

CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE MICROENCAPSULADOS DE GOMA ARÁBIGA EN LECHE, FRENTE A MICROORGANISMO MESÓFILO Y PSICRÓTROFO

Boiero, M. Laura¹; González Estévez, Virginia¹; Allasia, Mariana¹; Sarmiento, Paula Victoria¹

Tutores: Moyano, Silvia¹; Montenegro, A. Mariana^{1,2}

¹ Departamento de Química. Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Villa María, Av. Universidad 450. Villa María. Córdoba. Argentina. ² Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas, UNVM, Campus Universitario Arturo Jauretche 1555, Villa María, Córdoba, Argentina. lauraboiero@hotmail.com

RESUMEN

La leche es un alimento rico en sustancias nutritivas, que la convierten en un medio favorable para el desarrollo de microorganismos causantes de alteraciones nutricionales y organolépticas. Si bien posee un mecanismo de protección natural contra las degradaciones, ejercido por inmunoglobulinas, enzimas y vitaminas, ésta es débil y, puede alterarse fácilmente durante el procesamiento y almacenamiento, haciendo necesaria la adición exógena de conservantes de la calidad. Existe una nueva tendencia a la preservación de los alimentos mediante la adición de compuestos naturales. Sin embargo, por su estructura química estos compuestos suelen ser altamente reactivos e hidrofóbicos, por lo que una forma de estabilizarlos y solubilizarlos en medios acuosos es la microencapsulación. Un biopolímero ampliamente empleado para estabilización y solubilización de compuestos bioactivos tales como carotenoides, es la Goma Arábiga (GA), a la que se han atribuido propiedades biológicas tales como actividad antioxidante y actividad antimicrobiana (AAM). El objetivo del trabajo, fue evaluar la AAM de GA y β -caroteno (BC) microencapsulado en GA (BC-GA), a través de secado por aspersión, adicionados en leche, frente a un microorganismo mesófilo productor de “*off-flavour*” como *Bacillus subtilis* (*Bs*) y a un psicrótrofo como *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps*). Se determinó el efecto antimicrobiano de los compuestos puro BC y GA por el método de difusión en agar. La velocidad de crecimiento (μ) de *Bs* y *Ps* en leche, con o sin agregado de microencapsulado, se determinó a la temperatura óptima del microorganismo, empleando la técnica de recuento en placa, a través de siembra en profundidad. Los resultados obtenidos indican que la GA y el microencapsulado BC-GA poseen una moderada AAM frente a ambos microorganismos, lo que la convierte en un excelente preservante de origen natural, reduciendo la pérdida de la calidad nutricional del alimento.

1- INTRODUCCIÓN

La pérdida de la calidad nutricional de un alimento puede ocurrir tanto por oxidación química de sus componentes como por desarrollo microbiano durante las diferentes etapas de producción. Debido a que la leche y los productos lácteos son alimentos con una compleja matriz, ricos en sustancias nutritivas, tales como: proteínas, glúcidos, lípidos y sales, a una determinada temperatura de almacenamiento, se convierten en blancos susceptibles a ambos tipos de alteraciones, siendo principalmente un medio favorable para el desarrollo de microorganismos psicrótrofos ($T_{\text{óptima}}$ de crecimiento 0-7°C) y psicrótrofos mesófilos ($T_{\text{óptima}}$ de crecimiento \approx 20°C). El crecimiento microbiano genera alteraciones organolépticas que involucran pérdidas del “flavor” (sabor y aroma) asociadas a la generación de compuestos volátiles de aroma indeseado, con la consecuente pérdida del valor nutricional [1].

Si bien la leche posee una protección natural contra las degradaciones oxidativas y microbiológicas, ésta es débil, y puede alterarse fácilmente durante el procesamiento y almacenamiento, por lo que deben ser adicionados exógenamente. Existe una nueva

tendencia a la preservación de los alimentos mediante el empleo de compuestos naturales que puedan actuar como antioxidantes y antimicrobianos. Estos compuestos pueden ser vitaminas, aceites esenciales, carotenoides, polifenoles, etc.

