

## Microencapsulados de extracto de florete de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) y su efecto antimicrobiano

R.D Pacheco-Cano<sup>1</sup>, R. Salcedo-Hernández<sup>1,2</sup>, B.E García-Almendárez<sup>3</sup>, J.E Barboza-Corona<sup>1,2</sup>.

1 Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. 2 Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. 3 Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. [Josebar@ugto.mx](mailto:Josebar@ugto.mx)

**RESUMEN:** El brócoli es uno de los productos agrícolas más importantes de Guanajuato, y es considerado a nivel mundial como una fuente de poder nutricional, fitoquímico y terapéutico. Recientemente demostramos que los extractos acuosos obtenidos del florete y tallo de brócoli tienen efecto contra bacterias y hongos de importancia en salud pública, por lo que los compuestos presentes, entre ellos péptidos antimicrobianos, pueden tener uso potencial como bioconservador en alimentos. Este trabajo tuvo como objetivo la microencapsulación de extracto de florete, con almidón modificado, teniendo un rendimiento de 54.82%, también se caracterizaron las Microcápsulas de Extracto de Florete (MEF), térmicamente siendo termotolerante a 120°C. También se evaluó su actividad antimicrobiana contra cepas patógenas de interés alimentario y de salud pública contra cepas de *B. cereus*, *Listeria monocytogenes* sp., *S. aureus* ATCC 27543, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas* sp. y *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802. Mediante microscopía electrónica de barrido se logró caracterizar el tamaño de partícula siendo de 7.854±2.13 µm.

**Palabras clave:** Bioconservador, microencapsulación, péptidos antimicrobianos.

**ABSTRACT:** Broccoli is one of the most important agricultural products in Guanajuato, and is considered worldwide as a source of nutritional, phytochemical and therapeutic power. We recently demonstrated that the aqueous extracts obtained from foil and broccoli stalk have an inhibitory effect against bacteria and fungi of public health importance, so, the present compounds, among them antimicrobial peptides, may have potential use as a biopreservative in foods. This work aimed at the microencapsulation of floret extract, with modified starch, we had a yield of 54.82%, the Microcapsules of Floret Extract (MEF) were also characterized, thermally, antimicrobial activity was thermotolerant at 120°C. Their antimicrobial activity was also evaluated against pathogenic strains of food and public health interest against strains of *B. cereus*, *Listeria monocytogenes* sp., *S. aureus* ATCC 27543, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas* sp. and *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802. By scanning electron microscopy, the particle size was characterized to be 7.854 ± 2.13 µm.

**Keywords:** Antimicrobial peptides, bioconservative, microencapsulation.

**Área:** Microbiología y biotecnología

### INTRODUCCIÓN

México en 2017 (SIAP, 2017) ocupó el quinto lugar a nivel mundial en la producción de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) con 567 mil toneladas. En esta estadística el Estado de Guanajuato se consolidó como el principal productor con un 64.2%. El brócoli es una de las hortalizas más valoradas en los mercados extranjeros por sus grandes beneficios para la salud ya que tiene propiedades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas, entre otras (Moreno *et al.*, 2007; Pacheco-Cano *et al.*, 2017). Las características nutraceuticas de los extractos acuosos del brócoli, entre ellas las antimicrobianas, pueden disminuir con el tiempo), por lo cual es recomendable eliminar el agua aumentando con esto, la vida de anaquel. Una forma de deshidratar una muestra es por medio de la tecnología de la microencapsulación utilizando una matriz, para encerrar los compuestos bioactivos y se pudiera usar sobre un alimento. En este sentido, la microencapsulación de biomoléculas con actividad antimicrobiana, nos permitan extender la vida de anaquel, en los alimentos y darle un valor agregado. La tecnología de microencapsulación se ha definido como la “tecnología de envasado de materiales activos en pequeños “contenedores” (3 a 800 µm) que liberan su contenido con tasas controladas” (Champagne Fustier, 2007; Ahn *et al.*, 2010). La microencapsulación ayuda a la

