

# Actividad antimicrobiana de $\beta$ -caroteno microencapsulado en goma arábica frente a microorganismos en leche

Bernardo Sigifredo<sup>1</sup>; Virginia Gonzalez Estevez<sup>1</sup>; María Laura Boiero<sup>1</sup>;

Silvia Moyano<sup>1</sup> y Mariana Angélica Montenegro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química – Facultad Regional Villa María – Universidad Tecnológica Nacional. Villa María. Córdoba. Argentina.

<sup>2</sup>Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas – UNVM. Villa María, Córdoba, Argentina.

lboiero@frvm.utn.edu.ar

## Resumen

La refrigeración es una de las estrategias más aplicadas para conservar la leche cruda de la descomposición. Sin embargo, esto favorece la selección de microorganismos psicrótrofos, muchos de los cuales son capaces de producir enzimas extracelulares (como proteasas y lipasas) que pueden ser termoestables. La acción de dichas enzimas afecta la composición química y nutricional de la leche, repercutiendo en los rendimientos durante la elaboración de productos derivados. La aplicación de sustancias naturales antimicrobianas podría proveer una nueva estrategia para controlar este problema. El objetivo del trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de goma arábica y  $\beta$ -caroteno microencapsulado en goma arábica adicionados en leche, frente a cepas ATCC de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, y frente a microorganismos aislados de leche cruda, *Enterococcus* spp. y enterobacterias. El aislamiento se realizó a través de siembra en profundidad, de una dilución  $10^{-2}$  de leche cruda, empleando agar de recuento total. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 horas y a 4°C durante diez días. Las bacterias aisladas fueron identificadas en base a la morfología de colonia, tinción de Gram y pruebas bioquímicas. La velocidad de crecimiento se determinó empleando la técnica de recuento en placa. Los resultados obtenidos indican que goma arábica y  $\beta$ -caroteno microencapsulado en goma arábica poseen una actividad antimicrobiana moderada frente a los microorganismos evaluados, presentando un efecto bacteriostático, convirtiéndolos en un preservante alternativo de origen natural, que permite mantener la calidad nutricional de la leche.

**Palabras clave:** Actividad antimicrobiana, leche,  $\beta$ -caroteno, goma arábica.

## Introducción

La pérdida de la calidad nutricional de un alimento muchas veces está originada en el 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, como proteínas, glúcidos, lípidos y sales– a una determinada temperatura de almacenamiento se convierten en blancos susceptibles a estas alteraciones, constituyendo un medio favorable para el desarrollo de microorganismos psicrótrofos (temperatura óptima de crecimiento 0–7°C) y psicrótrofos-mesófilos (temperatura óptima de crecimiento >20°C).

El crecimiento microbiano genera alteraciones en los componentes de la leche, lo que se traduce en pérdidas del "flavor" (sabor y aroma) asociadas a la generación de compuestos volátiles de aroma indeseado. Además, la alteración de la composición de la matriz produce una pérdida en el valor nutricional (Karatapanis *et al.*, 2006) y una reducción del rendimiento en la elaboración de productos derivados.

Si bien la leche posee una protección natural contra las degradaciones microbiológicas, ésta es débil y puede alterarse fácilmente durante el procesamiento y almacenamiento, por lo que deben ser adicionados compuestos antimicrobianos. Existe una nueva tendencia a la preservación de los alimentos mediante el empleo de compuestos naturales que puedan actuar como antimicrobianos. Estos compuestos pueden ser vitaminas, aceites esenciales, carotenoides, polifenoles, etc.

Existen indicios de que los carotenoides presentan actividad antimicrobiana (Fleischer *et al.*, 2003), además de su conocida capacidad antioxidante, lo que constituye una ventaja adicional. Sin embargo, debido a su estructura química, no son fácilmente dispersables en sistemas acuosos y son altamente lábiles y reactivos bajo las condiciones ambientales. Debido a esto, se emplea una técnica efectiva para estabilizarlos y solubilizarlos en matrices acuosas para su utilización en medios biológicos: la microencapsulación con biopolímeros.

