

Evaluación del mucílago de nopal para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* 1449

Barrón Vilchis Daniela¹, Zavala Martínez Lisset Guadalupe ², San Juan Meza Perla Xiomara³, Reyes Escogido María de Lourdes ²

Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato¹; Departamento de Medicina y Nutrición, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato²; División de Ciencias e Ingenierías, Universidad de Guanajuato³
d.barronvilchils@ugto.mx¹, lg.zavalamartinez@ugto.mx², px.sanjuanmeza@ugto.mx³, ml.reyes@ugto.mx²

Resumen

La encapsulación proporciona a las bacterias probióticas una barrera física la cual le permite incrementar su resistencia a condiciones adversas como lo es el tránsito gastrointestinal en donde se presentan pH muy ácido y presencia de sales biliares y enzimas diversas. Además de brindar protección, incrementa su resistencia y viabilidad asegurando de esta manera que al ser consumidos se aporten los beneficios que se les confieren a la salud. El alginato es uno de los agentes encapsulantes más utilizados y puede combinarse con diversos extractos naturales, como el mucílago de nopal el cual es una sustancia de interés, ya que debido a sus propiedades tiene diversas aplicaciones en la industria de alimentos y cosméticos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial del mucílago de nopal en combinación con el alginato como agente encapsulante. Se evaluaron diferentes mezclas de alginato/mucílago para la encapsulación de una cepa de *Lactobacillus plantarum*. Se elaboraron las microcápsulas utilizando la técnica de extrusión y posteriormente, se determinó su viabilidad, eficiencia de encapsulación, tamaño, peso y color. El resultado muestra que la mezcla alginato/mucílago en relación 1:1 es útil para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum*.

Palabras clave: *Lactobacillus*; mucílago, alginato, encapsulación.

Introducción

El grupo de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) está constituido por diversos géneros bacterianos, siendo *Lactobacillus* el que aporta la mayor cantidad de especies a dicho grupo. Algunas de las especies de este género funcionan como probióticos, los cuales son microorganismos que, administrados en cantidad adecuada, proveen beneficios al consumidor [1]. Estos beneficios son sin duda diversos ya que ayudan tanto a mejorar y modular la respuesta del sistema inmune, a prevenir y tratar diversas enfermedades del tracto gastrointestinal, ya que actúan inhibiendo la adhesión de microorganismos que pueden ser patógenos; además, ayudan en la degradación de toxinas y algunas presentan actividad hipocolesterolemica y anticancerígena debido a que producen metabolitos como ácidos grasos de cadena corta y ácido linoleico conjugado [2, 3].

Para que las bacterias probióticas puedan aportar sus beneficios a la salud deben sobrevivir y multiplicarse en el huésped, por esta razón, deben ser metabólicamente estables y activos en el producto, sobrevivir su paso a través del estómago y llegar al intestino grueso en cantidades mayores 10^6 UFC/mL. Sin embargo, los probióticos son sensibles a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal debido a algunos alimentos, pH ácido y ácidos biliares [1]; y no llegan del todo a su sitio de acción ya que son eliminados en su trayecto, por lo que en los últimos años se han desarrollado diversos métodos como la microencapsulación que permite proteger las células conservando su viabilidad y así facilitar su llegada al sitio activo o su liberación controlada para que cumplan con sus funciones probióticas [3].

La microencapsulación es una técnica que permite que los microorganismos o células queden atrapadas en el núcleo de materiales que tienen propiedades de encapsulación, dando lugar a la formación de microcápsulas las cuales además de brindar una barrera física contra el estrés ambiental y protegerlos de factores ambientales perjudiciales, incrementan su resistencia y viabilidad [2].

Diversos estudios plantean que los materiales y técnicas de encapsulación son fundamentales para obtener una mayor viabilidad de microorganismos, por lo que existen materiales que han sido utilizados frecuentemente para este proceso [3]. El material de encapsulación denominado como agente encapsulante, debe seleccionarse correctamente para que no influya en la morfología, permeabilidad y en el tamaño de las micropartículas, no debe presentar toxicidad puesto que las principales aplicaciones de la microencapsulación son la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética [3].

