

ARTÍCULO ORIGINAL

Desarrollo de una técnica para la microencapsulación de probióticos.**Development of a technique for microencapsulation of probiotics.**

**Martín Villena MJ¹, Morales Hernández ME¹, Gálvez Martín P¹, Clares Naveros, B¹;
Ruiz Martínez MA¹.**

¹Titulacion: Farmacia. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada
Campus universitario de Cartuja, Facultad de Farmacia, Granada, CP: 18071.
marise@correo.ugr.es

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los probióticos son “*microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios en la salud del hospedador*”. Sin embargo, el principal problema que se presenta a la hora de incorporar bacterias probióticas en un producto cualquiera, es la escasa resistencia de estos microorganismos a los procesos tecnológicos y ambientales, lo que supone un gran inconveniente para su inclusión en productos alimentarios o farmacéuticos.

En este sentido, las técnicas de microencapsulación son de un gran interés porque permiten aislar a las bacterias mediante una cubierta, evitando así, su exposición a las condiciones adversas. Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido desarrollar una técnica de microencapsulación compatible con una cepa probiótica destinada a formas farmacéuticas para el tratamiento de la vaginitis.

MATERIALES Y MÉTODOS: La técnica propuesta es la emulsificación-gelificación iónica interna². Una vez obtenidas las micropartículas, se procede al análisis de la supervivencia de los probióticos microencapsulados, mediante el método desarrollado por Sheu y cols³. La evaluación del tamaño de partícula se llevo a cabo mediante microscopia óptica.

RESULTADOS: La viabilidad del probiótico a lo largo del proceso de síntesis de las partículas se reduce en 1 log UFC. El tamaño de partícula está comprendido entre 40-240 micrómetros, o el predominando, el intervalo de 120 a 160 micrómetros.

DISCUSIÓN: La técnica desarrollada es compatible con el probiótico propuesto, obteniéndose una viabilidad, que permitiría alcanzar la dosis necesaria para el restablecimiento de la microbiota vaginal con tan solo un gramo de producto. Así mismo, el tamaño de las partículas, se considera aceptable para la terapéutica tópica.

PALABRAS CLAVE: Probitoicos, microencapsulacion, gelificacion ionica, alginato, vaginitis.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Probiotics are "live microorganisms administered in adequate amounts confer health benefits on the host". But the main problem, when probiotics are incorporated in some products is their low resistance to technological and environmental processes. In this sense, microencapsulation techniques are good methods to protect the bacteria from adverse conditions since, it isolates bacteria from the environment and protect them from detrimental conditions. The aim of this study was to perform a microencapsulation technique compatible with the probiotic strain to develop a form for vaginal administration.

MATERIALS AND METHODS: The ionic emulsification-internal gelation was used. After obtaining the microparticles, it was analyzed the survival of microencapsulated probiotics, using the method developed by Sheu et al. The evaluation of particle size was carried out by optical microscopy.

RESULTS: During the process of microencapsulation, the viability of probiotic was reduced by 1 log CFU. The range of particle size is between 40-240 micrometers, although most of the particles were between 120 and 160 micrometers.

DISCUSSION: The developed technique is compatible with the probiotic, since the viability of microencapsulated product, allows us to obtain a pharmaceutical form optimal for vaginal

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 479-484.

administration with 1g of particles. Likewise, particle size is also considered acceptable for topical therapy.

KEYWORDS: probiotics, microencapsulation, ionic gelation, alginate, vaginitis.

INTRODUCCIÓN

Los probióticos se definen como “*microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios en la salud del hospedador*”¹. Determinadas enfermedades, el estrés, el uso de medicamentos, etc. pueden destruir el equilibrio entre las especies beneficiosas y otras cepas bacterianas patógenas, causando un cuadro infeccioso. El restablecimiento del balance de las poblaciones bacterianas, tanto a nivel gastrointestinal como sobre la piel, mediante la administración de bacterias probióticas puede dar lugar a múltiples beneficios, por lo que la utilización de los probióticos como potenciadores de la salud es una de las **áreas más prometedoras** dentro de la investigación en diversos campos como el alimentario o el farmacéutico.

Sin embargo, el principal problema que se presenta a la hora de incorporar bacterias probióticas en un producto cualquiera es la **escasa resistencia** de estos microorganismos a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales, como el pH, el oxígeno o la temperatura.

En este sentido, las técnicas de **microencapsulación** son de un gran interés porque permiten aislar a las bacterias mediante una cubierta, evitando así, su exposición a las condiciones adversas del entorno y permitiendo, la administración de los probióticos en un amplio rango de productos. Pero para que un sistema de este tipo sea útil, además, tiene que ser capaz de vehiculizar una carga suficiente y liberarla de acuerdo con un perfil establecido. Algunas de las tecnologías que se han utilizado para la protección de otras sustancias (componentes alimenticios o fármacos), tales como la evaporación del disolvente y/o atomización de las mezclas mediante la extrusión de las mismas a través de un capilar, se han intentado aplicar con las bacterias **sin resultados positivos** en cuanto a viabilidad y tamaño de partícula.

OBJETIVO

Por lo tanto, el objetivo ha sido desarrollar una técnica de microencapsulación compatible con la cepa probiótica *Lactobacillus fermentum* CECT5716. Este procedimiento, deberá producirse bajo condiciones operativas suaves, que aseguren un alto nivel de supervivencia de las bacterias después del tratamiento. Y que a su vez, permita alcanzar tamaños de partícula convenientes, asegurando la cesión de las bacterias microencapsuladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Método de microencapsulación:

La técnica propuesta para la microencapsulación del *Lactobacillus fermentum* es la **emulsificación-gelificación iónica interna**². Se parte de una solución acuosa de alginato sódico al 5% (P/V), a una temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Esta temperatura se mantuvo constante durante toda la síntesis, así como la agitación mecánica a 700 rpm.