Un polisacárido natural ampliamente usado en la industria alimentaria es la goma arábica (GA), que es el exudado de los árboles de acacia, *Acacia senegal* (L.) y *Acacia seyal*. Su estructura química consiste básica-

mente 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 la 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 (Glover *et al.*, 2009).

En cuanto a la actividad antimicrobiana (AAM) de la GA, han sido realizados pocos estudios, 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* (Clark *et al.*, 1993). Sin embargo, hasta el momento no se han realizados estudios de la AAM de GA con el fin de ser adicionada a una matriz alimenticia, tal como la leche, para protegerla del desarrollo microbiano. Los microorganismos de principal interés son aquellos capaces de resistir condiciones de pasteurización y provistos de enzimas hidrolíticas, que generan off-flavour en el alimento, tales como *Bacillus subtilis* (Bs), aquellos cuya temperatura de almacenamiento es óptima para su desarrollo, como *Pseudomonas aeruginosa* (Ps) y, por último, los microorganismos autóctonos que están presentes naturalmente en la leche cruda.

El objetivo del trabajo es evaluar la capacidad antimicrobiana de GA pura y  $\beta$ -caroteno microencapsulado en goma arábiga (BC-GA) para reducir la velocidad de crecimiento del microorganismo mesófilo *Bacillus subtilis* (Bs), del psicrótrofo *Pseudomonas aeruginosa* (Ps) y de los

microorganismos aislados de leche cruda *Enterococcus* sp. (EN) y *Citrobacter amalonaticus* biog. 1 (C. am).

## Materiales y métodos

### Biopolímeros

Se empleó  $\beta$ -caroteno rodeado por GA como material de pared (BC-GA), obtenido a través de secado por aspersión (Lab Plant SD-04) en Laboratorio de Química de Alimentos (FEAUNICAMP, Brasil). Además se empleó GA pura para determinar el efecto de la microencapsulación.

### Microorganismos

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

### Aislamiento e identificación de microorganismos de leche

El aislamiento de los microorganismos a partir de leche cruda (almacenada a 4°C inmediatamente luego del ordeño) se realizó a través de siembra en profundidad de una dilución  $10^{-2}$  de la muestra, empleando agar de recuento total (ART) y medios selectivos como agar cetrimide (AC), agar glucosa-peptona (AGP) y agar KF. Las placas fueron incubadas a 4°C durante diez días. Para poder purificar algunas cepas, se empleó la adición de una solución 0.1% de tween 20 estéril en tubos con solución de agua peptonada al 0.1%. Las bacterias aisladas fueron identificadas en base a la morfología de colonia, tinción de Gram y pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, oxidación o fermentación de diferentes azúcares, crecimiento en medios selectivos y diferenciales).

**FRIO-RAF**

CERTIFICATE OF AUTHORIZATION  
NUMBER 38.152  
ASME CODE

EXPERIENCIA    TECNOLOGIA    SERVICIO    CALIDAD

**FRIO-RAF S.A.** Lisandro de la Torre 958 - (S2300DAT) Rafaela - Santa Fe - Tel.: +54-3492-432174 - Fax: +54-3492-432160  
Riobamba 178, 1° Piso, Dpto. "C" (C 1025 ABD) Buenos Aires - Argentina - Tel./Fax +54-11-4953-3536  
e-mail: info@frioraf.com - web: www.frioraf.com

