

Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos.

Martín Villena MJ, Morales Hernández ME, Gallardo Lara V y Ruiz Martínez MA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España.
E-mail: adolфина@ugr.es

RESUMEN

A la hora de utilizar probióticos, el principal problema que se presenta, es la escasa resistencia de estos a diferentes condiciones ambientales y tecnológicas. Las técnicas de microencapsulación son un buen método para proteger a estos microorganismos, sin embargo no todas las técnicas son apropiadas para los probióticos. En este artículo proponemos la técnica de gelificación interna, que por sus características permite la obtención de un tamaño de partícula adecuado y la supervivencia de los microorganismos.

PALABRAS CLAVE: Alginato. Gelificación interna. Probióticos. Técnicas de microencapsulación.

ABSTRACT

The main problem when probiotics are used is the low resistance of these to different environmental and technological conditions. The microencapsulation techniques are a good method in order to protect the probiotics, Nevertheless not all techniques of microencapsulation are suitable for probiotics. In this paper, we propose the internal gelification which allows us to obtain a suitable particle size and the survival of the microorganisms.

KEYWORDS: Alginate, Internal gelation. Probiotics. Microencapsulation techniques

INTRODUCCION:

La OMS define a los probióticos como organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador. Para que las bacterias puedan considerarse como probióticos es necesario que cumplan las siguientes características¹:

- Ser de origen humano ya que las cepas aisladas de seres humanos sanos presentan mayor facilidad para colonizar el intestino humano y probablemente no sean patógenas, habiéndose utilizado para definir esta característica el acrónimo inglés “GRAS” (“generally recognized as safe”)
- Deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales, ya que los microorganismos probióticos han de llegar viables al lugar de acción.

Si tenemos en cuenta que los probióticos son principalmente consumidos por vía oral, es lógico pensar, que sus efectos beneficiosos se pondrán de manifiesto, fundamentalmente, en patologías intestinales. Sin embargo, la posibilidad de modular la respuesta inmune de tipo sistémica, hace que los probióticos también presenten efectos positivos en otras alteraciones extraintestinales, como alergias y vaginitis.

Sin embargo, el problema que se presenta a la hora de incorporar probióticos a cualquier formulación, es la escasa resistencia de los microorganismos a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales como el pH, el oxígeno o la temperatura.

Por todo esto, es necesario que los microorganismos se introduzcan protegidos por una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno. Para ello, recurrimos a las técnicas de microencapsulación, que consisten en el recubrimiento de pequeñas cantidades de un determinado compuesto mediante un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica.

La microencapsulación protege a los materiales encapsulados de factores como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad, también se ha utilizado para mejorar el sabor y la estabilidad de medicamentos y como barrera contra malos olores y sabores. Ayuda, además, a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia. En el caso de fármacos cuya liberación se lleve a cabo en el estómago o en el intestino, permite una máxima absorción de los compuestos con un mínimo de reacciones adversas. Además la microencapsulación protege a los probióticos de los bacteriófagos y de los ambientes adversos, como la congelación y las soluciones gástricas, y facilita la manufacturación de productos fermentados, ya que, proporciona unas condiciones más constantes.

La selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del coste.

MÉTODOS DE MICROENCAPSULACION:

Existen diversos métodos para la producción de microcápsulas. En general, estos métodos se pueden dividir en tres grupos²:

- Procesos físicos: secado por aspersión.
- Procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular.
- Procesos fisicoquímicos: coacervación, liposomas y gelificación iónica.

Secado por aspersión:

Es la transformación de un fluido en material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado en caliente³. La distribución del tamaño de las partículas obtenidas por este método es, en general, menor a 100 μ . Se distinguen los siguientes pasos:

1. La preparación de la emulsión o suspensión del material a encapsular en una solución encapsuladora.
2. La atomización y la deshidratación de las partículas atomizadas.

Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para

materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto.

Polimerización interfacial:

En este proceso se produce la polimerización de un monómero en la interfase de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana, que dará lugar a la pared de la microcápsulas. Este proceso tiene lugar en tres pasos²:

1. Dispersión de una solución acuosa de un reactante soluble en agua, en una fase orgánica para producir una emulsión agua en aceite
2. Formación de una membrana polimérica en la superficie de las gotas de agua, iniciada por la adición de un complejo soluble en aceite a la emulsión anterior.
3. Separación de las microcápsulas de la fase orgánica y su transferencia en agua para dar una suspensión acuosa. La separación de las microcápsulas se puede llevar a cabo por centrifugación.