A esta solución se le añade 1 gramo del probiótico liofilizado bajo agitación continua hasta su completa dispersión. A continuación, se añade el carbonato cálcico. Constituyendo esto, la fase acuosa de la emulsión.

La fase oleosa, formada por aceite de soja y Span 80, se incorpora a la fase acuosa, agitando hasta obtener una emulsión de fase externa oleosa.

A la emulsión A/O resultante, se le adiciona el ácido acético glacial. Este ácido actúa como precursor en la formación de las micropartículas, es decir, inicia la gelificación interna propiamente dicha. Se produce un intercambio de los iones sodio del alginato por los iones calcio presentes en el medio y esto origina la gelificación del polímero presente en las gotículas de agua. De este modo, se forman las micropartículas pregelificadas quedando las bacterias atrapadas en la matriz polimérica.

Las micropartículas formadas se separan de la emulsión oleosa mediante la incorporación de cloruro cálcico. Esta sal aporta más iones calcio, por lo que contribuye a la consolidación de la estructura tridimensional originada por el polímero y al endurecimiento de las partículas que ofrecen, de este modo, una mayor protección a las bacterias microencapsuladas.

Una vez obtenidas las micropartículas, se procede al análisis de la supervivencia de los probióticos microencapsulados. Para ello, es necesario liberar previamente las bacterias de las micropartículas. Por este motivo, 1 gramo de partículas se pusieron en contacto con tampón fosfato (0,1M y pH 7) durante 30 minutos a temperatura ambiente y agitación suave³, con la intención de despolimerizar las cadenas de alginato y debilitar la matriz. A esto contribuye el hecho de que los grupos fosfato actúan secuestrando los iones calcio, necesarios para la conformación estructural de las micropartículas, y, en consecuencia, revierten la encapsulación⁴.

Una vez liberadas las bacterias, se preparan las diluciones apropiadas y se procede al cultivo en MRS agar y al recuento de las colonias resultantes tras la incubación durante 24 horas en un ambiente anaerobio y a 37°C .

Evaluación del tamaño de partícula

El diámetro de 100 partículas se determinó mediante microscopía óptica, empleando un microscopio Olympus BX40, equipado con cámara Olympus SC35.

RESULTADOS

Viabilidad del probiótico

La tabla 1 muestra la concentración de probiótico de partida, así como, el peso de las micropartículas y las UFC (unidades formadoras de colonias) totales y por gramo. La viabilidad del probiótico a lo largo del proceso de síntesis de las partículas se reduce en 1 log UFC. En cuanto a las UFC/g, se desprende que empleando menos de un gramo de dichas partículas, se conseguiría una dosis de 10^8 UFC, dicha dosis, es la requerida para llevar a cabo el restablecimiento de la microbiota vaginal, que se ve afectado en patologías como las vaginitis⁵.

Tamaño de partícula

El tamaño de partícula está comprendido entre 40-240 micrómetros, siendo el predominante, el incluido entre 120 y 160 micrómetros.

Tabla 1. Supervivencia del probiótico *Lactobacillus fermentum* microencapsulado.

SÍNTESIS	Conc. Prob (ufc totales)	Peso de μ partículas obtenidas (g)	Viabilidad del producto microencapsulado			
			(ufc totales)	log	(ufc/g)	Log
1	1,1E11	40,1	0,52E9	9,75	0,13E8	7,11
2	1,3E11	32,5	1,5E10	10,17	4,5E8	8,65
3	0,85E11	30,7	2,4E10	10,38	7,9E8	8,89
Media $\pm \sigma$	(1,08 \pm 0,22)E11	34,4 \pm 4,98	(1,3 \pm 1,18)E10	10,1 \pm 0,32	(4,18 \pm 3,89)E8	8,2 \pm 0,96

CONCLUSIONES

Se ha diseñado una técnica compatible con el probiótico y con la que la viabilidad se reduce un orden de magnitud, lo que se puede considerar aceptable, ya que la concentración final del producto obtenido permitiría alcanzar una dosis adecuada con 1g de

dicho producto. La utilización del alginato de sodio, un polímero que se caracteriza por su naturaleza atóxica, proporciona a las bacterias un ambiente suave, lo que contribuye a incrementar la viabilidad de las mismas. Cabe destacar también, su bajo coste económico^{6,7,8}.

Así mismo, el tamaño de partícula obtenido, se considera aceptable tanto para la terapéutica oral como para la tópica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la empresa Biosearch Life S.A., propietaria de la patente del probiótico *Lactobacillus fermentum* CECT5716, que ha proporcionado el mismo de manera gratuita.

BIBLIOGRAFIA

1. FAO/ WHO (2001). Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Repor.<<http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>>.
 2. Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J.P., Neufeld, R.J. and Fournier, A.(1992). Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. Applied Microbiology Biotechnology, 38, 39–45.
 3. Sheu T. Y, Marshall R. T. (1993) Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels. Journal of Food Science, 54:557-561.
 4. Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P, Jones M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect Lactobacillus spp in simulated gastric conditions. J Microbiol Meth. 2004; 56:27-35.
 5. Reid G, Beuerman D, Heinemann C, Bruce A.W, Probiotic Lactobacillus dose required to restored and maintains a normal vaginal flora. FEMS Immunol Med Microbiol. 2001; 32: 37-41.
 6. Klein J, Varlop k. D. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. 1983; 18:86-91.
 7. Tanaka H, Masatose M, Veleky I. A. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate beads. Biotechnology and Bioengineering.1984; 26:53-58.
 8. Martinsen A, Skajak- Braek C, Smidsrod O. Alginate as immobilization material. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. Biotechnology and Bioengineering.1989; 33.79:89.
-