

Diseño de encapsulados de *Lactobacillus casei* y su efecto en el peso de ratones Balb/c

Barrón González MP*, Medrano Cosme AE, Eguiarte Lara DJ, Cuellar Guevara FL, Quiñones Gutiérrez Y, Medina Ortiz VA.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria, Pedro de Alba S/N, CP: 66455. Monterrey, Nuevo León, México. *maria.barrongn@uanl.edu.mx

RESUMEN:

Los probióticos son reconocidos como microorganismos vivos que cuando se integran a la microbiota presentan efectos benéficos sobre el individuo que los consume. El objetivo del estudio consiste en diseñar cápsulas conteniendo *Lactobacillus casei* con capacidad de liberación a pH7, comparar la ganancia de peso de los ratones Balb/c alimentados con alimento comercial y capsulas de *L. casei*. El estudio experimental se llevó a cabo con 30 ratones cepa Balb/c desde el destete hasta los 55 días de nacidos, el estudio radica en la distribución de dos grupos de estudio, 1) Grupo: 15 ratones alimentados con cápsulas conteniendo un concentrado *L. casei*, 2) Grupo: 15 ratones alimentados con alimento comercial. Se observó que el grupo con mayor promedio de ganancia de peso fue el grupo que recibió alimento comercial + cápsulas de *L. casei*, el cual presentó un peso de 23.86g y el peso del control fue de 18.33 g. Otro parámetro evaluado fue la determinación de las UFC/ ml, el cual se observó con un valor de 39×10^6 para el grupo alimentado con alimento comercial + cápsulas con *L. casei*, en tanto que el grupo alimentado solo con alimento comercial presentó un valor de 98×10^5 UFC..

ABSTRACT:

Probiotics are recognized as living microorganisms that when they are integrated into the microbiota have beneficial effects on the individual who consumes them. The objective of the study is to design capsules containing *Lactobacillus casei* with a capacity to release at pH7, to compare the weight gain of Balb / c mice fed with commercial feed and *L. casei* capsules. The experimental study was carried out with 30 mice strain Balb / c from weaning until 55 days of age, the study is based on the distribution of two study groups, 1) Group: 15 mice fed with capsules containing an *L. casei* concentrate, 2) Group: 15 mice fed with food commercial. It was observed that the group with the highest average weight gain was the group that received commercial feed + *L. casei* capsules, which presented a weight of 23.86g and the weight of the control was 18.33 g. Another parameter evaluated was the determination of the CFU / ml, which was observed with a value of 39×10^6 for the group fed with commercial feed + capsules with *L. casei*, while the group fed only with commercial feed presented a value of 98×10^5 CFU/mL..

Palabras clave: Probióticos, *Lactobacillus casei*, Balb/c

Key Words: Probiotics, *Lactobacillus casei*, Balb/c

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Probióticos y encapsulados

Desde los orígenes de la humanidad, se han buscado estrategias que brinden un bienestar integral de humano y de los animales, en la búsqueda de estrategias encaminadas al establecimiento y control de la salud en humanos y en animales, se llegó a acuñar por primera vez en 1965 el término de probiótico (Fuller, 1989; Galina M, *et al.*, 2009).

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se ingieren tienen efectos beneficiosos sobre el equilibrio y las funciones fisiológicas de la microflora intestinal humana (Fuller, 1992). Los probióticos se han definido recientemente como "microbios vivos que transitan por el tracto gastrointestinal y al hacerlo benefician la salud del consumidor (Tannock *et al.*, 2000). Estas definiciones de bacterias probióticas generalmente concuerdan en que las bacterias probióticas deberían ser organismos vivos para conferir beneficios para la salud. Se ha informado que los probióticos desempeñan un papel terapéutico al modular la inmunidad, disminuir el colesterol, mejorar la tolerancia a la lactosa y prevenir algunos cánceres (Kailasapathy and Chin, 2000).