### Determinación de actividad antimicrobiana

Para determinar la curva de crecimiento de los microorganismos de referencia (Bs y Ps) y de los aislados de leche cruda (EN y C. am), con y sin la adición de los antimicrobianos (AM) GA y BC-GA, se desarrolló la técnica de recuento microbiano con cada uno de ellos. Empleando cultivo "over night" en fase exponencial, con una concentración  $10^6$  UFC/ml, se inoculó un volumen determinado por densidad óptica, a una muestra de leche que luego fue dividida en porciones, de manera de obtener la misma concentración inicial del inóculo. A cada una de ellas se le adicionó el compuesto AM en diferentes concentraciones (1,37; 3,42 y 6,85 mg/ml, correspondiente a 10, 25 y 50  $\mu$ M de BC-GA y el equivalente en peso de GA pura). Una porción permaneció sin adición, actuando como control positivo del desarrollo microbiano. Para el desarrollo de Bs se incubaron a 32°C durante 30hs, mientras que para Ps y los otros psicrótrofos (EN y C. am) se incubaron a 4°C durante diez días. A determinados intervalos de tiempo se realizó el recuento a través de siembra en profundidad de cada una de las muestras de leche con y sin AM, en AGP como medio de cultivo específico para Bs; en AC para Ps; en KF para EN; y en ART para C. am. Las placas se incubaron durante 48hs a 37°C. Luego de dicho período, se realizó el recuento en UFC/ml y se graficó en función del tiempo. La velocidad de crecimiento ( $\mu$ , ( $h^{-1}$ )) de un cultivo microbiano en leche se determinó a partir de la porción lineal de la pendiente de las curvas de crecimiento del microorganismo, con y sin agregado de GA y BC-GA.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en cabina de seguridad microbiológica Biohazard Clase II (BIO-II-A) bajo flujo laminar.

### Inhibición del crecimiento microbiano

El porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano (%) ejercido por el compuesto antimicrobiano fue calculado a través de la siguiente ecuación:

$$\% I = 100 - \left[ \left( \frac{k_{obs}^{m.o + MC}}{k_{obs}^{m.o}} \right) \times 100 \right]$$

Donde  $k_{obs}^{m.o}$  y  $k_{obs}^{m.o+MC}$  son las constantes de velocidad de crecimiento bacteriano de primer orden, sin y con la adición del microencapsulado, respectivamente.

## Resultados y discusión

### Aislamiento e identificación de microorganismos de leche

De los microorganismos que se desarrollaron en medios ricos a 4°C (psicrótrofos) fueron aisladas y purificadas 13 cepas, siguiendo la metodología y pasos anteriormente explicados. A partir de los cultivos puros, las cepas fueron identificadas para su clasificación en base

a la morfología de colonia, tinción de Gram, filancia y pruebas bioquímicas, tales como: catalasa, oxidasa, oxidación o fermentación de diferentes azúcares, crecimiento en medios selectivos y diferenciales, y formación de esporas. De ellas, fue seleccionado un coco Gram positivo, catalasa y oxidasa negativo, que fue identificado como EN debido a su crecimiento diferencial en agar KF (colonias rojas con halo amarillo), crecimiento en caldo a 45°C y en caldo 6,5% NaCl. Además, para cubrir un amplio espectro microbiano, se seleccionó un bacilo Gram negativo, catalasa positivo, oxidasa negativo. Esto es indicativo de una enterobacteria, por lo que para su identificación se realizó un set de pruebas bioquímicas, denominado Enterotest (Brizula S.A). Los resultados obtenidos fueron: utilización de glucosa y lactosa positivos, con producción de gas y sin producción de SH<sub>2</sub>, urea positivo, citrato negativo, movilidad positivo, indol positivo. Esto indica que la bacteria aislada corresponde a un *Citrobacter amalonaticus* biog. 1(C. am).