Incompatibilidad polimérica:

En este método se utiliza el fenómeno de separación de fases, en una mezcla de dos polímeros químicamente diferentes e incompatibles en un mismo solvente. El material a encapsular interaccionará solo con uno de los dos polímeros, el cual se adsorbe en la superficie del material a encapsular formando una película que los engloba. De manera general, este proceso se lleva a cabo en solventes orgánicos y cuando el material a encapsular es sólido².

Coacervación:

Es un método físico-químico que se basa en la separación de fases, consiste en tres pasos²:

1. Formación de un sistema de tres fases químicamente inmiscibles (una fase líquida o fase continua, un material a recubrir y un material de cobertura o de pared)
2. Deposición del material polimérico líquido que formará la cubierta sobre el material a cubrir
3. Solidificación de la cubierta.

Con esta técnica, se pueden obtener microcápsulas esféricas muy pequeñas, de hasta de 4 μm y con una carga de material a encapsular de alrededor del 90%. Además, proporcionan una buena protección contra las pérdidas por volatilización y contra la oxidación.

Liposomas:

Los liposomas son partículas microscópicas hechas de lípidos y agua principalmente. Son estructuras compuestas de una bicapa de lípidos que engloban un volumen acuoso. Se elaboran con moléculas anfifílicas que poseen sitios hidrofóbicos, por ejemplo, fosfolípidos como la lecitina. En la fase acuosa, se coloca el material a encapsular cuando es hidrofílico o bien se agrega en el solvente orgánico donde se disuelven los fosfolípidos, si es lipofílico².

Gelificación iónica:

Existen dos técnicas de gelificación⁴:

Gelificación externa:

En la gelificación externa, la sal de calcio soluble es agregada en el seno de una emulsión A/O. El tamaño de partícula no puede ser bien controlado y las partículas tienden a coagular en grandes masas antes de adquirir la consistencia apropiada. Además, el tamaño de partícula que se obtiene es grande,

entre 400µm y 1mm.⁵

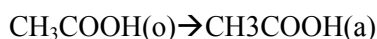
Gelificación interna:

La gelificación interna se basa en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble en una solución de alginato de sodio. Esto se lleva a cabo por acidificación de un sistema aceite-ácido soluble, con participación en la fase acuosa del alginato. Esta técnica permite obtener partículas de un tamaño de aproximadamente 50 µm.⁵

De acuerdo con esta técnica, a la fase acuosa, generalmente formada por alginato y carbonato cálcico, se le adiciona la fase oleosa (aceite vegetal, Span 80 y ácido acético).

Las reacciones que se producen son las siguientes⁶:

1. Difusión del ácido acético desde la fase oleosa a la acuosa.



2. El hidrogenión es liberado del ácido acético a la fase acuosa



3. El calcio es liberado por la reacción entre el hidrogenión y la sal insoluble de calcio.

4. El gel de alginato se forma gradualmente a través de la reacción entre el calcio y los residuos de los ácidos glucurónicos de la cadena, formándose la estructura que se conoce como “egg-box” (Figura 1) en la que, metafóricamente, los huevos serían los iones de calcio.

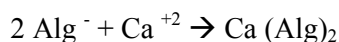
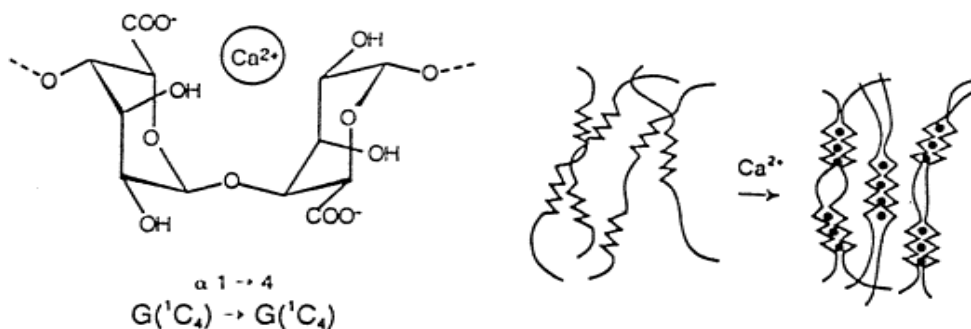


Figura 1. Formación del gel de alginato cálcico.



El gel de alginato cálcico formado es permeable a moléculas solubles en agua, cuyos pesos moleculares sean menores a 5000 dalton. Moléculas mayores también pueden difundir a través del gel, pero si el peso molecular excede los 10.000 dalton, la difusión no ocurre. La excepción a esto, la constituyen los lípidos, que permanecen en la matriz aun cuando sean de peso molecular bajo.