En el pasado reciente, ha habido una explosión de productos de salud a base de probióticos, principalmente en forma de productos lácteos fermentados y suplementos dietéticos. Actualmente, hay más de 70 productos "Bifidus" y

"Acidophilus" en todo el mundo, incluidos varios productos lácteos fermentados (Shah, 2001). La viabilidad de las bacterias probióticas en un producto en el punto de consumo es una consideración importante para su eficacia, ya que tienen que sobrevivir durante el procesamiento y la vida útil de los alimentos y suplementos, tránsito a través de condiciones ácidas altas del estómago y enzimas y sales biliares en el intestino delgado.

El consumo de probióticos a un nivel de 10^8 - 10^9 UFC/g por día es una cifra comúnmente citada para el consumo adecuado de probióticos, que equivale a 100 g de un producto alimenticio con 10^6 - 10^7 UFC/g (Kebary, 1996; Lee y Salminen, 1996, Dave y Shah, 1997c). El análisis de productos probióticos en muchos países diferentes ha confirmado que las cepas probióticas exhiben una supervivencia deficiente en productos lácteos fermentados tradicionales (Shah, 2000, Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). Las preparaciones probióticas tales como tabletas, polvos, etc. pueden contener conteos viables más bajos. La supervivencia de probióticos en los productos se ve afectada por una serie de factores que incluyen pH, post-acidificación (durante el almacenamiento) en productos fermentados, producción de peróxido de hidrógeno, toxicidad por oxígeno (permeación de oxígeno a través del empaque), temperaturas de almacenamiento, estabilidad en forma seca o congelada, crecimiento deficiente en la leche, la falta de proteasas para descomponer la proteína de la leche en sustancias nitrogenadas más simples y la compatibilidad con el cultivo inicial tradicional durante la fermentación (Dave y Shah, 1997a, b, c; Kailasapathy y Rybka, 1997; Shah, 2000).

Muchos informes indican que existe una supervivencia deficiente de bacterias probióticas en estos productos. Además, la supervivencia de estas bacterias en el sistema gastrointestinal humano es cuestionable. Proporcionar células vivas probióticas con una barrera física contra las condiciones ambientales adversas es, por lo tanto, un enfoque que actualmente recibe considerable interés. La tecnología de encapsulación de células bacterianas probióticas evolucionó a partir del cultivo celular inmovilizado utilizado en la industria biotecnológica. Se han informado varios métodos de encapsulación de bacterias probióticas que incluyen secado por pulverización, extrusión, emulsión y separación de fases.

El procedimiento de microencapsulación más comúnmente empleado se basa en la formación de la cápsula de gel de calcio-alginato. Kappa-carragenano, goma gellan, gelatina y almidón también se usan como excipientes para la microencapsulación de bacterias probióticas. La metodología con la cual se dispone actualmente para la encapsulación de probióticos no puede generar grandes cantidades de cápsulas de tamaño uniforme. Los vehículos alimenticios informados para el suministro de bacterias probióticas encapsuladas hasta el día de hoy son: yogur, queso, helado y mayonesa. Sin embargo, es necesario realizar más estudios sobre la eficacia de la microencapsulación para administrar bacterias probióticas y su liberación controlada en el tracto gastrointestinal.

Animales de investigación

El uso de animales de laboratorio en el desarrollo de investigaciones en biomedicina ha representado e incorporado una fuente sustanciosa de avances científicos (Suárez y Estrada, 2014). La línea de ratones Balb/c, es reconocida como un modelo prominente para la investigación. El hecho que es genéticamente lo mejor caracterizado de todos los mamíferos, aumenta su valor para todos los campos de estudio.

El estado nutricional de un animal está directamente relacionado con la alimentación que recibe. La nutrición es una variable que puede afectar en distintos sentidos, los resultados experimentales obtenidos. Para conseguir buenos resultados se debe contar con un buen procedimiento para la elaboración del alimento y cumplir con los requisitos que debe reunir en su composición debe ser agradable y digerible, el alimento en forma de pellets debe tener una consistencia requerida para que el animal pueda consumirlo, para cubrir las necesidades de mantenimiento y crecimiento del ratón (Suárez y Estrada, 2014).

