishra, Y. K., &



Thakur, V. K. (2019). Status and future scope of plant-based green hydrogels in biomedical engineering. *Applied Materials Today*, 16, 213–246.

<https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.04.010>

Mostafa, H. S., Ali, M. R., Mohamed, R. M., Mostafa, H. S., Ali, M. R., & Mohamed, R. M. (2020). Production of a novel probiotic date juice with anti-proliferative activity against Hep-2 cancer cells. *Food Science and Technology, AHEAD*.

<https://doi.org/10.1590/fst.09920>

Naqash, F., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M., & Gani, A. (2017). Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review.

Carbohydrate Polymers, 168, 227–239.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.058>

Nawaz, H., Waheed, R., Nawaz, M., & Shahwar, D. (2020). Physical and Chemical Modifications in Starch Structure and Reactivity. *Chemical Properties of Starch*.

<https://doi.org/10.5772/intechopen.88870>

Noreen, A., Nazli, Z.-H., Akram, J., Rasul, I., Mansha, A., Yaqoob, N., Iqbal, R., Tabasum, S., Zuber, M., & Zia, K. M. (2017). Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*,

101, 254–272.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.029>

Nunes, G. L., Etchepare, M. de A., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Jacob Lopes, E., Barin, J. S., Flores, É. M. de M., da Silva, C. de B., & de Menezes, C. R. (2018).

Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. *LWT*, 89, 128–133.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.032>



Nurmi, J. T., Puolakkainen, P. A., & Rautonen, N. E. (2005). Bifidobacterium Lactis sp. 420 Up-Regulates Cyclooxygenase (Cox)-1 and Down-Regulates Cox-2 Gene Expression in a Caco-2 Cell Culture Model. *Nutrition and Cancer*, 51(1), 83–92. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5101_12

Oh, J. K., Drumright, R., Siegwart, D. J., & Matyjaszewski, K. (2008). The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*, 33(4), 448–477. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.01.002>

Pal, K., Banthia, A. K., & Majumdar, D. K. (2006). Characterization of Prepared Corn Starch-Based Hydrogel Membranes. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 4(1), 38–44. <https://doi.org/10.1177/228080000600400104>

Pankasemsuk, T., Apichartsrangkoon, A., Worametrachanon, S., & Techarang, J. (2016). Encapsulation of Lactobacillus casei 01 by alginate along with hi-maize starch for exposure to a simulated gut model. *Food Bioscience*, 16, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.07.001>

Park, J. H., & Kim, I. H. (2014). Supplemental effect of probiotic Bacillus subtilis B2A on productivity, organ weight, intestinal Salmonella microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks. *Poultry Science*, 93(8), 2054–2059. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03818>

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



- Pedroso-Santana, S., & Fleitas-Salazar, N. (2020). Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polymer International*, 69(5), 443–447. <https://doi.org/10.1002/pi.5970>
- Peng, Z., & Shen, Y. (2011). Study on Biological Safety of Polyvinyl Alcohol/Collagen Hydrogel as Tissue Substitute (I). *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 50(3), 245–250. <https://doi.org/10.1080/03602559.2010.531438>
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015). Challenges for the Production of Probiotic Fruit Juices. *Beverages*, 1(2), 95–103. <https://doi.org/10.3390/beverages1020095>
- Phillips, G. O., & Williams, P. A. (2009). *Handbook of hydrocolloids*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845695873>
- Piacentini, E., Giorno, L., Dragosavac, M. M., Vladislavljević, G. T., & Holdich, R. G. (2013). Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification. *Food Research International*, 53(1), 362–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.012>
- Plavec, T. V., & Berlec, A. (2020). Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020297>
- Pozo, C., Rodríguez-Llamazares, S., Bouza, R., Barral-Losada, L., Castaño, J., Müller, N., & Restrepo, I. (2018). Study of the structural order of native starch granules using combined FTIR and XRD analysis. *Journal of Polymer Research*, 25. <https://doi.org/10.1007/s10965-018-1651-y>
- Praepanitchai, O.-A., Noomhorm, A., & Anal, A. K. (2019). Survival and Behavior of Encapsulated Probiotics (*Lactobacillus plantarum*) in Calcium-Alginate-Soy Protein Isolate-Based Hydrogel Beads in Different Processing Conditions (pH and



