

Máster en Microbiota, Prebióticos y Probióticos



PROBISEARCH

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Valoración de diferentes emulsiones para
vehicular una cepa probiótica**

Autor: Álvaro José Puebla Vidal
Tutora: María Inmaculada Cuevas Gómez

Madrid: Octubre del 2023

Agradecimientos

A mis padres y mi pareja, por todo el apoyo que me han dado, tanto en los buenos como en los malos momentos.

A la Universidad Europea de Madrid, por fomentar mi desarrollo durante el desarrollo del máster.

A la Dra. Esther Jiménez Quintana, por recibirme con los brazos abiertos en Probisearch y permitir que llevase a cabo las prácticas en sus instalaciones.

Al equipo de Probisearch, por acogerme como uno más de la familia desde el primer día y por hacer mi estancia muy agradable y enriquecedora.

Y en especial a Inma, por su constancia conmigo a la hora de desarrollar este manuscrito y por todo el conocimiento que me ha otorgado.

Resumen

Los probióticos constituyen un sector emergente en los ámbitos de la salud y el bienestar humano y animal, mostrando un potencial prometedor en su uso para determinadas enfermedades como por ejemplo la diarrea asociada a *Clostridioides difficile*, o la colibacilosis en lechones. Para que una cepa probiótica pueda ejercer efectos beneficiosos en el hospedador debe sobrevivir a diversos factores ambientales y mantenerse a una concentración suficiente. En este estudio se evaluaron 8 emulsiones para valorar su capacidad de proteger a una cepa probiótica del género *Lactobacillus* con propiedades probióticas reconocidas. Dichas emulsiones se prepararon a partir de soluciones con aceites minerales comerciales, así como parafina líquida. Se evaluó la estabilidad de las emulsiones, la supervivencia de la cepa en las mismas a 4 °C, 25 °C y -20 °C durante 2 semanas y la actividad antimicrobiana de la cepa probiótica en emulsión. Aunque no resultaron estables, las emulsiones a base de parafina líquida fueron las que proporcionaron los mejores resultados de supervivencia de la cepa en todas las condiciones. La cepa en emulsión a base de parafina líquida mantuvo su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*. Las emulsiones a base de parafina son una buena opción para alargar la supervivencia de las cepas probióticas durante 2 semanas. No obstante, son necesarios futuros estudios para evaluar la supervivencia en periodos más prolongados.

Palabras clave: Emulsión, *Lactobacillus*, Parafina líquida, “agua-en-aceite”, “agua-en-aceite-en-agua”, “gel-en-agua”

Abstract

Probiotics are an emerging sector in the fields of human and animal health and welfare, showing promising potential for use in certain diseases such as *Clostridioides difficile*-associated diarrhoea, or colibacillosis in piglets. Although beneficial effects of multiple probiotic strains have been demonstrated, for these effects to occur, they must survive environmental factors and be maintained at a sufficient concentration in the host to exert their effect. In this study, 8 emulsions were evaluated for their ability to protect a probiotic strain of the genus *Lactobacillus* with recognised probiotic properties. These emulsions were prepared from commercial mineral oil preparations as well as liquid paraffin. The stability of the emulsions, the survival of the strain in the emulsions at 4°C, 25°C and -20°C for 2 weeks and the antimicrobial activity of the probiotic strain in the emulsion were evaluated. Although not stable, the liquid paraffin-based emulsions achieved the best strain survival results under all conditions. The strain in liquid paraffin-based emulsion maintained its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. Paraffin-based emulsions are a good option to extend the survival of probiotic strains for 2 weeks. However, future studies are needed to evaluate survival over longer periods.