El alginato de calcio es uno de los agentes encapsulantes más utilizados [4]. Es un heteropolisacárido lineal extraído de algas, formado por residuos de ácido D-manurónico (M) y residuos de ácido L-glucorónico (G), su estructura se compone de bloques de residuos mezclados con regiones de bloques M y bloques G [2]; debido a su conformación pueden formar una estructura con una matriz que puede ser versátil y porosa [4]. Este polisacárido es altamente utilizado debido a que es un material no tóxico, de costo accesible y biocompatible [6]. Además, posee propiedades gelificantes. La microencapsulación con alginato de sodio es debido a la gelificación iónica, en la que al entrar en contacto con una solución de catión divalente como el Ca^{2+} forma un hidrogel [7].

El alginato puede utilizarse solo o en combinación con otros polímeros principalmente de origen natural. Los polímeros o mucílagos extraídos a partir de plantas por medio de la exudación natural o por un proceso de extracción, han sido utilizados por sus aportes como aditivos alimentarios, materiales de recubrimiento, agentes gelificantes, espesantes y como material de encapsulación [3]. El uso de matrices mixtas compuestas por dos o más materiales de recubrimiento permite mejorar la conservación del compuesto encapsulado debido a que se combinan los beneficios de cada material [8] siendo la ventaja de una matriz mixta.

El mucílago de nopal es una sustancia hidrocoloidal y heteropolisacárido, que se conforma de diversas proteínas y cadenas de polisacáridos las cuales tienen proporciones variadas de L-arabinosa, D-galactosa, L-ramnosa y D-xilosa como principales unidades de azúcar dependiendo de la especie de nopal [9].

En la actualidad, el mucílago de nopal es una sustancia de interés ya que debido a sus propiedades tiene diversas aplicaciones en la industria alimenticia como retenedor de agua, espesante de alimentos e incluso se ha utilizado como agente encapsulante de ácidos grasos esenciales [10]; en aplicaciones farmacéuticas y en el área de la salud se ha utilizado debido a que también se le atribuyen propiedades antioxidantes y terapéuticas, dentro de las cuales tienen efecto en la protección de la mucosa gástrica ulcerada, sobre la acción hipoglucemiante, como analgésico y antiinflamatorio; además, también es utilizado en la industria cosmética, en la construcción y pinturas y algunas de sus aplicaciones pueden ser atribuidas a una de sus propiedades como la viscosidad [11].

Las aplicaciones y propiedades del mucílago de nopal son diversas y variadas por lo que el objetivo de este trabajo fue emplear el mucílago de nopal combinado con alginato de sodio para la encapsulación de la cepa de *Lactobacillus plantarum* 1449.

Materiales y métodos

Cultivos bacterianos

La cepa de *Lactobacillus plantarum* 1449 se reactivó por dos cultivos sucesivos en medio MRS, incubando a 37°C durante 24 h en anaerobiosis. Con los cultivos frescos se inocularon 25 ml de medio MRS; incubando en las condiciones ya mencionadas. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con solución salina fisiológica.

Encapsulación de Lactobacillus plantarum 1449

Se prepararon 25 ml de cada una de las siguientes mezclas alginato de sodio/mucílago: a) Relación 1:1, b) Relación 1:4, c) Relación 1:2 y alginato al 2% como control. Las soluciones se homogeneizaron por agitación durante 5 minutos. Las células precipitadas se resuspendieron en los 25 ml de cada una de las soluciones preparadas. Una vez homogenizadas las suspensiones, se pasaron a jeringas de 3 ml y se dejaron caer por goteo sobre solución de CaCl_2 al 2%. Se mantuvieron en agitación durante 30 min para completar la formación de las microcápsulas y terminado el tiempo de agitación, las microcápsulas se filtraron y lavaron dos veces con solución salina fisiológica estéril.

Caracterización de las microcápsulas

Las microcápsulas individuales se pesaron en balanza analítica y midieron con un vernier obteniendo el promedio del peso y tamaño. También se determinaron los parámetros de color L^* , a^* y b^* , para conocer la variabilidad de color de las mezclas de alginato/mucílago comparado con el alginato.