Los objetivos que se plantearon para este estudio fueron: Comparar la ganancia de peso de los ratones Balb/c alimentados con cápsulas de alginato conteniendo *L. casei*, con capacidad de liberación controlada a pH7. Con este trabajo de investigación experimental, buscamos demostrar que las cápsulas de alginato-calcio conteniendo cultivos viables de *L. casei* tienen la capacidad de liberarse a nivel de intestino e integrarse como parte de la microbiota intestinal, reflejándose en la ganancia de peso y el incremento de UFC/mL en los ratones *M. musculus* cepa Balb/c.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética.

Diseño de cápsulas con probióticos

El diseño de las cápsulas de alginato-calcio (Ag-Ca) conteniendo las células de *L. casei*, así como la evaluación de la liberación controlada de dichas bacterias a diferentes pH, para lo cual se colocaron las cápsulas de Ag-Ca conteniendo una concentración conocida de *L. casei* en medio de cultivo para probióticos a diferente pH desde un rango de 2 hasta 9, y fueron incubadas a 37°C, la metodología empleada se describen en la Figura 1.



Figura 1. Procedimiento para la encapsulación de *L. casei* y evaluación de la liberación controlada a diferentes pH.

Fuentes: Elaboración propia

Evaluación de cápsulas de alginato de calcio conteniendo *L. casei* sobre el peso de *Balb/C*

Se utilizaron 30 ratones *M. musculus* cepa Balb/c, clínicamente sanos, destetos a los 15 días, los cuales fueron divididos al azar en dos grupos y se colocaron en jaulas separadas, ubicadas en las instalaciones de un área especial para la cría y bioensayo de *M. musculus*. Se establecieron dos grupos: 15 ratones conformaron el grupo experimental alimentados con alimento comercial+Cápsulas conteniendo *L. casei* [1:1] (AC+CLa), otros 15 ratones conformaron el grupo control los cuales fueron alimentado solo con el alimento comercial, considerando 4 g por individuo/diario (AC), ambos grupos estuvieron a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, y a libre disposición de agua purificada estéril, la iluminación fue natural y las jaulas permanecieron unidad durante el bioensayo, se realizaron cambio de cama cada tercer día.

Determinación de peso (g): Se registró el peso inicial, inmediatamente al destete y enseguida se les colocó el alimento correspondiente al grupo control y grupo en tratamiento, se realizó el pesaje de manera individual, cada tercer día y se descartó cualquier individuo que estuviera fuera del rango promedio de lectura.

Determinación de las UFC/mL. Bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar vertical CFVL500 se colectó 1g de heces fecales tanto del grupo control como del grupo tratamiento y se procedió a determinar las UFC/mL de acuerdo con Barrón y Quiñones, 2018.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se aprecia las cápsulas diseñadas con la metodología descrita en la Figura 1, las cuales tienen un peso promedio de 75mg y presentan un diámetro promedio de 5 mm (a). Las cápsulas fueron colocadas en el medio y se observa la liberación y crecimiento de *L. casei* en el medio, en el cual se aprecia turbidez



Figura 2. Aspecto de las cápsulas conteniendo *L. casei* (a) y liberación y crecimiento de *L. casei* (b).

Fuentes: Elaboración propia

Al integrar las cápsulas conteniendo *L. casei* a la dieta de *Balb/c* y determinar el parámetro del peso (g) en los ratones Balb/C, los valores se muestran en la Figura 3, los resultados indican que Comparación del peso (g) de ratones Balb/c, en el cual se muestra que los ratones a los cuales se les alimentó con el alimento comercial suplementado con cápsulas conteniendo *L. casei* ganan un 30% más de peso que los ratones alimentados sólo con dieta comercial, según los datos obtenidos al día 22 de experimentación.