Keywords: Emulsion, *Lactobacillus*, liquid paraffin, “water-in-oil”, “water-in-oil-in-water”, “gel-in-water”

Índice

<i>Abreviaturas</i>	6
<i>Introducción</i>	6
<i>Objetivos</i>	9
Objetivo principal.....	9
Objetivos secundarios.....	9
<i>Materiales y métodos</i>	9
<i>Resultados</i>	15
Emulsiones.....	15
Estabilidad de las emulsiones.....	15
Supervivencia de la cepa probiótica en las emulsiones.....	16
Actividad antimicrobiana de la cepa probiótica en emulsión.....	21
<i>Discusión</i>	22
<i>Conclusiones</i>	25
<i>Bibliografía</i>	26

Abreviaturas.

- Agua-en-aceite: (W/O)
- Agua-en-aceite-en-agua: (W/O/W)
- Brain Heart Infusion, del inglés infusión de corazón y cerebro: (BHI)
- Gel-en-agua: (Gel/W)
- Man, Rogosa y Sharpe: (MRS)
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: (FAO)
- Organización Mundial de la Salud: (OMS)
- Tryptone Soya Broth, del inglés caldo de triptona y soja: (TSB)
- Unidades formadoras de colonias (UFC)

Introducción.

Las bacterias beneficiosas para la salud se han utilizado en la alimentación del ser humano desde hace milenios. Su uso se ha documentado aproximadamente hace 4.000 años, cuando se empezaron a consumir productos fermentados por primera vez (1,2). Sin embargo, el término “probiótico” no se acuñó hasta 1974 (3) y su concepto ha ido evolucionando hasta la actualidad. Actualmente, la definición de probiótico consensuada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) es ampliamente aceptada como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped” (4).

El interés por los probióticos se ha visto incrementado significativamente en los últimos años. Actualmente, constituyen una industria capaz de generar más de 25 mil millones de dólares en el mundo (5). Dicha industria se caracteriza por la ventaja de su uso en diferentes ámbitos. De esta forma, los probióticos se utilizan en la industria alimentaria, por ejemplo, en alimentos funcionales como el yogurt (6). También juegan un papel importante en la salud humana por su uso en algunas enfermedades tales como el síndrome de colon irritable o la diarrea del viajero (5). Además, se usan también en el sector veterinario (2) y en cosmética (3).

Los probióticos ejercen efectos beneficiosos mediante diversos mecanismos de acción. Uno de los mecanismos más relevantes es la modificación de la microbiota o su entorno con el fin de favorecer la proliferación de microorganismos beneficiosos al mismo tiempo que inhiben los microorganismos patógenos (7). La inhibición de patógenos por parte de los probióticos se puede dar mediante la competición directa por los nutrientes o por los puntos de unión al epitelio, así como mediante la producción de bacteriocinas de alto espectro o sustancias inhibidoras como el ácido láctico o el peróxido de hidrógeno (2). Otro mecanismo de acción de los probióticos es la actividad inmunomoduladora (8). Esta actividad es generada gracias a la producción de moléculas efectoras por parte de los probióticos que actúan como activadores inmunitarios dirigidos a células procariotas y eucariotas (9).

Los géneros bacterianos más utilizados como probióticos son *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* o *Bacillus*, entre otros. Las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* se engloban dentro del filo Bacillota (previamente Firmicutes). Son bacterias Gram positivas con forma de bacilos, anaerobias facultativas y productoras, principalmente, de ácido láctico. Estos microorganismos se encuentran naturalmente como comensales en la microbiota de diversas mucosas, tales como la oral, gastrointestinal, vaginal, respiratoria o en la leche de humanos y otros mamíferos (10,11). En algunos casos, como en la microbiota vaginal, las bacterias del género *Lactobacillus* componen el grupo mayoritario y ejercen una función importante en el mantenimiento de la salud vaginal (12,13).

A pesar de los efectos beneficiosos que presentan los probióticos, la industria se enfrenta al reto de su supervivencia durante su producción y almacenamiento, así como durante su paso por el tracto intestinal hasta la llegada a la diana terapéutica (14). La supervivencia de los probióticos se puede ver comprometida por el sometimiento de las células a estrés oxidativo, variaciones en el pH y la temperatura. Según la FAO y la OMS, para que un probiótico pueda llevar a cabo satisfactoriamente sus efectos beneficiosos debería llegar a la diana terapéutica con una concentración mínima de 10^6 log UFC/ml (15). Con el fin de alcanzar esta cifra es necesario desarrollar un sistema que proteja la cepa probiótica.