Temperature) and in Pasteurized Mango Juice. *BioMed Research International*, 2019, 9768152. <https://doi.org/10.1155/2019/9768152>

Qiao, D., Liu, H., Yu, L., Bao, X., Simon, G. P., Petinakis, E., & Chen, L. (2016). Preparation and characterization of slow-release fertilizer encapsulated by starch-based superabsorbent polymer. *Carbohydrate Polymers*, 147, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.010>

Qiao, D., Tu, W., Wang, Z., Yu, L., Zhang, B., Bao, X., Jiang, F., & Lin, Q. (2019). Influence of crosslinker amount on the microstructure and properties of starch-based superabsorbent polymers by one-step preparation at high starch concentration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 679–685. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.019>

Qin, Y., Jiang, J., Zhao, L., Zhang, J., & Wang, F. (2018). Chapter 13—Applications of Alginate as a Functional Food Ingredient. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Biopolymers for Food Design* (pp. 409–429). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811449-0.00013-X>

Raddatz, G. C., de Souza da Fonseca, B., Poletto, G., Jacob-Lopes, E., Cichoski, A. J., Muller, E. I., Flores, E. M. M., de Bona da Silva, C., & Ragagnin de Menezes, C. (2020). Influence of the prebiotics hi-maize, inulin and rice bran on the viability of pectin microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtained by internal gelation/emulsification. *Powder Technology*, 362, 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.11.114>

Ramirez, A., Benítez, J. L., Rojas de Astudillo, L., & Rojas de Gáscue, B. (2016). Materiales polimeros de tipo hidrogeles: Revisión sobre su caracterización mediante



ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 36(2), 108–130.

Ramírez, A., Contreras, D., Prin, J. L., & Rojas de Gáscue, B. (2013). *Entrecruzamientos iónicos en hidrogeles de Poli(acrilamida-co-ácido itacónico) postulados a partir del análisis de su morfología y de su cinética de absorción*. 22(2), 6.

Razavi, S., Janfaza, S., Tasnim, N., L. Gibson, D., & Hoorfar, M. (2021). Nanomaterial-based encapsulation for controlled gastrointestinal delivery of viable probiotic bacteria. *Nanoscale Advances*, 3(10), 2699–2709. <https://doi.org/10.1039/D0NA00952K>

Rehman, A., Ahmad, T., Aadil, R. M., Spotti, M. J., Bakry, A. M., Khan, I. M., Zhao, L., Riaz, T., & Tong, Q. (2019). Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.015>

Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review. *Food Research International*, 137, 109682. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>

Rodríguez-Barona, S., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebióticos. *Información Tecnológica*, 27(6), 135–144. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014>



Rodríguez-Barona, S., Montes, L. M., & Ramírez, D. D. J. (2012). *MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN EN PRESENCIA DE PREBIÓTICOS*. 4.

Roessler, A., Friedrich, U., Vogelsang, H., Bauer, A., Kaatz, M., Hipler, U. C., Schmidt, I., & Jahreis, G. (2007). The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(1), 93–102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02876.x>

Rosas-Flores, W., Ramos-Ramírez, E. G., & Salazar-Montoya, J. A. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1011–1017. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.077>

Sabando, C., Ide, W., Rodríguez-Díaz, M., Cabrera-Barjas, G., Castaño, J., Bouza, R., Müller, N., Gutiérrez, C., Barral, L., Rojas, J., Martínez, F., & Rodríguez-Llamazares, S. (2020). A Novel Hydrocolloid Film Based on Pectin, Starch and *Gunnera tinctoria* and *Ugni molinae* Plant Extracts for Wound Dressing Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20(4), 280–292. <https://doi.org/10.2174/1568026620666200124100631>