Los carotenoides son eficientes antioxidantes naturales, ya que impiden la formación de Especies reactivas de oxígeno (EROS) o disminuyen su concentración, protegiendo a compuestos biológicos de la acción dañina de las mismas [2,3]. Además, existen indicios de que presentan también capacidad antimicrobiana, para inhibir el desarrollo de los microorganismos causantes de las degradaciones y apariciones de “off-flavor” [4]. Sin embargo, debido a su estructura química, no son fácilmente dispersables en sistemas acuosos y son altamente lábiles y reactivos a las condiciones ambientales, por lo que se emplea una técnica efectiva para estabilizarlos y solubilizarlos en matrices acuosas para su empleo en medios biológicos, la microencapsulación con biopolímeros [5]. Un polisacárido natural ampliamente utilizado en la industria alimenticia es la GA, que es el exudado de los árboles de *acacia*, *Acacia senegal* (L.) y *Acacia seyal*. Su estructura química consiste básicamente en un grupo de macromoléculas caracterizadas por una elevada proporción de carbohidratos (97%), siendo D-galactosa y L-arabinosa los monosacáridos predominantes y una baja proporción de proteínas (1-3%). Numerosos trabajos han demostrado que GA posee efectos biológicos benéficos sobre el metabolismo de los lípidos, enfermedades renales cardiovasculares y gastrointestinales, siendo principalmente atribuidos a la composición aminoacídica de la fracción proteica [6,7].

En cuanto a la actividad antimicrobiana de GA, pocos estudios han sido realizados, informando principalmente que presenta actividad inhibitoria del crecimiento de ciertas especies patógenas periodontales (agente implicado en la placa bacteriana), tales como *Prophyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* [8]. Sin embargo, hasta el momento no se han realizados estudios de la AAM de GA con el fin de ser adicionado a una matriz alimenticia, tal como la leche, y protegerla del desarrollo microbiano, principalmente de aquellos microorganismos capaces de resistir condiciones de pasteurización, provistos de enzimas hidrolíticas, que generan *off-flavour* en el alimento, tales como, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* y aquellos en que la temperatura de almacenamiento es óptima para su desarrollo, como *Pseudomona aeruginosa*.

El objetivo del trabajo es evaluar la capacidad antimicrobiana de BC y GA puros y del microencapsulado de BC en GA (BC-GA), frente a microorganismos psicrótrofo y mesófilo. En particular, determinar la capacidad de dichos compuestos para reducir la velocidad de crecimiento del microorganismo mesófilo, *Bs*, y del psicrótrofo, *Ps*.

2- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- Reactivos

En el trabajo se utilizaron β -caroteno (BC) de Sigma Aldrich (MO) y GA provista por Colloids Naturals Brasil.

2.2- Microorganismos

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6066 obtenidas de (American Type Culture Collection, Rockville, MD), fueron usadas como cultivos de referencia.

2.3- Medios de Cultivos

Para el método de difusión en agar se empleó el medio Agar Mueller Hinton (AMH). Como medio de cultivo para el desarrollo de los microorganismos se empleó leche fluida larga vida (UAT) de marca reconocida en el mercado. Para el recuento en placa de los

microorganismos se utilizaron los medios Agar Glucosa-Peptona de Caseína, para desarrollo del género *Bacillus*, y Agar Cetrimide para el desarrollo del género *Pseudomonas*, ambos de Britania, Argentina.

2.4- Microencapsulación

La microencapsulación de BC en GA (BC-GA) como material de pared se realizó por el método de secado por aspersión, (LabPlant SD-04) en Laboratorio de Química de Alimentos (FEA- UNICAMP, Brasil). De la misma forma, también se realizaron microencapsulados de GA, quedando la cápsula sin relleno en su interior (GA-Mic).

2.5- Actividad Antimicrobiana (AAM)

2.5.1- Método de Difusión en Agar

Como un ensayo preliminar a la determinación de la AAM en muestras de leche se evaluó el efecto antimicrobiano de los compuestos puro BC y GA frente a los microorganismos estudiados por el *Método de Difusión en Agar*, de acuerdo a la técnica descrita por Bauer y col. [9], la cual se basa en la medición del diámetro de una zona de inhibición del crecimiento bacteriano, generado por difusión del compuesto en el agar. El tamaño de la zona, indica la sensibilidad del microorganismo a dicho antimicrobiano.

