

## DISEÑO DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO CON MATRIZ PREBIÓTICA DE ALOE VERA PARA LA ENCAPSULACIÓN DE *Lactobacillus plantarum* .

Castillo S.L.<sup>1\*</sup>, Alvarado J.M<sup>1.</sup>, Baez J.G<sup>1.</sup>, Macías E.<sup>2</sup>, Ramírez-Baca P.<sup>2</sup>, Candelas-Cadillo Ma.G.<sup>2</sup>, Gallardo C.T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencia de Alimentos. Av. Pedro de Alba s/n Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza N.L. México. [\\*campy9995@gmail.com](mailto:*campy9995@gmail.com),

<sup>2</sup>: Universidad Juárez del Estado de Durango. Departamento de Alimentos. Calle constitución 404 sur, centro, 34100 Durango, Dgo.

### RESUMEN:

Hoy en día el uso de bacterias probióticas ha aumentado notablemente el interés en la industria de los alimentos, ya que estos consiguen obtener efectos beneficiosos para la mejora en la salud de la población en general, de igual manera, la tendencia de preferencia en la población ha ido aumentando para con los productos alimenticios que nos ofrecen considerables beneficios nutricionales y en la salud. Para que estas bacterias probióticas intervengan de la manera apropiada y esperada, es de gran importancia que lleguen vivas al intestino en un número adecuado. En los productos probióticos el cambio persistente en la viabilidad de las distintas bacterias que son utilizadas, es un inconveniente significativo y de gran consideración; dicha viabilidad podrá ser protegida mediante el procedimiento de una microencapsulación, en donde dicha técnica, hará que las bacterias probióticas queden atrapadas dentro de unas cápsulas, para así, producir partículas con un diámetro de unos cuantos nanómetros a unos pocos milímetros. En los productos alimenticios en los que se les han incorporado bacterias probióticas, es de gran ayuda la incorporación de alginatos y/o diversos geles para elaborar la microencapsulación de las bacterias, y así con esta técnica, los microorganismos queden protegidos frente al entorno desfavorable de los procesos digestivos y así mismo poder conservar su actividad metabólica. En la presente investigación, se utilizó Aloe vera (*Aloe barbadensis Miller*) y alginato de sodio para la elaboración de la matriz encapsulante mediante la técnica de extrusión, para la obtención de microcápsulas; por lo tanto el objetivo central de esta investigación es el diseño óptimo de microcápsulas a base de estos materiales, así como la evaluación del potencial que tiene el Aloe vera como matriz prebiótica.

### ABSTRACT:

Probiotics seems to be a good alternative for Industrial application since they provide health benefits for who consume them. A lot of products have been developed taking advantage of these probiotic properties. Previous studies demonstrated that associated problem with these kind of products is the loss of viability of the probiotic due to the chemical changes during the pass through the digestive system. To solve this, microencapsulation has been proposed as an alternative to provide bacterial protection during these changes, preserving the metabolism of the encapsulated cell and finally allowing the liberation of the living bacteria once in the colon. A lot of formulations have been performed

using several edible materials as gums. The formulation of the encapsulation material is very important for this purpose. Incorporation of prebiotic material has been suggested for enhance the viability inside of the microcapsule, over the time. Taking this background, in the present investigation we design a suitable formulation using alginate and Aloe vera as prebiotic matrix for the encapsulation of *L. plantarum*.

### **Palabras clave:**

Microencapsulación, Bacterias ácido lácticas (BAL), Alginato.