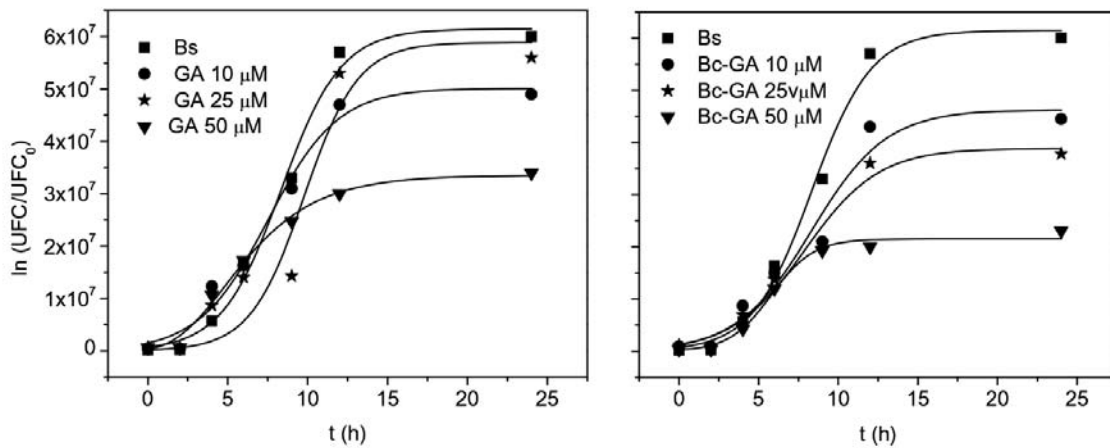
### Determinación de actividad antimicrobiana

La AAM de GA y BC-GA fue evaluada a la temperatura de almacenamiento de la leche de 4°C (excepto Bs, a 37°C) frente a cepas puras ATCC y a microorganismos aislados de leche.

La figura 1 muestra las curvas de crecimiento de Bs a 37°C en leche, con y sin adición de GA y BC-GA. En la figura 1 A se observa una disminución de la velocidad de crecimiento de Bs con la adición del biopolímero GA, principalmente posterior a las ocho horas de incubación, siendo mayor la reducción de la velocidad de crecimiento con una concentración de 50 $\mu$ M, reflejando un porcentaje de inhibición mayor al 50% (Tabla 1). Con la adición de los microencapsulados de BC-GA, el efecto fue similar, aunque ocurrió a tiempos más cortos. Además, se observa un efecto de concentración, siendo mayor la AAM a medida que aumenta la cantidad de microencapsulado (Figura 1 B). Con el agregado de 50 $\mu$ M de BCGA, el %I fue superior al 50%, comparable al obtenido con la adición de la misma concentración de GA, lo que indica que la AAM provendría básicamente del biopolímero que constituye el material de pared de la microcápsula.

En la figura 2 se muestran las curvas de crecimiento de Ps en leche, a 4°C, con y sin adición de GA y BC-GA. En cuanto a la velocidad de crecimiento de Ps en leche a 4°C, se vio disminuida con la adición de GA en todas las concentraciones (Figura 2 A), siendo mayor el %I obtenido (37%) con la concentración de 50 $\mu$ M. Mientras que, como se observa en la figura 2 B, sólo fue evaluada la AAM de BC-GA en una concentración de 10 $\mu$ M, resultando en la inhibición de un 22% (Tabla 1). Dicho valor es prácticamente igual al de GA 10 $\mu$ M demostrando, al igual que frente a Bs, que la AAM provendría principalmente del material de pared, GA.

**Figura 1** - Curva de crecimiento de Bs en leche a 37°C, con y sin adición de GA (A) y BC-GA (B)



**Tabla 1.** Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de Bs y Ps, en leche

[GA-p](μM)	Bs (37°C)		Ps (4°C)		EN (4°C)	
0	μ Bs= 0,276		μ Ps=0.03687		μ EN= 0,08441	
10	μ = 0.197	% I = 28.62	μ = 0.02876	% I = 21.99	μ = 0.06531	% I = 22.63
25	μ = 0.203	% I = 26.45	μ = 0.02857	% I = 22.55	μ = 0.05996	% I = 28.97
50	μ = 0.125	% I = 54.78	μ = 0.02323	% I = 36.99	μ = 0.0815	% I = 3.45
[BC-GA](μM)	Bs (37°C)		Ps (4°C)		EN (4°C)	
0	μ Bs= 0,276		μ Ps=0.03687		μ EN= 0,08441	
10	μ = 0.134	% I = 51.45	μ = 0.02885	% I = 21.72	μ = 0.06655	% I = 21.16
25	μ = 0.168	% I = 39.13	–	–	μ = 0.0598	% I = 29.16
50	μ = 0.1318	% I = 52.25	–	–	μ = 0.08214	% I = 2.69