En la gelificación interna, una serie de parámetros han sido estudiados, tales como⁴:

- Tiempo de agitación con el ácido acético glacial:

Al aumentar el tiempo de contacto 10 veces se observa que la encapsulación del paracetamol aumenta 3 veces, esto podría deberse a que se lleva a cabo una gelificación más completa debido a una mayor

liberación de iones calcio desde el complejo insoluble carbonato cálcico.

- Tiempo de contacto de las micropartículas con la solución de cloruro cálcico:

Si bien es necesario un tiempo de reacción, el mismo no debe ser excesivo, debido a que facilitara la difusión del principio activo por gradiente de concentración. Se observó que al disminuir el tiempo de contacto, se obtuvieron mejores resultados en la encapsulación y, consecuentemente, mayor rendimiento total de micropartículas.

- Concentración de iones calcio:

Parece ser un parámetro crítico en la producción de micropartículas. La influencia de la concentración de ión calcio fue evaluada con tres concentraciones diferentes (157; 314; 629 nM). Se observó que a medida que se incrementó la concentración, aumentó el rendimiento total de micropartículas y la encapsulación de principio activo.

Coberturas utilizadas en microencapsulación:

Independientemente del método elegido para preparar las microcápsulas, el primer paso en la encapsulación será la selección de una matriz de encapsulación adecuada³. (Tabla 1)

Tabla 1. Materiales empleados en la encapsulación.

| Tipo de cobertura | Cobertura específica |
|------------------------|--|
| Gomas | Agar, alginato de sodio, carragenina, goma arábiga |
| Carbohidratos | Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz |
| Celulosas | Etilcelulosa, metilcelulosa, acetilcelulosa, nitrocelulosa, carboximetil-celulosa |
| Lípidos | Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácido esteárico, trisetearina |
| Proteínas | Gluten, caseína, albúmina |
| Materiales inorgánicos | Sulfato de calcio, silicatos |

Entre los agentes encapsulantes que se utilizan destacan:

- Las proteínas aisladas del suero de la leche, utilizadas como cobertura en el secado por aspersión. Este material posee alta capacidad emulsificante y genera microcápsulas de tamaño inferior a 2 micrómetros. Pueden utilizarse solas o combinadas con carbohidratos para modificar las propiedades de la pared y el tamaño de las partículas. El uso de proteínas del suero de la leche tiene efectos sobre

la morfología de las microcápsulas haciéndolas más esféricas y de superficie tersa en comparación con los polisacáridos.

- Los alginatos son uno de los polímeros más utilizados en la microencapsulación. Se extraen principalmente de tres especies de algas marrones (*Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*). Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales no ramificados, que contienen cantidades variables de ácido (1,4) β -D-manurónico y de ácido α -L-gulurónico. La composición y extensión de las secuencias y el peso molecular determinan sus propiedades físicas.

Los alginatos han sido empleados como agentes espesantes, gelificantes y estabilizantes coloidales en la industria alimentaria y gracias a sus propiedades, también se han podido aplicar en el entrapamiento y liberación de fármacos y microorganismos. Estas propiedades son:

- Permitir que la encapsulación se lleve a cabo a temperatura ambiente.
- No requerir solventes orgánicos tóxicos
- Elevado grado de porosidad
- Permitir una alta velocidad de difusión para macromoléculas, y la posibilidad de controlar dicha difusión.
- Disolverse y degradarse bajo condiciones fisiológicas normales.

Métodos de liberación:

La liberación del contenido de las microcápsulas se puede llevar a cabo por disolución en agua, esfuerzos de cizalla, temperatura, reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. No obstante, esta liberación puede controlarse por difusión a través de la pared de la microcápsula o bien por medio de una membrana que recubre la pared³.

La permeabilidad a través de la matriz y la solubilidad de los componentes de la pared de la cápsula influyen en la velocidad de difusión. Por todo esto, la selección de una matriz o membrana es importante, tiene también especial relevancia, la naturaleza química, morfológica, la temperatura de transición, el grado de hinchamiento y de entrecruzamiento de los componentes de la cubierta, ya que pueden disminuir la velocidad de liberación.

Vistas todas las características de las diferentes técnicas de microencapsulación y conociendo las propiedades de nuestro material (los probióticos), la elección del método de encapsulación depende de varios factores. En el caso de la encapsulación de probióticos son:

- Tamaño de partícula:

El tamaño deseado oscila entre 15-100 μ m, las microcápsulas mayores a 100 μ m son detectables en la boca, y las inferiores a 15 μ m no dan la suficiente protección frente a los agentes externos⁷.