**Área:** Desarrollo de nuevos productos.

### **INTRODUCCIÓN**

Los alimentos funcionales que contienen a las bacterias probióticas en estado viable, son reconocidos día a día gracias a sus efectos benéficos para la salud, al mismo tiempo han ido incrementado su popularidad en el mercado actual. Entre las bacterias lácticas más estudiadas se encuentra *Lactobacillus plantarum*, bacteria destacada entre las demás, ya que se ha demostrado su efectividad para colonizar el tracto gastrointestinal humano. Para que las bacterias ejerzan su efecto benéfico en la salud, estas tendrán que alcanzar el lugar vivo de acción y establecerse en las cantidades idóneas. A fin de proporcionar beneficios para nuestra salud, se ha recomendado que dichas bacterias deberán de estar presentes en un mínimo nivel de  $10^6$  UFC/g en el producto final (Doleyres y Lacroix, 2005) o  $10^7$  UFC/g en el punto de consumo (Lee y Salminen, 1995) o así mismo ser ingeridos en cantidades suficientes para conseguir una ingesta diaria de  $10^8$  UFC/g (López-Rubio et al., 2006). Sin embargo, algunos estudios indican que las bacterias no podrán sobrevivir en números suficientemente elevados cuando se incorporan en ciertos productos lácteos (Capela et al. 2006, Krasaekoopt, et al. 2003).

Ingerir células vivas probióticas con la incorporación de una barrera física contra las condiciones intestinales adversas, es un planteamiento que actualmente adopta un gran interés por las industrias de los alimentos (Doleyres y Lacroix, 2005; Krasaekoopt et al., 2003).

La protección mediante diversas técnicas como lo es la microencapsulación, podrá ayudar a la conservación y/o mantener la cantidad requerida de biomasa en el producto final con buenas tasas de viabilidad y supervivencia. La microencapsulación se define como la tecnología de empaquetado en pequeño de sólidos, líquidos o materiales gaseosos; las cápsulas selladas podrán liberar su contenido a velocidades controladas bajo condiciones específicas (Shahidi F., 1993, Krasaekoopt y Watcharapoka, 2014).

Actualmente existe un gran interés por el uso del Aloe vera en la industria de los alimentos, debido principalmente a sus propiedades funcionales, antioxidantes y terapéuticas (Martínez-Romero D. et al., 2003), así mismo es una gran fuente de micronutrientes esenciales (Na, Ca, Mg, K, etc.) y de fitoquímicos activos (Loots et al., 2007). Un adecuado aprovechamiento de la planta, está asociado al contenido de sus componentes bioactivos, microestructura y los métodos para preservar y estabilizar los productos obtenidos a partir del gel.

Considerando lo anterior y con el creciente aumento del interés de la población por la compra de productos benéficos para la salud, el objetivo de la presente investigación será el diseño y obtención

de microcápsulas a base de alginato de sodio para la protección de las bacterias probióticas, utilizando una matriz de Aloe vera que funja como prebiótico además de proteger a las bacterias de los entornos desfavorables que se encuentran en los procesos digestivos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### 1. Cepas microbianas y condiciones de cultivo

La cepa que se utilizó fue *Lactobacillus plantarum*, donada por el Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. Esta se cultivó en medio de Man Ragosa y Sharpe estéril (121 °C /15min) (MRS, Difco, BD Sparks MD, USA.), en una atmosfera anaeróbica en jarra para anaerobiosis utilizando el GasPak System (Oxoid, Therbarton, South Australia), y se incubó a 37 oC / 24h.

### 2. Material de soporte

El gel de Aloe vera fue proporcionado por el Departamento de Alimentos de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Se mantuvo en congelación a -20 oC.

Para su uso se dejó descongelar lentamente a temperatura ambiente, después de esto, se trituró en una licuadora para su posterior utilización.

El alginato para la obtención de las microcápsulas se adquirió en presentación comercial marca Golden Bell grado alimenticio. Los sustratos utilizados (Aloe vera y Alginato) fueron esterilizados en autoclave a 108 °C/10min.

### 3. Condiciones óptimas, formulación y diseño de las Microcápsulas

La microencapsulación se llevó a cabo de acuerdo al método mencionado por Ravula y Shah (2000); Primeramente se prepararon 100mL de alginato de sodio (al 0.5, 1 y 2%) estéril el cual se preparó de la siguiente manera: 0.5, 1 ó 2 g de alginato, se disolvieron lentamente en 99.5, 99 ó 98mL de agua respectivamente. El agua se calentó previamente a 65°C y se mezcló con las cantidades respectivas de alginato en un Ultraturax a 6000rpm constantes por 10 minutos; la mezcla obtenida se esterilizó en condiciones de carbohidrato (108°C/10min). Posteriormente se adicionaron concentraciones variables del Aloe vera gel (1, 5, 10% v/v).