Suspensiones de cada microorganismo fueron preparadas para contener aproximadamente 10^7 UFC/ml usando la escala de McFarland como estándar (Biomérieux Inc.). Placas conteniendo AMH fueron inoculadas con las suspensiones microbianas. Alícuotas de 20 μ L de soluciones de antimicrobiano AM con concentraciones crecientes de 1 a 50 μ M fueron pipeteadas sobre discos de papel de filtro estériles de 5 mm de diámetro y cada uno fue colocado sobre las placas previamente inoculadas. Las placas fueron incubadas por 24 h a 32 °C. El diámetro de la zona de inhibición de crecimiento fue medido con una precisión de 0.02 mm incluyendo el diámetro del disco. Por lo tanto un diámetro de 5 mm corresponde a ausencia de efecto inhibitorio del crecimiento microbiano.

2.5.2- Método de Recuento en Placa

Con el objetivo de obtener la velocidad de crecimiento microbiano (μ), con y sin la adición de antimicrobiano (AM), se desarrollo la técnica de recuento microbiano, empleando una dilución $\times 10^3$ UFC/ml, del cultivo puro de *Bs* y *Ps* ambos en fase exponencial. Cada uno de estos, se inoculó en una muestra de 20 ml de leche, que luego fue dividida en dos porciones, de manera de obtener la misma concentración inicial del inóculo. A una de las muestras, se le adiciona el compuesto AM y la restante actúa como control positivo del desarrollo microbiano. Para el desarrollo de *Bs*, ambas muestras se incuban a 32°C durante 30hs, mientras que para el de *Ps* se incubaron a 4°C durante 10 días. Este procedimiento se realiza para BC-GA y GA-Mic.

A determinados intervalos de tiempo, se realizó la siembra de 1 ml en profundidad, de cada una de las muestras de leche con y sin AM, en Agar Glucosa-Peptona de caseína, como medio de cultivo específico para *Bs*, y en Agar Cetrimide para el desarrollo de *Ps*. Las placas se incubaron durante 48hs a 32°C. Luego de dicho período, se realizó el recuento en UFC/ml y se graficó en función del tiempo.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en Cabina de Seguridad Microbiológica Biohazard Clase II (BIO-II-A) bajo flujo laminar. Además todos los materiales usados en los experimentos fueron previamente esterilizados.

3- RESULTADOS

3.1- Método de Difusión en Agar

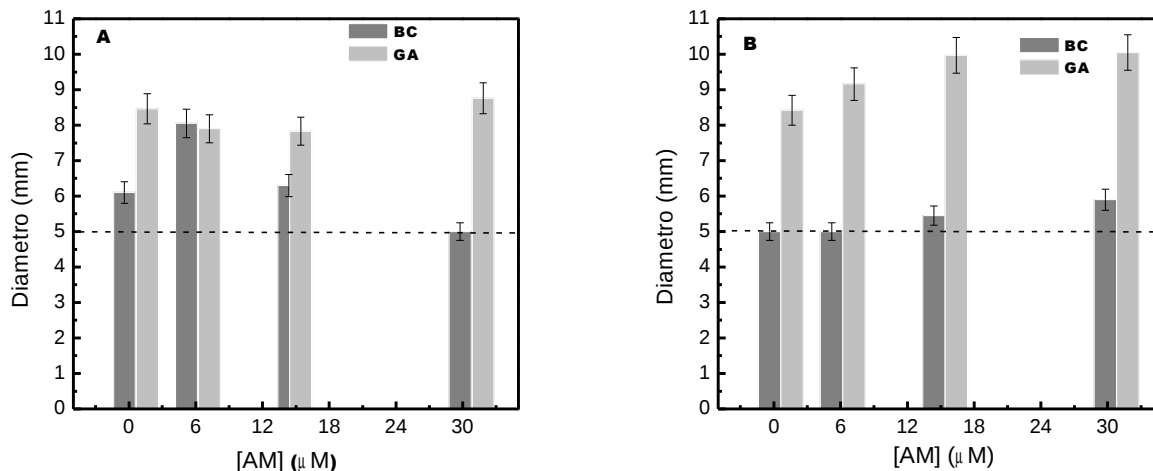


Figura 1. Inhibición de crecimiento microbiano por BC y GA puros frente a A) *Bacillus subtilis*, B) *Pseudomonas aeruginosa*.

En este ensayo se determinó la inhibición de crecimiento bacteriano que ejercen los BC y GA puros frente a los microorganismos estudiados. La Figura 1 muestra los diámetros de las zonas de inhibición de crecimiento presentados por distintas concentraciones de BC y GA frente a *Bs* (1A) y *Ps* (1B) respectivamente.