Los ratones no mostraron alguna indiferencia al alimento comercial suplementado con cápsulas de alginato de calcio conteniendo *L. casei*, de acuerdo a los resultados obtenidos se observa que el peso registrado durante la primera semana entre el grupo control y el grupo en tratamiento, los valores promedios de peso obtenidos no presentan diferencia significativa entre los grupos, en la segunda semana los valores promedio se encuentran en rangos límite, pero en la tercer semana sí se observa diferencia significativa entre los valores promedio de peso entre el grupo control y el grupo de tratamiento. Se obtuvieron valores promedios de peso de 25.12g para el grupo tratamiento 30.46g.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se aprecia que el uso de los probióticos influyó positivamente en la ganancia de peso de los ratones Balb/c, resultados similares se observaron en el trabajo de Corredor-Matus JR *et al.*, 2014; en el cual observaron la ganancia de talla, peso y concentración de nitrógeno en excretas al evaluar *L. acidophilus* y *L. bifidus* en la dieta del hámster dorado *Mesocricetus auratus*.

Otro parámetro evaluado fue la determinación de las unidades formadoras de colonias al grupo control y al grupo en tratamiento, los valores de UFC/mL se muestran en la Figura 4.

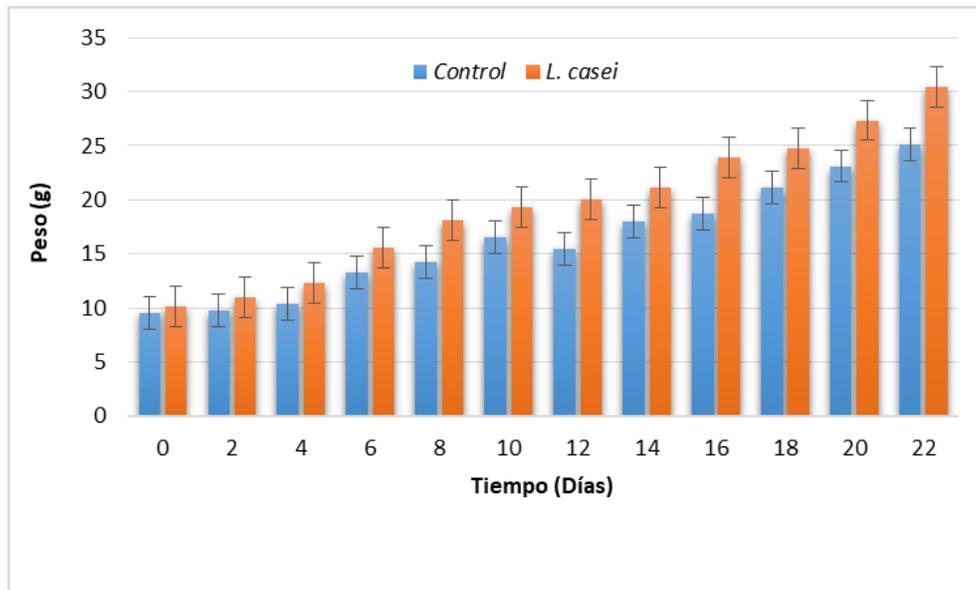


Figura 3. Comparación del peso (g) de ratones Balb/c, en el cual se muestra que los ratones a los cuales se les alimentó con alimento comercial suplementado con cápsulas conteniendo *L. casei* ganan un 30% más de peso que los ratones alimentados sólo con dieta comercial.

Fuentes: Elaboración propia

También se observa que las excretas de los ratones del grupo control presentan un aspecto pastoso, comparadas con las excretas del grupo tratamiento las cuales presentan un aspecto húmedo, lo cual nos podría indicar una mayor facilidad para la evacuación y mantenimiento óptimo de la región del recto, lo que nos puede indicar que el material de desecho permanezca menos tiempo en esta región y en la región del colon y provoquen alteración a nivel de colon, ya sea estreñimiento o indicios de otras complicaciones a nivel de colon.