Una vez mezclados el alginato y el aloe vera, se colocaron en un Ultraturax por espacio de 20 min hasta obtener una mezcla espesa. A la mezcla obtenida se le agregó 1mL de cultivo bacteriano concentrado. Para incorporar el cultivo bacteriano, 10mL de un cultivo de 24 hrs (10mL) de *L. plantarum*, se centrifugó a 2500 rpm por 20 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se re-suspendió en 1mL de agua peptonada estéril. Esta alícuota se agregó a la mezcla de alginato y aloe vera, para la obtención de las microcápsulas, y se mezcló dos minutos más para homogenizar completamente. Como control negativo, se realizaron las cápsulas con la bacteria sin ningún aditivo. La mezcla obtenida, se depositó lentamente por goteo con una jeringa de 1 y 5mL en un vaso de precipitado conteniendo 600mL de CaCl<sub>2</sub> 0.05M, 0.25. 0.5 y 0.1 estéril. Después de 15 min las microcápsulas de alginato se recuperaron de la fase acuosa. Las microcápsulas fueron utilizadas para pruebas posteriores colocándose en agua peptonada 0.01% estéril a 4°C.

#### 4. Evaluación microscópica y tamaño de partícula.

Para evaluar la morfología y eficiencia de encapsulación, se tomaron al azar aquellas microcápsulas que tuvieron la mejor consistencia de acuerdo a los parámetros establecidos en el punto anterior. Se colocaron en un portaobjetos y fueron analizadas por microscopía en un Microscopio Leica DM 500 con visual software. Se analizó la morfología de la microcápsula y la eficiencia de encapsulación mediante la detección de bacterias atrapadas en la matriz de alginato y aloe. Posterior a la evaluación microscópica, muestras aleatorias de microcápsulas, se colocaron en un equipo Master Sizer 3000 para la determinación del tamaño de partícula.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. Determinación de las condiciones óptimas para las microcápsulas

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas y adecuadas para la elaboración de las microcápsulas de alginato con matriz de Aloe vera, se realizaron formulaciones con diferentes concentraciones de alginato, Aloe vera y cultivo bacteriano (*L. plantarum*), ya que según Agarry et al (2005) el material de la microcápsula debe estabilizarse para proteger su contenido, y evitar la pérdida del mismo durante su trayecto por el tracto gastrointestinal. El tamaño y forma de las microcápsulas depende en gran medida de la viscosidad del alginato de sodio utilizado (José et al 2015), por ello se prepararon varias concentraciones 0.5, 1, y 2%.

Para la obtención de las microcápsulas, se realizó un barrido de concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  que variaron desde 0.025 hasta 0.1M ya que según Anal et al (2007), la concentración de  $\text{CaCl}_2$  es muy importante para la obtención de la consistencia deseada y durabilidad de las mismas. Una vez teniendo diferentes preparaciones de alginato y  $\text{CaCl}_2$ , se dejó caer por goteo el alginato en las diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  arriba mencionadas y se evaluó la dureza y durabilidad de las microcápsulas, durante varios días a temperatura de refrigeración y ambiente.

A mayor concentración de calcio, las cápsulas presentaron mayor firmeza mientras que en una concentración menor de calcio las microcápsulas tenían poca firmeza por lo que perdían su forma. Con base a los resultados se estableció que la mejor concentración de alginato fue al 1% y la de  $\text{CaCl}_2$  al 0.1M, por lo que se utilizaron estas concentraciones para posteriores ensayos.