Una de las propuestas más utilizadas para llevar a cabo dicha protección es la encapsulación (16). El proceso de encapsulación consiste en englobar a los

microorganismos en unos materiales que actúan como muros, protegiéndolos de las condiciones externas adversas y controlando su liberación en la diana terapéutica (14,15,17). Actualmente, hay diversas formas de encapsular un microorganismo, por ejemplo, mediante emulsión, extrusión, secado por atomización, enfriamiento por atomización o lecho fluidizado (14). La emulsión es una técnica química que consiste en encapsular el material activo en un sistema de 2 fases, dispersa y continua, que generalmente son dos líquidos inmiscibles entre sí (15).

Respecto a las emulsiones, éstas se dividen en dos tipos, emulsiones simples y emulsiones múltiples. Las emulsiones simples están constituidas por una fase acuosa, una fase oleosa y un emulsionante. Las emulsiones simples, a su vez, pueden ser emulsiones directas cuando la fase dispersa es oleosa y la continua es acuosa (aceite-en-agua (O/W) y gel-en-agua (Gel/W)), o inversas cuando la fase dispersa es acuosa y la continua es oleosa (agua-en-aceite (W/O)). Las emulsiones múltiples son sistemas multicompartimentalizados, caracterizados por la coexistencia de emulsiones O/W y W/O, en las que los glóbulos de la fase dispersa contienen dentro de ellos gotas igualmente dispersas más pequeñas. Las emulsiones múltiples más comunes son las de agua-en-aceite-en-agua (W/O/W), aunque las de aceite-en-agua-en-aceite (O/W/O) también pueden utilizarse en aplicaciones específicas (14). En estudios previos se ha reportado una supervivencia del 85% de las células encapsuladas y una liberación de la cepa a su destino del 92% mediante el uso de emulsiones en pruebas con *Lactobacillus acidophilus* (15,18),

Para el presente trabajo, se disponía de una cepa probiótica del género *Lactobacillus* con propiedades beneficiosas y de seguridad evaluadas previamente. Con el fin de realizar un escalado industrial de dicha cepa, se evaluó como método de protección la mezcla de la cepa en diferentes emulsiones.

Objetivos.

Objetivo principal

Evaluación de 8 emulsiones oleosas para la vehiculización de una cepa probiótica del género *Lactobacillus*.

Objetivos secundarios

1. Evaluación preliminar de la estabilidad de 8 emulsiones oleosas preparadas a escala laboratorial.
2. Evaluación de la estabilidad de la cepa probiótica en 8 emulsiones sometidas a diferentes condiciones de temperatura.
3. Evaluación de la supervivencia de la cepa probiótica en las 8 emulsiones.
4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la cepa probiótica en emulsión.

Materiales y métodos.

Activación y preparación del inóculo para cada emulsión: Se partió de un criotubo procedente del banco semilla de trabajo de una cepa probiótica del género *Lactobacillus spp.* Para cada emulsión, se inocularon 250 μ L de dicho criotubo en 25 mL de un medio de cultivo preparado por componentes (Tabla 1) y se incubó a 37 °C \pm 1 °C en aerobiosis durante 24 h \pm 6 h. Dicho medio de cultivo es una modificación del tradicional medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Oxoid), sustituyendo los componentes de origen animal por componentes vegetales.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo por componentes

Componentes	(g/l)
Extracto vegetal No 1 (Merck, Spain)	10
Extracto de levadura (Merck, Spain)	25
Hidrógeno-fosfato de potasio (Merck, Spain)	2
di-Amonio hidrógeno Citrato (Merck, Spain)	2
Sulfato de magnesio hepta hidratado (Panreac, Spain)	0,1
Sulfato de manganeso (Merck, Spain)	0,05
Tween 80 (Panreac, Spain)	1 ml
Glucosa (Panreac, Spain)	20