protección de compuestos bioactivos (antimicrobianos, antioxidantes, enzimas, polifenoles y micronutrientes), lo cual permite mantenerlos activos durante más tiempo (Gouin, 2004; Lee *et al.*, 2013; García-Saldaña *et al.*, 2016; Saldaña *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2016). Por otro lado, existen trabajos relacionados a la microencapsulación de compuestos antioxidantes y anticancerosos de semilla y florete de brócoli, sin embargo, ninguno se ha enfocado a evaluar la actividad antimicrobiana y antifúngica de éstos, por lo cual consideramos que nuestra propuesta es de gran importancia y original. Por ejemplo, Sánchez *et al.*, (2016) microencapsularon y optimizaron el contenido de clorofila, polifenoles y su actividad antioxidante. Asimismo, García-Saldaña *et al.*, (2016) encapsuló sulforafano un compuesto orgánico con actividad anticancerosa, con rendimientos superiores al 80%. En ninguno de estos dos trabajos se estudió la capacidad inhibidora de los microencapsulados de brócoli contra microorganismos patógenos en alimentos. Recientemente reportamos que extractos de brócoli obtenidos de florete y tallo presentan actividad antimicrobiana contra bacterias (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *S. xylosum*, *Shigella flexneri*, *Sh. sonnei*, *Proteus vulgaris*) y hongos fitopatógenos (*Colletotrichum gloeosporioides* y *Aspergillus niger*) de importancia en salud pública y agronómica, demostrándose que parte del efecto inhibitorio es debido a la acción de péptidos antimicrobianos (Pacheco-Cano *et al.*, 2017). En este trabajo se logró con éxito la microencapsulación del extracto de florete, sin perder la actividad inhibitoria contra bacterias de interés alimentario.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la preparación del extracto crudo de brócoli se utilizó un total de 4 cabezas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) cultivar Avenger. Se cortaron las piezas de florete, y posteriormente se maceró en un extractor de jugo. El jugo obtenido se centrifugó a 11,200 g por 30 minutos (Pacheco-Cano *et al.*, 2017). El extracto se pasó por un filtro de 0.45 µm (Millipore, Bedford, MA). El extracto crudo se guardó a -20 °C hasta su posterior uso.

Se determinó sólidos totales del extracto de florete, para este proceso se lavaron y secaron crisoles llevados a peso constante. Se colocó (por triplicado) la cantidad de 1mL del extracto de nuevo se llevó a peso constante. Para los cálculos se utilizó la siguiente formula:

$$S.T = \frac{P_{ms} - P_c}{V}$$

S.T= sólidos totales (g/mL)  
 P<sub>ms</sub> = Peso de materia seca (g)  
 P<sub>c</sub> = Peso del crisol vacío (g)  
 V = Volumen de la muestra (mL)

Para la elaboración de las microcápsulas de extracto crudo de florete, se centrifugo a 1792 g/20 minutos, los sobrenadantes se mezclaron en una relación 50mL extracto de florete/5g almidón modificado previamente esterilizado en UV durante 30 minutos. La mezcla se mantuvo en agitación durante 1 hora a 4°C. La mezcla se procesó usando un mini secador de pulverización (Büchi modelo B-191, Flawil, Switzerland). Las condiciones de secado fueron a una temperatura de entrada de 100 °C, y una temperatura de salida de 46°C; manejando un porcentaje del aspirador de 90% y de la bomba peristáltica de 20%, el polvo resultante es el microencapsulado.