Saheeda, P., & Jayalekshmi, S. (2020). Liquid/liquid interfacial polymerization as an effective synthesis approach for polypyrrole/MWCNTs nanocomposite with impressive nonlinear optical properties. *Optical Materials*, 104, 109940. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2020.109940>



Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., & de Vos, W. M. (2005). Probiotic and other functional microbes: From markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.003>

Seth, D., Mishra, H. N., & Deka, S. C. (2017). Effect of microencapsulation using extrusion technique on viability of bacterial cells during spray drying of sweetened yoghurt. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 802–807. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.099>

Shahrampour, D., Khomeiri, M., Razavi, S. M. A., & Kashiri, M. (2020). Development and characterization of alginate/pectin edible films containing *Lactobacillus plantarum* KMC 45. *LWT*, 118, 108758. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108758>

Shang, Q., Sun, W., Shan, X., Jiang, H., Cai, C., Hao, J., Li, G., & Yu, G. (2017). Carrageenan-induced colitis is associated with decreased population of anti-inflammatory bacterium, *Akkermansia muciniphila*, in the gut microbiota of C57BL/6J mice. *Toxicology Letters*, 279, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.904>

Sheu, B.-S., Cheng, H.-C., Kao, A.-W., Wang, S.-T., Yang, Y.-J., Yang, H.-B., & Wu, J.-J. (2006). Pretreatment with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(4), 864–869. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.4.864>

Shi, L.-E., Li, Z.-H., Li, D.-T., Xu, M., Chen, H.-Y., Zhang, Z.-L., & Tang, Z.-X. (2013). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.012>



Shima, M., Morita, Y., Yamashita, M., & Adachi, S. (2006). Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. *Food Hydrocolloids*, 20(8), 1164–1169. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.01.001>

Shu, G., He, Y., Chen, L., Song, Y., Meng, J., & Chen, H. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus Acidophilus* by Xanthan-Chitosan and Its Stability in Yoghurt. *Polymers*, 9(12), 733. <https://doi.org/10.3390/polym9120733>

Silva, K. C. G., Cezarino, E. C., Michelon, M., & Sato, A. C. K. (2018). Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. *LWT*, 89, 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.026>

Singh, B., Sharma, D. K., & Gupta, A. (2009). A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch–alginate beads to control environmental and health hazards. *Journal of Hazardous Materials*, 161(1), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.074>

Song, D., Ibrahim, S., & Hayek, S. (2012). Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. *Probiotics*. <https://doi.org/10.5772/50121>

Soukoulis, C., Behboudi-Jobbeldar, S., Macnaughtan, W., Parmenter, C., & Fisk, I. D. (2017). Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, 70, 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.014>

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt.



International Journal of Food Microbiology, 62(1), 47–55.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00380-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00380-9)

Sybesma, W., Hugenholtz, J., De Vos, W. M., & Smid, E. J. (2006). Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4), 0–0. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue4-fulltext-12>

Szilagyi, A., & Ishayek, N. (2018). Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. *Nutrients*, 10(12), 1994. <https://doi.org/10.3390/nu10121994>

Taniguchi, T., & Okamura, K. (1998). New films produced from microfibrillated natural fibres. *Polymer International*, 47(3), 291–294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0126\(199811\)47:3<291::AID-PI11>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0126(199811)47:3<291::AID-PI11>3.0.CO;2-1)

Tantratian, S., & Pradeamchai, M. (2020). Select a protective agent for encapsulation of *Lactobacillus plantarum*. *LWT*, 123, 109075. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109075>