Existen diversos reportes acerca de la encapsulación o microencapsulación de microorganismos vivos, y una de las grandes dificultades es que dichos microorganismos permanezcan viables, sin embargo esta característica dependerá del tipo de microorganismo que se desea encapsular y el destino de liberación de dicho contenido microbiano, se menciona que entre más grande es la cápsula existe mayor probabilidad de simular las condiciones fisiológicas a las que estará dirigida el microorganismo (Anal AK y Sing H, 2007).

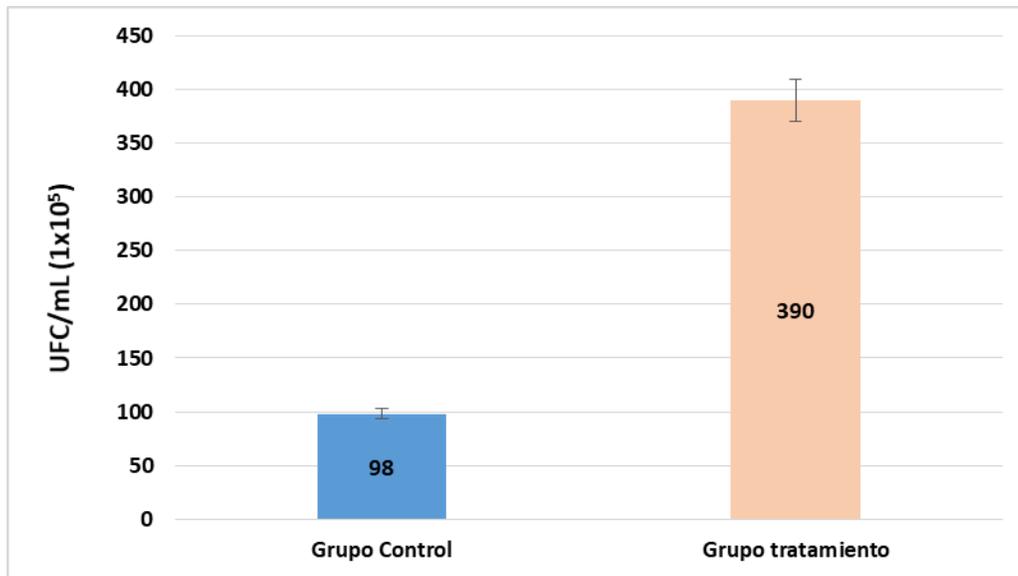


Figura 4. Comparación de las UFC/mL (1×10^5) obtenidas al día 22 de tratamiento, se obtuvo un valor de 98×10^5 UFC/mL en el grupo control y un valor de 390×10^5 UFC/mL en el grupo tratamiento, se observa marcada diferencia significativa entre los valores obtenidos.

En algunos trabajos se reporta que la morfología de las capsulas formuladas con alginato-calcio, tienden a ser esféricas, pero después de 60 días almacenadas a -20°C estas capsulas esféricas pierden dicha morfología (Sousa S, *et al.*, 2015). En el presente bioensayo, las capsulas de alginato-calcio conteniendo *L. casei* se almacenaron a 4°C por un período no mayor a 7 días.

Por otra parte, existen diversos datos concernientes al comportamiento de los ratones Balb/c los cuales no eran el objetivo de evaluación en este trabajo, pero que resultan interesantes, como es el hecho de que los ratones del grupo tratamiento no muestran comportamiento agresivo, en comparación con el grupo control, que suelen mostrar comportamiento agresivo a los integrantes de su mismo grupo al tratar de establecer jerarquías.

El incremento en las UFC/mL de la microbiota presente en las excretas del grupo tratamiento en comparación con el grupo control, nos indica la sobrevivencia e instalación de *L. casei* como parte de la microbiota intestinal de los ratones Balb/c.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que *L. casei* influye positivamente en la etapa de crecimiento de los ratones Balb/c, ya que como menciona Corredor *et al.*, 2014; los lactobacilos sintetizan proteasas y amilasas que facilitan la digestión y absorción de nutrientes, por lo que se le puede catalogar como promotores de crecimiento, pudiendo así representar una alternativa al uso indiscriminado de hormonas, las cuales producen diversos efectos negativos en los consumidores (Chirinos y Larrea, 2007).