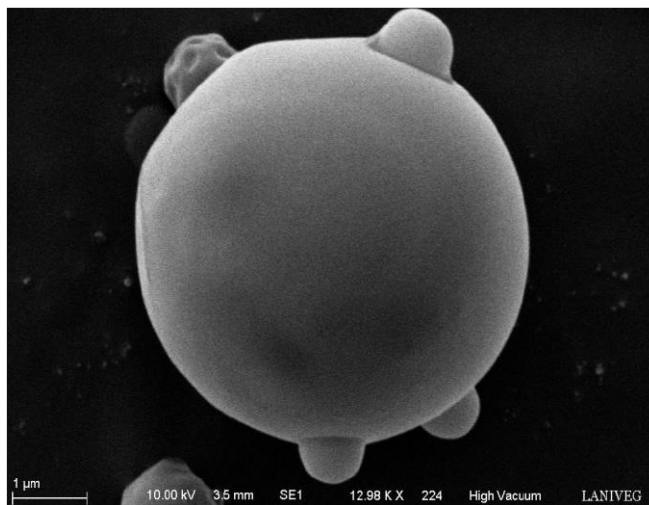
El rendimiento de los microencapsulados de florete se calculó mediante la relación entre la cantidad de polvo producida dividida entre la masa de sólidos en el volumen inicial de extracto más la masa del polímero, la cantidad obtenida se multiplica por 100, para obtener el porcentaje de microencapsulados. Se determinó la morfología y tamaño de microcápsulas mediante microscopia electrónica de barrido (MEB), se utilizó un microscopio EVO-50 (Carl Zeiss). Se determinó la actividad de agua (Aw) de las microcápsulas de extracto florete en un equipo Aqualab modelo CX-2, colocando como control KCl. A las microcápsulas se les evaluó almacenadas en condiciones de refrigeración y temperatura ambiente. Se determinó el efecto de la temperatura sobre los microencapsulados (50, 70, 90 y 120 °C) durante 15 minutos en una incubadora Thermo Shaker® modelo MS-100; para las primeras 3 temperaturas, con una agitación de 1500 rpm, para la temperatura de 120 °C se utilizó una autoclave.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los microencapsulados, por el método de difusión de pozos, este método consiste en una mezcla de agar bacteriológico/CST al cual se le agregó 115  $\mu\text{L}$  ( $\sim 1 \times 10^9$  células/mL), para 20 mL y se vierte en placa Petri hasta que solidifique y se realizaron pozos con un sacabocado de 7 mm de diámetro. A cada pozo se agregó 100  $\mu\text{L}$  de microencapsulados diluidos en agua destilada estéril en dos concentraciones una de 0.5 g/mL y 1 g/mL. Después se colocarán en refrigeración a  $-4^\circ\text{C}$  durante 12 horas y posteriormente se incubarán entre  $28$  y  $37^\circ\text{C}$  según las temperaturas óptimas para cada bacteria, durante al menos 12 horas, finalmente se midió el halo de inhibición. Se define una unidad de actividad (U) como igual a  $1\text{ mm}^2$  de la zona de inhibición del crecimiento de la bacteria indicadora (Barboza-Corona y col. 2007). Cabe destacar que se realizó el ensayo por triplicado. Se utilizaron cepas de interés alimentario como: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas* sp. y *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802. Estas cepas son colección del laboratorio de biotecnología y microbiología molecular de la Universidad de Guanajuato. También se utilizaron bacterias ácido-lácticas (BAL), *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241 (LA-5<sup>®</sup>) y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*/*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R-704<sup>®</sup>) de la marca Chr. Hansen A/S (Donadas por la Dra. Gabriela Hernández Rodríguez), estas se crecieron en medio MRS líquido. Todas las bacterias fueron crecidas a  $37^\circ\text{C}$ , a excepción de las BAL y *Bacillus cereus* las que se incubaron a  $28^\circ\text{C}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Microencapsulación de extracto de florete de brócoli

Cuando el tamaño de partícula es entre 3 y 800  $\mu\text{m}$ , se les llama microcápsulas (Ahn y *et al.*, 2010). En nuestro trabajo el tamaño promedio de partícula de los MEF fue de  $7.854 \pm 2.13\ \mu\text{m}$ . Los MEF tienen una estructura esférica lisa (Figura 1) y otras tienen una estructura rugosa. Los MEF pueden contener en su interior compuestos como antioxidantes, polifenoles, anticancerígenos (Sulforafano) y péptidos con actividad antimicrobiana.