Para ambos microorganismos se observa que GA presenta un mayor efecto inhibitorio del crecimiento que BC, la misma es prácticamente independiente de la concentración. Se observa que *Bs* presenta una mayor resistencia a GA, mientras que *Ps* es el microorganismo más resistente a BC, lo cual se deduce de los menores valores de diámetros de inhibición obtenidos. Cabe destacar que todos los diámetros de las zonas de inhibición son translúcidas indicando efecto bacteriostático, de reducción de velocidad de crecimiento.

3.2- Método de Recuento en Placa

La velocidad de crecimiento (μ) de un cultivo de *Bs* y *Ps* en leche, con y sin agregado de BC-GA en diferentes concentraciones se determinó a partir de la curva de crecimiento del microorganismo empleando la técnica de recuento microbiano, realizando siembra en profundidad, de cada una de las muestras, en el agar específico para el desarrollo de la cepa, a determinados intervalos de tiempo. Luego del período de incubación, se realizó el recuento en UFC/ml. Las velocidades de crecimiento de un cultivo de *Bs* y *Ps* en leche con y sin agregado de BC-GA almacenada a 32°C y 4°C, respectivamente, se determinaron a partir de las pendientes de la porción lineal de las curvas de crecimiento del microorganismo, Figura 2.

A partir de los valores presentados en la Tabla 1 se pueden calcular los porcentajes de disminución de las velocidades de crecimiento. Para *Bs* se observa que esta disminución se incrementa con la concentración de BC-GA. Comparando los valores obtenidos para ambos microorganismos a la misma concentración de BC-GA, se observa

que *Ps* es menos resistente al microencapsulado, lo cual es concordante con los valores de los diámetros de inhibición de crecimiento mostrados en la Figura 1.

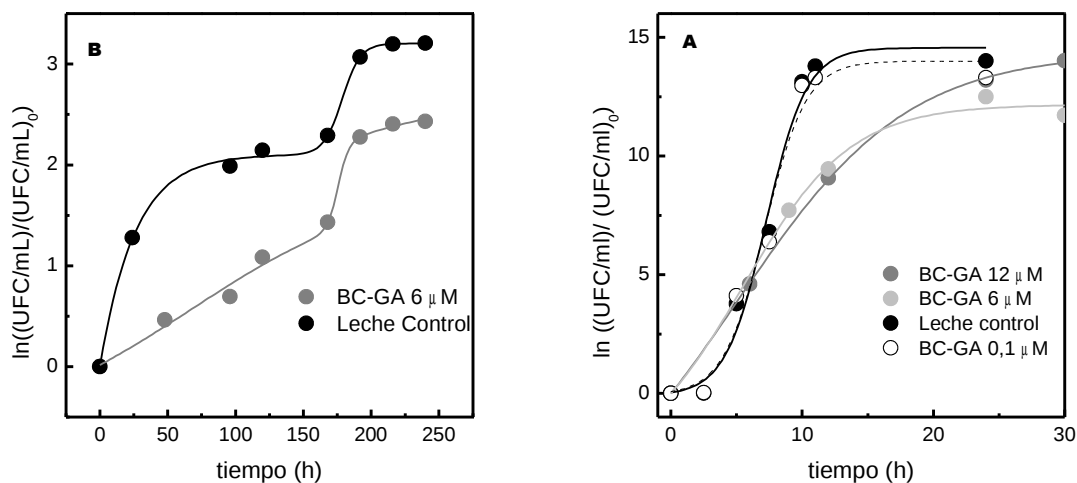


Figura 2. A) Curva logarítmica de crecimiento de *Bacillus subtilis* a 32°C en Leche (●) Leche control, (○) Leche adicionada de BC-GA 0,1 μM, (◐) Leche adicionada de BC-GA 6 μM y (◑) Leche adicionada de BC-GA 12 μM. **B)** Curva logarítmica de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a 4°C en Leche (●) Leche control, (◐) Leche adicionada de BC-GA 6 μM.

Tabla 1. Velocidad de crecimiento de *Bs* y *Ps* en leche con y sin agregado de BC-GA.