Se ha realizado la determinación de la AAM frente al microorganismo aislado de leche cruda, *C. am*. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados. No se observa efecto antimicrobiano con la adición de GA y BCGA frente al desarrollo de dicho microorganismo en leche a 4°C en ninguna de las concentraciones adicionadas (gráficos no presentados). Esto podría deberse a que las bacterias Gram negativas presentan dos membranas citoplasmáticas que las hacen más rígidas y dificultan el acceso de las moléculas antimicrobianas. La membrana externa conforma una barrera con permeabilidad selectiva, lo que las convierte en microorganismos más resistentes frente a la acción de numerosos antibióticos y compuestos con acción antibacteriana (Hiroshi 1989). Esa membrana presenta canales inespecíficos, denominado porinas, que la atraviesan y permiten el paso de solutos hidrofílicos pequeños. Si bien -como ya se conoce- GA es un biopolímero hidrofílico, tiene gran tamaño, su peso molecular es de alrededor de 3,5x10<sup>5</sup> Da, lo que puede explicar el hecho de que no ejerza AAM sobre dicho microorganismo.

En cuanto a la determinación de AAM del otro microorganismo aislado de leche, en la figura 3 se muestra la curva de crecimiento de EN, almacenado a 4°C en leche, con y sin adición de GA y BC-GA. En todas

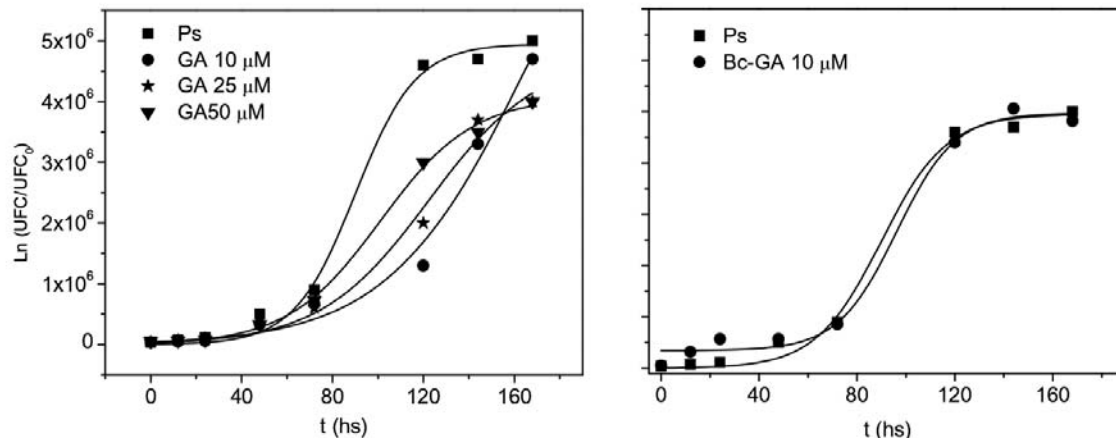
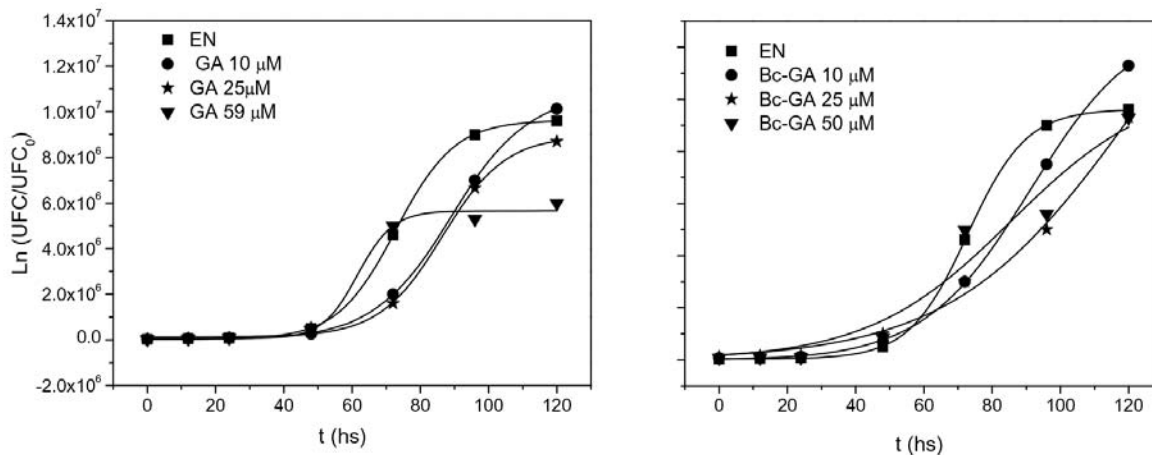
las concentraciones ejerce un efecto sobre la velocidad de crecimiento de la cepa aislada, siendo mayor a una concentración de 25μM, demostrando un % del 30% (Tabla 1). Sin embargo, a concentraciones mayores (50μM) no ejerce prácticamente un efecto inhibitorio del crecimiento. Esto puede deberse a que la adición del biopolímero en altas concentraciones podría estar siendo empleado como fuente de carbono por el microorganismo, favoreciendo su desarrollo.