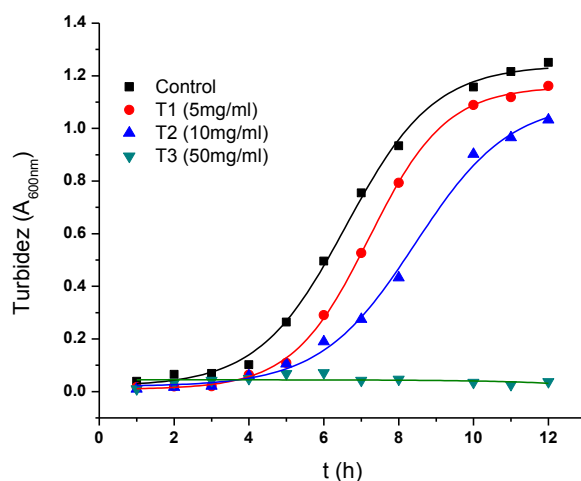


**Figura 1.** Microcopia electrónica de barrido de microencapsulado de extracto de florete.

### Actividad antimicrobiana de MEF

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son el resultado de comer o beber alimentos contaminados, por sustancias químicas, metales pesados, parásitos, hongos, virus y bacterias. Estas bacterias tienen las características de producir síntomas de fiebre, escalofríos, dolor abdominal, náusea y en el caso de *L. monocytogenes* puede desarrollar enfermedades serias en pacientes de alto riesgo (mujeres embarazadas y recién nacidos). Se evaluaron la actividad antimicrobiana de los MEF, contra bacterias potencialmente patógenas, de las cuales 3 correspondieron a Gram (+) y 3 más a bacterias Gram (-). Se utilizaron dos concentraciones para MEF de 1g/mL y 0.5g/mL, después de la

microencapsulación, el extracto conservó su actividad antimicrobiana (Tabla 1), en algunos casos mayor que los extractos de florete sin microencapsular, esto debido a la concentración de los extractos y a la retención de compuestos antimicrobianos en las capsulas de polímeros de almidón modificado, como control negativo se utilizó almidón modificado 1g/mL y 0.5g/mL sin tener actividad inhibitoria contra las bacterias. Los MEF no obtuvieron actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. En concentraciones de 1g/mL MEF obtuvo mayor actividad antimicrobiana contra *Salmonella* mientras que a 0.5 g/mL la mayor actividad la obtuvo en *Vibrio parahaemolyticus*. Cabe mencionar que este es el primer trabajo de investigación de microcápsulas de brócoli que se evaluó la actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas. Esta evaluación antimicrobiana es de gran interés ya que nos permitirá en un futuro evaluar las microcápsulas en recubrimientos comestibles o incorporarlos como aditivos alimentarios, y otra ventaja es que encapsulan los olores que pueden ser no muy favorables sin tratamiento de encapsulación.



**Figura 2.** Efecto antimicrobiano de las concentraciones de MEF, utilizando como bacteria indicadora *B. cereus* 183.

En la (Figura 2) se realizó una regresión no lineal con el modelo de Boltzman. El control línea negra (*B. cereus* 183) tiene un máximo de crecimiento de  $6.59 \text{ h} \pm 0.08$  y con un tiempo de duplicación celular es de  $1.26 \text{ h} \pm 0.18$ ; utilizando una concentración de 5 mg/mL (línea roja) el máximo crecimiento fue a las  $7.2 \text{ h} \pm 0.03$ , esto indica que hubo un retraso en el crecimiento y con un tiempo de duplicación celular de  $1.44 \pm 0.15$ , con respecto al control, sin embargo con la concentración de 10 mg/mL (línea azul) se obtuvo un efecto bacteriostático, impidiendo su reproducción de la bacteria, aunque no la mato, su tiempo máximo de crecimiento fue a las  $8.44 \text{ h} \pm 0.17$  y un tiempo de duplicación de  $2.363 \pm 0.34$ . Con la concentración 50mg/mL (línea verde) tuvo un efecto bactericida, ya que mato a la bacteria, su densidad óptica se mantuvo por debajo de 0.1 y en decrecimiento.

| Microorganismo                          | MEF (1g/mL)    MEF (0.5g/mL) |          |
|---|------------------------------|----------|
|   | (UA)                         |          |
| <i>Bacillus cereus</i>                  | 1646±1.4                     | 981±0.70 |
| <i>Listeria monocytogenes</i>           | -                            | -        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543 | 239±0.70                     | 155±0.70 |
| <i>Salmonella</i>                       | 1769±0.70                    | 1751±0   |
| <i>Pseudomonas</i> sp.                  | 575±0.70                     | 402±1.4  |

|                                |           |           |
|--------------------------------|-----------|-----------|
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 1629±0.70 | 1779±0.70 |
|--------------------------------|-----------|-----------|