Determinación de la viabilidad

Para determinar el efecto de la encapsulación en la viabilidad de las células, se disolvió 1 gramo de las microcápsulas en citrato de sodio al 1%, se colocaron en agitación hasta disolución completa. Para el conteo celular se utilizó la técnica de dilución serial utilizando agua peptonada al 1% para las diluciones. Las diluciones 6 y 7 se sembraron por extensión en placas de agar MRS, las cuales se incubaron a 37° C durante 48 horas. Se realizó el recuento de colonias reportando como UFC/gr. Por último, se determinó la eficiencia de encapsulación utilizando la fórmula:

$$EE = (\text{Log}_{10} N / \text{Log}_{10} N_0) * 100$$

Donde:

N: Número de bacterias viables después de la encapsulación (UFC/g microcápsulas)

N_0 : Número de bacterias viables en el cultivo antes de la encapsulación (UFC/ml cultivo)

Resultados

Se evaluó la funcionalidad del mucílago de nopal en la encapsulación de células bacterianas, para lo cual se prepararon diferentes mezclas de mucílago con alginato utilizando como control de encapsulación el alginato solo. En la Figura 1, se muestran las microcápsulas obtenidas, las microcápsulas que se muestran en la figura A1 y B1 son firmes y esféricas y mantienen un tamaño uniforme. Por otro lado, las microcápsulas de la figura C1, que contienen una mayor cantidad de mucílago presentaron poca firmeza y consistencia, y fueron amorfas; en la mezcla de alginato-mucílago en relación 1:2 no se formaron microcápsulas, por lo que esta opción se descartó; mostrando que al aumentar la cantidad de mucílago en la mezcla se pierde la forma y estabilidad de las microcápsulas, por lo cual es importante la adición del alginato al mucílago manteniendo al menos una relación 1:1 para brindar el soporte de la microencapsulación al mucílago. El alginato permite el entrecruzamiento para formar una microcápsula más consistente por lo que a una menor proporción de alginato se presenta una consistencia menos firme perdiendo la forma. A su vez, otro aspecto importante es la concentración utilizada de CaCl_2 , ya que también puede influir en la firmeza y la consistencia deseada. [12]

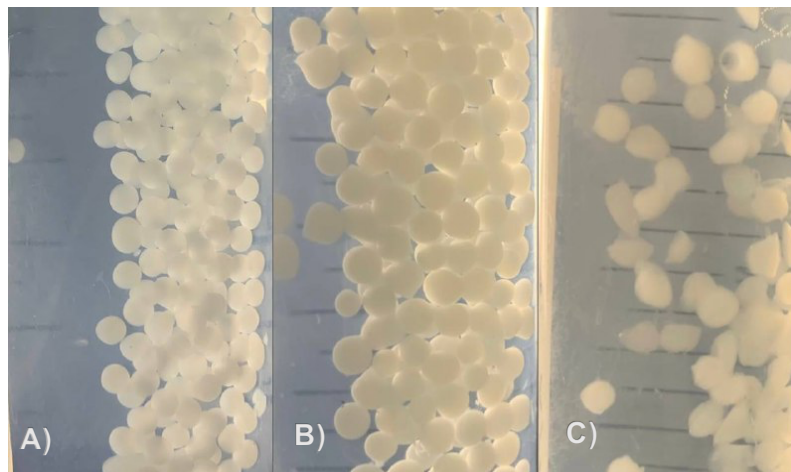


Figura 1. Microcápsulas obtenidas de *L. plantarum* 1449. A) alginato al 2 %. B) alginato: mucílago (relación 1:1). C) alginato: mucílago (relación 1:4).

Respecto al tamaño y peso de las microcápsulas (Tabla 1), se puede observar que no se obtuvo un valor elevado del error, es decir, que no hay una gran variación entre los datos de cada una de las distintas combinaciones y la mayoría mantuvo un tamaño uniforme. Así mismo, se puede observar que las microcápsulas de alginato-mucílago 1:1 (B) presentaron un tamaño promedio de 2.9 mm siendo las de mayor tamaño seguidas de las microcápsulas con relación 1:4 (C) y, por último, las de menor tamaño fueron las de alginato al 2% (A). Por lo que se puede decir que, al aumentar la concentración de mucílago, el tamaño de la microcápsula disminuye. Aunque también se ha descrito que la variación de tamaño puede deberse a la técnica de extrusión utilizada, en este caso que se utilizó una jeringa de calibre 3 y el goteo se hizo a una altura de aproximadamente 12 cm variando significativamente, puesto que no se utilizó algún equipo para tener una regulación en la distancia. Además, las microcápsulas formadas por este método suelen tener un tamaño uniforme y mayores a 1 mm resultante de la acumulación de material encapsulante en la punta del bisel [13].