Concentración BC-GA (μM)	Velocidad de Crecimiento Microbiano μ (UFC/ml.h)		
	<i>Bacillus Subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
0,1	μ _{L+I} = 1,1500	μ _{L+ BC-GA} = 1,1155 (3%)	
6	μ _{L+I} = 0,9203	μ _{L+ BC-GA} =0,8032 (13%)	μ _{L+I} = 0,0128 μ _{L+ BC-GA} =0,0106 (17 %)
13	μ _{L+I} = 0,8507	μ _{L+ BC-GA} =0,7564 (11 %)	

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de los ensayos de difusión en agar para los compuestos puros indican que GA posee una capacidad antimicrobiana moderada frente a los microorganismos estudiados. Mientras que BC solo presenta una mínima actividad frente a *Bs*. Estos resultados estarían indicando que el efecto inhibitorio y de reducción de crecimiento microbiano que se pueda observar del agregado del microencapsulado BC-GA, podría deberse casi exclusivamente al componente GA.

Para los ensayos de actividad antimicrobiana en leche puedo observarse que la reducción de la velocidad de crecimiento fue mayor para *Ps*, indicando una mayor sensibilidad de este microorganismo al microencapsulado.

Se ha demostrado que la estructura y composición química de los agentes antimicrobianos es de gran importancia, dado que esto determinará su localización y orientación en la membrana lipídica, y finalmente, el efecto que tenga sobre la célula bacteriana. Investigación reciente, indica que la protección del daño oxidativo en las

membrana por los carotenoides, puede deberse a la modificación de las propiedades físicas de la fase lipídica de la misma. BC es una molécula hidrofóbica, que carece de grupos polares, por lo que su posible orientación en la membrana lipídica, estaría gobernada por interacciones Van Der Waals con las cadenas hidrocarbonadas, incorporándose en el núcleo hidrofóbico de la membrana. Esta ubicación, no genera modificaciones importantes en la estructura, ni en la funcionalidad de la membrana, por lo que su efecto AAM es menor que el de un compuesto polar.

La AAM mostrada por GA puede atribuirse a enzimas tales como oxidasas, peroxidasas y pectinasas presentes en la fracción proteica de la misma. Para algunas de estas enzimas se han demostrado sus propiedades antimicrobianas [¹⁰,¹¹]

Por último podríamos indicar que los resultados obtenidos potencian la aplicación del microencapsulado BC-GA, que generalmente es empleado como antioxidante, pudiéndose usar como un preservador de alimentos que podría proteger la calidad nutricional y microbiológica del mismo.

5- REFERENCIAS

1. Karatapanis, A.E.; Badeka, A.V; Riganakos, K.A.; Savvaidis, I.N.; Kontominas, M.G. (2006). Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. *International Dairy Journal*, 16, 750-761.
2. Palozza, P.; Krinsky, N.I. Antioxidant Effects of Carotenoids in Vivo and in Vitro. *Method Enzymol.* 213, 403, 1992.
3. Montenegro, M.A.; Nazareno, M.A.; Durantinil, E.N.; Borsarelli, C.D. (2001). Singlet Oxygen Quenching Ability of Carotenoids in a Reverse Micelle Membrane Mimetic System. *Photochem. Photobiol.* 75, 353-361.
4. Fleischer, T.C.; Ameade, E.P.; Mensah, M.L.K.; Sawyer, I.K. (2003) Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*, 74:136-38.
5. Borgogna, M.; Bellich, B.; Zorzini, L.; Lapasin, R.; Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122, 416-423.
6. Glover, D.A.; Ushida, K.; Phillips, A.O.; Riley, S.G. (2009). Acacia(sen) SUPERGUM™ (Gum arabic): An evaluation of potential health benefits in human subjects. *Food Hydrocolloids* 23, 2410-2415.
7. Matsumoto, N.; Riley, S.; Fraser, D.; Al-Assaf, S.; Ishimura, E.; Wolever, T.; Phillips, G.O.; Phillips, A.O. (2006). Butyrate modulates TGF-beta1 generation and function: potential renal benefit for Acacia (sen) SUPERGUM (G.A.)? *Kidney Int.* 69, 257-265.
8. Clark, D.T.; Gazi, M.I.; Cox, S.W.; Eley, B.M.; Tinsley, G.F. (1993). The effects of Acacia arabica gum on the in vitro growth and protease activities of periodontopathic bacteria. *J Clin Periodontol.* 20, 238-43.
9. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, S.C.; Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology.* 45, 493-496.
10. Tyler, V., Brady, L., & Robbers, J. (1977). *Pharmacognosy*. 7th ed (p. 66–80). Philadelphia: Lea & Febiger.
11. Kirtikar, K. R., & Basu, B. D. (1984). *Indian medicinal plants*. (2nd ed.). Delhi, Periodical Expert Book Agency. Vol. 3, pp 1596 -1598.