Esto puede ser sustentado por la composición química de la GA, que consiste en un grupo de macromoléculas caracterizado por una elevada proporción de carbohidratos (97%) -de los cuales D-galactosa y L-arabinosa son los monosacáridos predominantes- y una baja proporción de proteínas (1-3%) (Williams, 2000; Montenegro *et al.*, 2012).

### Conclusiones

Se ha demostrado que GA y BC-GA poseen un efecto bacteriostático frente a microorganismos de referencia y a microorganismos aislados de leche cruda, todos ellos contaminantes de alimentos, con la excepción de *C. am*, que demostró resistencia. De los resultados se desprende que la AAM con la adición de GA y BC-GA comienza a ser efectiva cuando el microorganismo se encuentra



**Figura 2** - Curva de crecimiento de Ps en leche, a 4°C, con y sin adición de GA (A) y BC-GA (B)**Figura 3** - Curva de crecimiento de EN en leche a 4°C, con y sin adición de GA (A) y BC-GA (B)

en la fase exponencial de crecimiento. 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 propiedades antimicrobianas (Clark *et al.*, 1993).

Los resultados obtenidos indican que la aplicación de GA y BC-GA en leche ejerce un importante efecto antimicrobiano, reduciendo en un 30-50% la velocidad de crecimiento de diversas bacterias psicrotóficas. Esto podría potenciar las aplicaciones de la GA, no sólo como un agente emulsionante y protector que constituye la pared de microcápsulas, sino también como un agente antimicrobiano, pudiendo ser adicionada como una preservante de alimentos para proteger la calidad higiénica y nutricional y prolongar la vida útil.

### Bibliografía

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.

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.

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.

Hiroshi Nikaido (1989). Outer Membrane Barrier As A Mechanism Of Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Nov. P. 1831-1836.

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.

Montenegro, M.A., Boiero, M.L., Valle L.; Borsarelli, C.D. (2012). Gum Arabic: More Than an Edible Emulsifier, Products and Applications of Biopolymers, Casparus Johannes Reinhard Verbeek (Ed.), ISBN:978-953-51-0226-7, InTech.

Williams, P.A. (2000). In *Handbook of Hydrocolloids*; Williams, P. A., Phillips, G. O., Eds.; CRC Press: Cambridge, 155-168.