- La técnica no debe emplear agentes externos agresivos que pudieran limitar la supervivencia de los microorganismos.
- Se requerirá, además, un bajo consumo energético, de forma que los costes de la técnica sean rentables industrialmente.

Según todo lo expuesto anteriormente, la gelificación iónica interna, se perfila como una de las mejores técnicas para la microencapsulación de probióticos ya que es una técnica sencilla y

económica, que se puede emplear para producciones a gran escala.^{8, 9} Los Trabajos de diversos autores, han demostrado que los probióticos microencapsulados con alginato, el polímero mas empleado en la gelificación iónica, ven incrementada su supervivencia hasta en un 80-95%,^{8,9} frente a los no encapsulados^{10,11,12,13}. El alginato calcio, además, no es tóxico, es barato y se degrada bajo condiciones fisiológicas normales¹⁴. Las bacterias de un tamaño entre 1-3 μm se retienen bien en la matriz del gel, que tiene un tamaño de poro menor de 17 nm^{15,16}.

CONCLUSIONES: una visión de futuro

Como ya se ha indicado anteriormente, el hecho de que los probióticos se administren generalmente por vía oral, puede conducir a pensar erróneamente que sus efectos beneficiosos se producen únicamente a nivel del tracto gastrointestinal. Sin embargo, el tracto gastrointestinal no es el único nicho bacteriano, hay otros órganos que tienen su ecosistema bacteriano, como las invaginaciones y la piel.

Algunos estudios han demostrado la eficacia de los probióticos en el tratamiento de las vaginitis¹⁷ esto podría deberse a que crean un ambiente ácido que puede impedir el desarrollo de otros microorganismos.

La microbiota cutánea, tiene también una serie de funciones claves:

- Es barrera física y química para evitar la entrada de microorganismos.
- Disminuye el daño provocado por la radiación ultravioleta.
- Evita la oxidación.
- Produce nutrientes que son utilizados por las células que forman la piel.
- Son responsables del olor.

En todos estos ámbitos podrían tener aplicación la técnica que proponemos, así como su empleo en alergias, prevención de infecciones de la piel, cremas antienvjecimiento y un largo etcétera.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Arribas B, Rodriguez M.E, Camuesco D, Zarzuelo A, Gálvez J. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharm* 2008; 49(1)
2. Yáñez J, Salazar J.A, Chaires L, Jiménez J, Márquez M, Ramos E.G. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y perspectiva* vol.21
3. Pedroza Islas R. Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de Alimentos para larvas de especies acuícolas. VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 2002.
4. Rodríguez-LLimos A.C, Chiappetta D, Szeliga M.E, Fernández A, Bregni C. Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol. *Ars Pharmaceutica*,44:4;333-342,2003.
5. Liu Q, Michael Rauth A, Yu Wu X. Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogel microspheres formulated by an emulsification-internal gelation-adsorption-polyelectrolyte coating method. *Int. J. Pharmaceut.* 2007
6. Xiu-dong L, Wei-ting Y, Jun—zhang L, Xiao-jun M, Quan Y. Diffusion of Acetic Acid

- Across Oil/Water Interface in Emulsification-Internal Gelation Process for Preparation of Alginate Gel Beads. *CHEM. RES.CHINESEU*. 23(5), 579-584, 2007.
7. Effect of homogenization on bead size and viability of encapsulated *L. Acidophilus* 33200, *L. Casei* 279, *B. Longum* 536 and *L.Rhamnosus GG*
 8. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H, Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Journal* 13, 3-13. 2003
 9. Mandal S, Puniya A.K, Singh. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei NCDC-298*. *International Dairy Journal* 16(2006)1190-1995
 10. Audet P, Paquin C, Lacroix C. Immobilized growing lactic acid bacteria with k-carrageenan-locust bean gum gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29,11-18,1998
 11. krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H.E. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. *Inernational Dairy Journal*, 13,3-13.2003
 12. Sheu T, Marshall R.T Improving survival of culture bacteria in frozen dessert by microencapsulation. *Journal of Dairy Science*,47(Suppl.1),107. 1991
 13. Sheu T, Marshall R.T, Heymann, H. Improving survival of culture bacteria in frozen dessert by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76, 1902-1907.
 14. Jun-Nan C, Ming-Ju C, Je-Ruei L, Chin-Wen L, Hsin-Yi C. Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. *Journal of food science*.Vol.70, Nr.5, 2005
 15. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International dairy journal* 14 (2004)737-743.
 16. Klein, J, stock J, Vorlop K.D. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*,18(1)86-91.1983
 17. Reid G, Probiotic Agnet to protect the urogenital tract against infection. *Am J.Clim Nutr* 2000;73(suppl):4375-4435