Se evaluó el color de las microcápsulas de alginato-mucílago comparando con las de alginato para determinar si el mucílago influye en esta propiedad. Los resultados de las coordenadas L^* a^* b^* se muestran en la tabla 2; L indica la luminosidad, a^* y b^* son coordenadas cromáticas. Al analizar los resultados de la Tabla 2 se puede interpretar que la muestra con alginato/mucílago en relación 1:1 con respecto a la muestra control de alginato al 2% presenta una mayor luminosidad y se inclina más hacia los tonos verdes y azules. Por otro lado, la muestra alginato/mucílago 1:4 en comparación con la muestra del alginato al 2% es más luminosa y se inclina hacia las coordenadas de los tonos verdes y amarillos.

Tabla 1. Caracterización de las microcápsulas

Coordenadas	Alginato 2 %	Alginato/mucílago relación 1:1	Alginato/Mucílago relación 1:4
L^*	62.21	62.3	70.26
a^*	1.22	0.02	0.71
b^*	3.01	2.76	3.39

Al determinar la diferencia total de color (Tabla 3), la proporción de alginato/mucílago 1:4 muestra un valor más alto, por lo que presenta una mayor diferencia con el alginato al 2%. La importancia de determinar el color radica en que de esa manera se puede conocer la variación al añadir el mucílago como agente encapsulante respecto a la muestra control y utilizarse como un índice de calidad [14].

Tabla 2. Parámetros de color de las microcápsulas.

Característica	Microcápsulas		
	Alginato 2 %	Alginato/mucílago relación 1:1	Alginato/Mucílago relación 1:4
Peso (mg) \pm DE	6.92 \pm 1.7	19 \pm 1.7	9.8 \pm 4.0
Tamaño (mm) \pm DE	1.78 \pm 0.25	2.9 \pm 0.22	2.1 \pm 0.23
Forma	Esférica	Esférica	Irregular

Tabla 3. Resultados de la diferencia de color de las mezclas alginato/mucilago comparando con el alginato solo.

	Mezcla Alginato/Mucilago relación 1:1	Mezcla Alginato/Mucilago relación 1:4
ΔL	0.09	8.05
Δa	-1.2	-0.51
Δb	-0.25	0.38
ΔE	1.23	8.08

En lo que respecta a la viabilidad de las bacterias después de la encapsulación, se obtuvieron valores de 10^9 y 10^{10} UFC/gr de microcápsulas (Tabla 4), considerando los números de bacterias que deben contener los productos comerciales se puede decir que los resultados obtenidos mantienen los números requeridos de bacterias viables. El mantener un número mínimo requerido de células viables es importante para que desempeñen las funciones atribuidas. [15]

Tabla 4. Células viables después del proceso de encapsulación, se reportan como UFC/g de microcápsula.

Condición evaluada	Alginato 2 %	Alginato/mucilago relación 1:1	Alginato/Mucilago relación 1:4
Células viables (UFC/g)	4.66E+09	1.05E+10	2.40E+10

Para determinar la cantidad de *L. plantarum* que se obtuvo en la encapsulación se utilizaron los valores obtenidos en la determinación de la viabilidad y se calculó con el número de células viables en placa antes y después de la encapsulación. El promedio de UFC/g obtenido antes de la encapsulación fue de 5.02×10^{10} . Con este valor se calculó la eficiencia de la encapsulación. Los valores de la eficiencia obtenidos para cada muestra de alginato/mucilago se muestran en la Tabla 5. La eficiencia de encapsulación fue superior al 90% para todas las condiciones evaluadas, siendo superior para la mezcla alginato/mucilago 1:4, aunque no fue la que presentó la mayor estabilidad.

Tabla 5. Resultados de la determinación de eficiencia de la encapsulación.

Microcápsulas	Alginato 2%	Alginato/Mucilago relación 1:1	Alginato/Mucilago relación 1:4
Eficiencia Encapsulación de	90.4%	93.6%	97%

Conclusiones

En este estudio se evaluó el potencial del mucilago de nopal para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* 1449. La elaboración de mezclas de diferentes proporciones de alginato/ mucilago permitió determinar que

una mezcla en proporción 1:1 es eficiente para la encapsulación, ya que al incrementar la cantidad de mucílago las microcápsulas pierden forma, firmeza y estabilidad. Además, las microcápsulas obtenidas que utilizaron esta misma concentración resultaron ser las de mayor tamaño, aunque se podrían reducir dependiendo de su aplicación y utilizando otra técnica que permita obtener microcápsulas más pequeñas. Independientemente de la técnica de encapsulación, no se presenta diferencia en la viabilidad de las células bacterianas. Respecto a la eficiencia de encapsulación la de las dos mezclas alginato/mucílago fue superior a la del alginato solo, lo cual indica que el proceso de encapsulación no influye en la viabilidad de las bacterias. Finalmente, con base a los resultados se puede concluir que el mucílago de nopal es útil para la encapsulación de bacterias en proporción 1:1 mezclado con el alginato de sodio, ya que presentó una eficiencia de microencapsulación del 93.6%, microcápsulas estables, esféricas, firmes y de tamaño homogéneo.