#### 2. Evaluación microscópica de las microcápsulas.

Al obtener la fórmula óptima para la obtención de las microcápsulas, algunos otros factores fueron determinantes en la morfología de las mismas. El tamaño de la boquilla de la jeringa fue determinante para la variación de la forma y el tamaño de las microcápsulas obtenidas, coincidiendo con Chan et al., 2009, quienes mencionan que aspectos como la distancia de separación de la boquilla al baño (liquido solidificante), el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución que induce la gelificación influyen en su forma esférica y tamaño. Otros factores determinantes que pudiesen influir en la forma, son el tamaño de partícula, la concentración de alginato, la carga bacteriana y el tiempo de exposición al cloruro de calcio. A pesar de todos estos factores, la técnica de microencapsulación por extrusión (Fig.1) ha sido empleada tradicionalmente al permitir la producción de microcápsulas con tamaños uniformes, por lo que es de suma importancia la estandarización del método de obtención para eliminar las variaciones derivadas de estos factores (Burgain et al., 2011).

En el presente estudio se obtuvieron desde tamaños muy pequeños de forma irregular y elíptica hasta otras microcápsulas de forma esférica regular con una medida aproximada a 1mm. Así mismo, se pudo observar que la superficie de las microcápsulas tenía un aspecto poroso. La porosidad sugiere la posibilidad de facilitar la entrada y salida de los solventes (Gouin, 2004), a fin de hacer más fácil la accesibilidad al entorno.

Sin embargo y a pesar de las variaciones debido a los factores antes mencionados, las microcápsulas obtenidas de cada experimento por separado fueron uniformes. Una vez obtenidas las microcápsulas se analizaron en microscopio Leica DM 500 con Viewer Software, para corroborar que *L. plantarum* estuviera incorporado en las microcápsulas. Los resultados mostraron que tanto en las microcápsulas pequeñas irregulares y elípticas, como en las regulares esféricas de 1mm, se encontraban encapsuladas de manera aleatoria células vivas de *L. plantarum* en la matriz del alginato. Dichas bacterias se encontraron en estado viable y con movilidad Browniana dentro de la matriz de alginato (*datos no mostrados*).

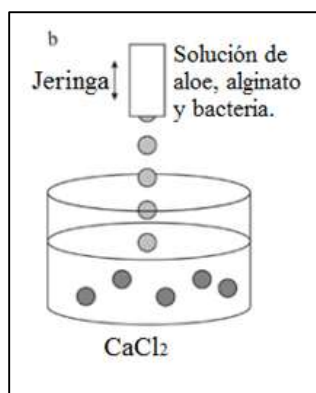


Figura 1. Técnica de extrusión para obtención de microcápsulas

### CONCLUSIONES

El tamaño y forma de las microcápsulas está influenciado por diversos factores como la cantidad de alginato, concentración del cloruro de calcio y tamaño de poro de la jeringa utilizada, que deberán ser controlados y estandarizados para obtener microcápsulas uniformes. La incorporación de una matriz prebiótica como el Aloe vera, y el cultivo bacteriano debe ser formulados de acuerdo a el efecto que estas matrices pudieran ejercer sobre la forma y consistencia de las microcápsulas obtenidas.

### BIBLIOGRAFÍA

Doleyres, Y. y Lacroix, C., (2005). Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *Int. Dairy J.* 15, pp 973–988.

Capela, P., Hay, T., Shah, N., (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res Int* 39(2):203-211.

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7–8), pp 330–347.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., y Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, 13, pp 3–13.

Krasaekoopt, W., Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Sci Technol* 57(2):761-766.

Lee, Y.K. y Salminen, S., (1995). The coming to age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 6, pp 241–245.

Loots, D. T., van der Westhuizen F. H. y Botes L., (2007). Aloe ferox leaf gel phytochemical content, antioxidant capacity, and possible health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* pp 55, 68-96.

Martínez-Romero D, Alburquerque N, Valverde JM, Guillén F, Castillo S. y Valero D, Serrano M. (2009). Postharvest sweet cherry quality and safety maintenance by Aloe vera treatment: A new edible coating. *Postharvest Biol Tec.*; 39 (1): pp 93-100.

Ravula R, Shah NP. 2001. Freezing conditions frozen out. *Dairy Industries International* 10:22–26.

Shahidi F. y Han XQ. (1993). *Crit Rev Food Sci Nutr* 33, pp 501–547