Tomar, R. S., Gupta, I., Singhal, R., & Nagpal, A. K. (2007). Synthesis of poly(acrylamide-co-acrylic acid)-based super-absorbent hydrogels by gamma radiation: Study of swelling behaviour and network parameters. *Designed Monomers and Polymers*, 10(1), 49–66. <https://doi.org/10.1163/156855507779763685>

Traitel, T., Kost, J., & Lapidot, S. A. (2003). Modeling ionic hydrogels swelling: Characterization of the non-steady state. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(1), 20–28. <https://doi.org/10.1002/bit.10736>

Ulery, B. D., Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 49(12), 832–864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>



Vanderhoof, J. (2000). Probiotics and Intestinal Inflammatory Disorders in Infants and Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30. insights.ovid.com

Varcoe, J. J., Krejcarek, G., Busta, F., & Brady, L. (2003). Prophylactic Feeding of *Lactobacillus acidophilus* NCFM to Mice Attenuates Overt Colonic Hyperplasia. *Journal of Food Protection*, 66(3), 457–465. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.3.457>

Varzakas, T., Tzia, C., & Tzia, C. (2015). *Handbook of Food Processing: Food Safety, Quality, and Manufacturing Processes*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19398>

Villar-García, J., Hernández, J. J., Güerri-Fernández, R., González, A., Lerma, E., Guelar, A., Saenz, D., Sorlí, L., Montero, M., Horcajada, J. P., & Knobel Freud, H. (2015). Effect of Probiotics (*Saccharomyces boulardii*) on Microbial Translocation and Inflammation in HIV-Treated Patients: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 68(3), 256–263. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000468>

Villena, M., Morales, Gallardo, & Ruiz. (n.d.). *Técnicas de microencapsulación: Una propuesta para microencapsular probióticos*. 50, 8.

Wang, B., Akanbi, T., Agyei, D., Holanda, B., & Barrow, C. (n.d.). *Chapter 7—Coacervation Technique as an Encapsulation and Delivery Tool for Hydrophobic Biofunctional Compounds*. 28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3.00007-3>

Wang, K., Hao, Y., Wang, Y., Chen, J., Mao, L., Deng, Y., Chen, J., Yuan, S., Zhang, T., Ren, J., & Liao, W. (2019, October 7). *Functional Hydrogels and Their Application*



in Drug Delivery, Biosensors, and Tissue Engineering [Review Article]. *International Journal of Polymer Science*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2019/3160732>

Wang, K.-Y., Li, S.-N., Liu, C.-S., Perng, D.-S., Su, Y.-C., Wu, D.-C., Jan, C.-M., Lai, C.-H., Wang, T.-N., & Wang, W.-M. (2004). Effects of ingesting Lactobacillus- and Bifidobacterium-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(3), 737–741. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.3.737>

Wang, M., Gao, Z., Zhang, Y., & Pan, L. (2016). Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: A realistic therapeutic option. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(13), 5691–5701. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7557-x>

Wang, Y., Wei, X., Li, J., Wang, F., Wang, Q., Zhang, Y., & Kong, L. (2017). Homogeneous isolation of nanocellulose from eucalyptus pulp by high pressure homogenization. *Industrial Crops and Products*, *104*, 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.032>

Wang, Z., Ma, W., Hu, D., & Wu, L. (2020). Synthesis and characterization of microencapsulated methyl laurate with polyurethane shell materials via interfacial polymerization in Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *600*, 124958. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124958>

Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Meissner, B. W., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schröder, J. M., & Stange, E. F. (2004). NF- κ B- and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: A Novel Effect of a



Probiotic Bacterium. *Infection and Immunity*, 72(10), 5750–5758.

<https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5750-5758.2004>

Wildt, S., Munck, L. K., Vinter-Jensen, L., Hanse, B. F., Nordgaard-Lassen, I., Christensen, S., Avnstroem, S., Rasmussen, S. N., & Rumessen, J. J. (2006).

Probiotic treatment of collagenous colitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp.

Lactis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12(5), 395–401.