Así mismo, se ha reportado el empleo alternativo de bacteriocinas producido por algunos probióticos como alternativa al empleo de antibióticos en animales principalmente aves y porcinos (Ben *et al.*; 2017); y de acuerdo con los resultados obtenidos en futuros trabajos se podrían inducir el consumo o suministro de bacteriocinas a diversos animales a través de microencapsulaciones o diseño de cápsulas con la capacidad de liberar el contenido en la región intestinal deseada.

CONCLUSIÓN

Las capsulas formuladas de alginato-calcio conteniendo *L. casei* suplementadas en la dieta de ratones Balb/c estimulan la ganancia de peso.

BIBLIOGRAFÍA

- Anal AK, Singh H (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial application and targeted delivery. Trends Food Sci Technol 18, 240-251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>
- Barrón González, M.P. and Quiñones-Gutiérrez, Y. (2018) Antibiosis of Cefotaxime/Clindamycin and *Lactobacillus acidophilus* on Related Bacteria to Diabetic Foot Ulcer. Food and Nutrition Sciences, 9, 277-289.
- Ben Lagha A, Haas B, Gottschalk M, Grenier D. (2017). Antimicrobial Potential of Bacteriocins in Poultry and Swine Production; Veterinary Research. 48(1), 22. doi: 10.1186/s13567-017-0425-6.
- Chirinos M, Larrea S. (2007). Impacto en el humano de aditivos hormonales en bovinos. Revista de Investigación Clínica. 59(3), 206-211.
- Corredor-Matus JR, Hernández C, Arias A. (2014). Evaluación de parámetros productivos y nutricionales por el uso de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus bifidus* en la dieta del hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Spei Domus. 10(20), 41-48. doi: <http://dx.doi.org/10.16925/sp.v10i21.917>
- Dave, R.I. and Shah, N.P. (1997a). Effect of level of starter culture on viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts. Food Australia. 49, 164-168.
- Dave, R.I. and Shah, N.P. (1977b). Effectiveness of ascorbic acid as oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. International Dairy Journal. 7, 435-443.
- Dave, R.I. and Shah, N.P. (1997c). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. International Dairy J. 7, 31-41.
- Fuller R. (1989). Probiotics in man and animal. Journal Applied Bacteriology. 66(5), 365-78.
- Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. In: R. Fuller (ed.) Probiotics. The Scientific Basis, Chapman and Hall, London, p.1-8.
- Galina M. (2009). Cinética ruminal y crecimiento de cabritos suplementados con un probiótico de bacterias ácido lácticas. Pastos y forrajes. 32(4),1-12
- Kailasapathy, K., and Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* Immunol. Cell Biology. 78, 80-88.
- Kailasapathy, K., and Rybka, S. (1997). *L.acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* – their therapeutic potential and survival in yoghurt. Australian Journal of Dairy Technology. 52, 28-35.
- Keব্য, K.M.K. (1996). Viability of Bifidobacterium and its effect on quality of frozen zabady. Food Research International. 29, 431-437.
- Lee, Y.L. and Salminen, S. (1996). The coming age of probiotics. Trends Food Science and Technology. 6, 241-245.
- Lourens-Hattingh, A. and Viljoen, B.C. (2001). Review: Yoghurt as probiotic carrier in food. International Dairy Journal. 11, 1-17.
- Shah, N.P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science. 83, 894-907.
- Shah, N.P. (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. Food Technology. 55, 46-53.

- Sousa S, Gomes AM, Pintado MM, Silva JP, Costa P, Amaral MH, Duarte AC, Rodrigues D, Rocha-Santos TAP, Freitas AC (2015). Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food Bioprod Process* 93, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.11.007>
- Suarez Esquivel M, Estrada König S. (2014). Bienestar animal en investigación biomédica. *Revista de Ciencias Veterinarias*. 29, 21-35
- Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Smart, J., and Gopal, P.K. (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR 20. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 2578-2588.