### Estabilidad térmica de MEF

Se evaluó la estabilidad térmica de los encapsulados, frente a diferentes temperaturas (50°,70°,90° y 120°C) ya que si los microencapsulados tienen la ventaja de tener agentes antimicrobianos los cuales pueden ser incorporados en alimentos como aditivos y muchos procesos tienen la característica de ser llevados a tratamientos térmicos como por ejemplo la pasteurización (bebidas de frutas y verduras), que se lleva a temperaturas de 100°C, otro tratamiento es la esterilización que se lleva a temperaturas de 115-127°C, existen procesos que utilizan la cocción y hornos de microondas, en el primer caso como ejemplo son las frituras en aceite que se manejan temperaturas de 180-250°C. Es por eso la importancia de evaluar a diferentes temperaturas y además que conservar el olor y sabor del brócoli. En la (Tabla II) se utilizó una bacteria indicadora en este caso *B. cereus* para evaluar su sensibilidad a diferentes temperaturas. En MEF podemos apreciar que a 50°C ambas actividades son similares y con relación al control disminuyó considerablemente y otra característica importante es que a concentración de 0.5 g/mL obtuvo mucho mayor actividad que a una concentración de 1mg/mL. Por lo tanto, es de gran interés los resultados obtenidos en MEF por su termorresistencia a diferentes temperaturas ya que esto no afectó su actividad antimicrobiana de las MEF, esto puede servir para su posible uso en la elaboración de productos alimenticios donde se utilicen temperaturas altas y como recubrimientos comestibles o simplemente como aditivos en carnes frescas ya que tienen un gran potencial contra bacterias ETAs.

### Actividad de agua $A_w$

La actividad de agua en los alimentos es muy importante ya que esto es un indicativo que nuestro producto puede tener una vida de anaquel mucho más estable, considerando factores de crecimiento de microorganismos a partir de 0.87, y bacterias halófilas hasta 0.75. Algunas especies de mohos xerófilas y levaduras osmofílicas pueden crecer (0.60-0.70). Aunque para la producción de micotoxinas la mínima  $a_w$  es de 0.80. Algunas bacterias patógenas de interés alimentario son: *Bacillus cereus* (0.92-0.93), *Salmonella* (0.94), *Clostridium botulinum* (0.93-0.97), *Clostridium perfringens* (0.93) *Escherichia coli* 0157:H7 (0.95), *Staphylococcus aureus* (0.83-0.85), *Listeria monocytogenes* (0.90-0.93) (Beuchat y *et al.*, 2013). Nuestros MEF, tuvieron valores de 0.4035±0.002 estuvieron por debajo de los valores mínimos de la actividad de agua que permite el crecimiento de estos microorganismos patógenos.

**Tabla II.** Estabilidad térmica de MEF, utilizando la técnica de difusión de pozos, usando como bacteria indicadora *B. cereus*. 1mm<sup>2</sup> es igual a una unidad internacional (UA)

| Temperaturas °C | MEF (1g/mL) | MEF (0.5g/mL) |
|-----------------|-------------|---------------|
|                 | (UA)        | (UA)          |
| Control (TA)    | 1646±1.4    | 981±0.70      |
| 50              | 296±0.12    | 296±0.73      |
| 70              | 264±0.69    | 296±0.48      |
| 90              | 233±0.69    | 263±0.19      |
| 120             | 176±0.26    | 204±0.5       |

### BIBLIOGRAFÍA

- Barboza-Corona JE, Vázquez-Acosta H, Bideshi D, and Salcedo-Hernández, R. 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Arch Microbiol. 187 (2):117-126
- Pacheco R.D, Salcedo R, Lopez J.E, Bideshi D.K, Barboza J.E. 2017. Antimicrobial activity of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) cultivar Avenger against pathogenic bacteria, phytopathogenic filamentous fungi and yeast. Journal of Applied Microbiology. 126-135.

SIAP, 2017. <https://www.gob.mx/siap/es/articulos/mexico-produjo-567-mil-toneladas-de-brocoli-en-2017?idiom=es>)

Beuchat L.R, Komitopoulou E, Beckers H, Betts R.P, Bourdichon F, Fanning S, Joosten H. M, Ter Kuile B.H. 2013. Low-Water activity foods: Increased concern as vehicles of foodborne pathogens. Journal of Food Protection. 76: 150-172.