<https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000218763.99334.49>

Wu, D.-Q., Wang, T., Lu, B., Xu, X.-D., Cheng, S.-X., Jiang, X.-J., Zhang, X.-Z., & Zhuo, R.-X. (2008). Fabrication of Supramolecular Hydrogels for Drug Delivery and

Stem Cell Encapsulation. *Langmuir*, 24(18), 10306–10312.

<https://doi.org/10.1021/la8006876>

Wu, J., Li, K., Pan, X., Liao, S., You, J., Zhu, K., & Wang, Z. (2018). Preparation and

Physical Properties of Porous Starch/Natural Rubber Composites. *Starch - Stärke*, 70(11–12), 1700296. <https://doi.org/10.1002/star.201700296>

Xiao, Y., Han, C., Yang, H., Liu, M., Meng, X., & Liu, B. (2020). Layer (whey protein isolate) -by-layer (xanthan gum) microencapsulation enhances survivability of *L.*

bulgaricus and *L. paracasei* under simulated gastrointestinal juice and thermal conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 238–247.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.113>

Yasuda, H. (2006). Biocompatibility of Nanofilm-Encapsulated Silicone and Silicone-Hydrogel Contact Lenses. *Macromolecular Bioscience*, 6(2), 121–138.

<https://doi.org/10.1002/mabi.200500153>



- Yoshimura, T., Sengoku, K., & Fujioka, R. (2005). Pectin-based superabsorbent hydrogels crosslinked by some chemicals: Synthesis and characterization. *Polymer Bulletin*, 55(1), 123–129. <https://doi.org/10.1007/s00289-005-0422-1>
- Zainal-Arifin, S. H., Yeen, W. W., Zainol Abidin, I. Z., Megat Abdul Wahab, R., Zainal Ariffin, Z., & Senafi, S. (2014). Cytotoxicity effect of degraded and undegraded kappa and iota carrageenan in human intestine and liver cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-508>
- Zanjani, M. A. K., Ehsani, M. R., Tarzi, B. G., & Sharifan, A. (2018). Promoting *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* survival by microencapsulation with different starches and chitosan and poly L-lysine coatings in ice cream. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13318. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13318>
- Zhang, L., Li, N., Caicedo, R., & Neu, J. (2005). Alive and Dead *Lactobacillus rhamnosus* GG Decrease Tumor Necrosis Factor- α -Induced Interleukin-8 Production in Caco-2 Cells. *The Journal of Nutrition*, 135(7), 1752–1756. <https://doi.org/10.1093/jn/135.7.1752>
- Zhang, W., Song, J., He, Q., Wang, H., Lyu, W., Feng, H., Xiong, W., Guo, W., Wu, J., & Chen, L. (2020). Novel pectin based composite hydrogel derived from grapefruit peel for enhanced Cu(II) removal. *Journal of Hazardous Materials*, 384, 121445. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121445>
- Zhang, Y., Lin, J., & Zhong, Q. (2015). The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International*, 71, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.017>



- Zhao, M., Huang, X., Zhang, H., Zhang, Y., Gänzle, M., Yang, N., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Probiotic encapsulation in water-in-water emulsion via heteroprotein complex coacervation of type-A gelatin/sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, *105*, 105790. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105790>
- Zhao, M., Wang, Y., Huang, X., Gaenzle, M., Wu, Z., Nishinari, K., Yang, N., & Fang, Y. (2018). Ambient storage of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* ST-III by complex coacervation of type-A gelatin and gum arabic. *Food & Function*, *9*(2), 1000–1008. <https://doi.org/10.1039/C7FO01802A>
- Zheng, H., Gao, M., Ren, Y., Lou, R., Xie, H., Yu, W., Liu, X., & Ma, X. (2017). An improved pH-responsive carrier based on EDTA-Ca-alginate for oral delivery of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *Carbohydrate Polymers*, *155*, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.096>