Tras el crecimiento del cultivo, se recogió 1 mL para realizar el recuento de células viables del cultivo de partida y el resto se utilizó para preparar el inóculo de la emulsión. Dicho inóculo constituyó la fase acuosa y se preparó para cada emulsión de la siguiente forma:

- **Emulsiones 1 a 7, células lavadas:** Para cada una de las emulsiones, se centrifugaron 10 ml del cultivo de partida a 9.000 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado con 10 mL de PBS y un nuevo ciclo de centrifugación en las mismas condiciones. Finalmente, se resuspendió el pellet de bacterias en un volumen de PBS diferente para obtener la fase acuosa de cada emulsión, siendo 16 mL de PBS para la emulsión 1, 12 mL de PBS para la emulsión 2, 20 mL de PBS para las emulsiones 3, 4 y la 5; y 32 mL de PBS para la emulsión 6. Para la emulsión 7, se resuspendieron las bacterias en 15 mL de polisorbato al 10% (Tween 80, PanReac AppliChem ITW Reagents, Spain).
- **Emulsión 8, células liofilizadas:** Se resuspendieron 5 viales de células liofilizadas con una concentración de $1,5 \times 10^9$ UFC/vial en un total de 15 mL de polisorbato al 10% (Tween 80, PanReac AppliChem ITW Reagents, Spain).

Emulsiones: Para la fase oleosa de las emulsiones 1 a 6 se utilizaron adyuvantes comerciales (MONTADINE, SEPPIC) fabricados a partir de aceites minerales con un emulsificante incorporado. Para las emulsiones 7 y 8 se utilizó parafina líquida ligera (USP-NF, BP, Ph. Eur.) pura de grado farma (PanReac AppliChem ITW Reagents, Spain) como fase oleosa y el Tween 80 al 10% como agente emulsificante. Los volúmenes utilizados de cada fase en cada emulsión se resumen en la Tabla 2.

- **Emulsiones 1, 2, 7 y 8 (W/O):** Para su preparación se colocó el volumen de la fase oleosa (Montanide ISA 61 VG para emulsión 1, 71 VG para emulsión 2 y parafina líquida para emulsiones 7 y 8) en una botella de cristal estéril. A continuación, se introdujo el vástago del homogeneizador (SilentCrusher, Heidolph) en la fase oleosa tal y como se indica en la Figura 1. En las emulsiones 1 y 2, la fase oleosa se utilizó a temperatura ambiente. En las emulsiones 7 y 8, la parafina se utilizó refrigerada a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se comenzó a agitar la fase oleosa a 10.000 rpm mientras se fue añadiendo poco a poco el inóculo resuspendido en PBS. Una vez adicionado todo el inóculo, se continuó la agitación a 10.000 rpm durante 3 minutos.