Referencias

- García C, Apolinaria, Henríquez A, Patricio, Retamal R, Carolina, Pineda C, Susana, Delgado Sen, Carolina, & González C, Carlos. (2009). *Propiedades probióticas de Lactobacillus spp aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por Helicobacter pylori*. Revista médica de Chile, 137(3), 369-376. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009000300007>
- Vida Mardani Ghahfarokhi, Paol P. Pescarmona, Gert-Jan W. Euverink. *Encapsulation of Lactobacillus casei (ATCC 393) by Pickering-Stabilized Antibubbles as a New Method to Protect Bacteria against Low pH*. MDPI. September 2020.
- F.J. Rodrigues. *Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications*. ELSEVIER. Recuperado de: <http://www.elsevier.com/openaccess/userlicense/1.0/>
- Défaz Gavilanes Andrés Sebastián, Moreira Cálix Juan Fernando. *Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de Lactobacillus plantarum en yogur sin sabor*. Escuela Agrícola Panamericana. Honduras. Noviembre, 2017.
- González Azón, María del Carmen; Maestro Garriga. *Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales*. Universidad de Barcelona.
- S. Galus; A. Lenart. *Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin*. J. Food Eng., vol. 115, no. 4, pp. 459–465, Apr. 2013
- Silvina Muchiutti Gabriela, López Novello, L. Armando Córscico, F. *Alginate capsules for protecting polyphenols present in oregano essential oil*. CDT. Universidad Nacional de Entre Ríos. Volumen 30. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/journal/145/14561215012/html/>
- N. Ortiz-Romero; L. A. Ochoa-Martínez; S. M. González-Herrera; O. M. Rutiaga-Quiñones; J. A. Gallegos-Infante. *Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática*. TecnoLógicas, vol. 24, nro. 52, e1962, 2021.
- Díaz-Blanco, Y., Menchaca-Campos, C., Rocabruno-Valdés, C. I., & Uruchurtu-Chavarín, J. (2019). *Natural additive (nopal mucilage) on the electrochemical properties of concrete reinforcing steel*. Revista ALCONPAT, 9(3), 260-276. Epub 26 de junio de 2020. <https://doi.org/10.21041/ra.v9i3.429>
- Huerta Hernández, Josué. *Desarrollo de geles mucílago de nopal – alginato de sodio conteniendo aceite de ajonjolí mediante gelación iónica*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Vargas-Rodríguez, L., Arroyo Figueroa, G., Herrera Méndez, C. H., Pérez Nieto, A., García Vieyra, M. I., & Rodríguez Núñez, J. R. (2016). *Propiedades físicas del mucílago de nopal*. Acta Universitaria, 26(NE-1), 8-11. doi: 10.15174/au.2016.839.
- Jun-Yee Leonga, Weng-Hoong Lama, Kiang-Wei Hoa, Wan-Ping Vooa, Micky Fu-Xiang Leea, Hui-Peng Lim. *Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems*. ELSEVIER. 2015. Recuperado de: https://www.encaprocess.fr/500_bibliography/2016d.pdf
- Jun-Yee Leonga, Weng-Hoong Lama, Kiang-Wei Hoa, Wan-Ping Vooa, Micky Fu-Xiang Leea, Hui-Peng Lim. *Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems*. ELSEVIER. 2015. Recuperado de: https://www.encaprocess.fr/500_bibliography/2016d.pdf

Mathias-Rettig, K.a, Ah-Hen, Kb. *El color en los alimentos un criterio de calidad medible*. Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. 2014.

Silva, M. P., Tulini, F. L., Ribas, M. M., Penning, M., Fávaro-Trindade, C. S., & Poncelet, D. (2016). *Microcapsules loaded with the probiotic Lactobacillus paracasei BGP-1 produced by co-extrusion technology using alginate/shellac as wall material: Characterization and evaluation of drying processes*. *Food Research International*, 89, 582–590. doi: 10.1016/j.foodres.2016.09.008