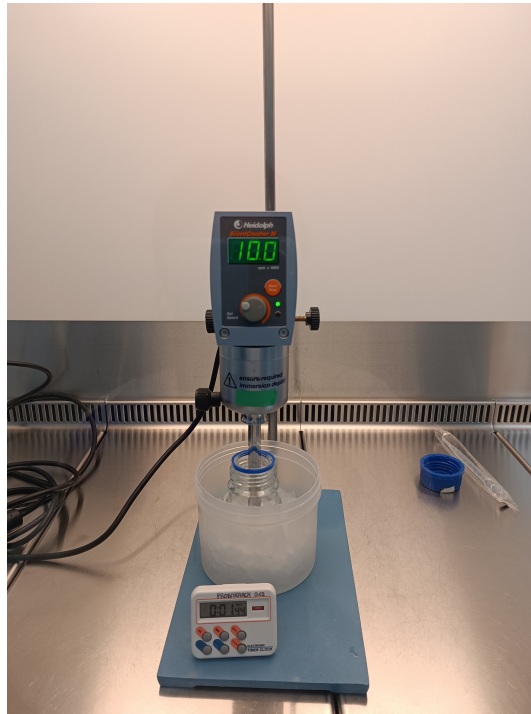


Figura 1. Introducción del vástago del homogeneizador en la fase oleosa

- **Emulsiones 3 4 y 5 (W/O/W):** Para su preparación se añadió el volumen indicado de la fase oleosa, previamente calentada a 32 °C, (Montanide ISA 201 VG para la emulsión 3, 206 VG para la emulsión 4 y 207 VG para la emulsión 5) en un vaso de precipitado estéril con una varilla agitadora cilíndrica tal y como se muestra en la Figura 2. A continuación, se colocó el vaso de precipitado sobre el agitador magnético y se inició la agitación a 100 rpm mientras se fue adicionando poco a poco el inóculo resuspendido en PBS, previamente calentado a 32 °C. Tras añadir todo el inóculo, se incrementó la agitación a 350 rpm durante 5 minutos.



Figura 2. Vaso de precipitado con emulsión sobre agitador magnético

- **Emulsión 6 (Gel/W):** Para su preparación se añadió el volumen indicado de la fase acuosa en un vaso de precipitado con una varilla agitadora cilíndrica. Posteriormente, se colocó el vaso de precipitado sobre el agitador magnético y se inició la agitación a 100 rpm mientras se fue adicionando progresivamente la fase oleosa (Montanide Gel 02). Tras añadir la fase oleosa, se incrementó la agitación a 200 rpm durante 10 minutos. Tanto la fase acuosa como la oleosa se utilizaron a temperatura ambiente.

Tabla 2. Resumen de los volúmenes utilizados en cada fase

Tipo de emulsión	Emulsión	Fase oleosa (mL)	Fase acuosa (mL)
W/O	1	Montanide ISA 61 VG (24 mL)	PBS (16 mL)
	2	Montanide ISA 71 VG (28 mL)	PBS (12 mL)
	7	Parafina líquida (45 mL)	Tween 80 al 10% (15 mL)
	8	Parafina líquida (45 mL)	Tween 80 al 10% (15 mL)
W/O/W	3	Montanide ISA 201 VG (20 mL)	PBS (20 mL)
	4	Montanide ISA 206 VG (20 mL)	
	5	Montanide ISA 207 VG (20 mL)	
Gel/W	6	Montanide Gel 02 (8 mL)	PBS (32 mL)

Al finalizar la preparación de cada emulsión, se tomaron alícuotas para evaluar la estabilidad de las emulsiones y la supervivencia de la cepa probiótica:

- Alícuotas de 5 mL en tubos Falcon de 15 mL para la prueba de estabilidad (centrifugación), incubadas a 25 °C, a las 24 horas después de la preparación de la emulsión.
- Alícuotas de 5 mL en tubos Falcon de 15 mL para la prueba de estabilidad de las emulsiones (incubadas a distintas temperaturas) a los 14 días de su preparación.
- Alícuotas de 1,5 mL para la prueba de supervivencia de la cepa probiótica (incubadas a distintas temperaturas) y evaluadas a diferentes tiempos hasta los 14 días tras la preparación de la emulsión.

Prueba de estabilidad de las emulsiones mediante centrifugación: Esta prueba da una aproximación rápida de la estabilidad de las emulsiones. Se centrifugaron los 5 mL de cada emulsión a 3.700 rpm, a 20 °C ± 1 °C durante 1 hora. Las emulsiones se consideraron estables si:

- **Emulsiones W/O (emulsiones 1, 2, 7 y 8):** No había agua en la punta inferior del Falcon y no se observó más del 10% de aceite en la parte superior del Falcon.
- **Emulsiones W/O/W (emulsiones 3, 4 y 5):** No se observó más del 5% de aceite en la parte superior del Falcon.
- **Emulsión Gel/W (emulsión 6):** No se observó más del 10% de una capa de color blanco y densa (denominado “milk layer”) en la parte superior del Falcon.

Prueba de estabilidad de las emulsiones: Tras 2 semanas de la realización de las emulsiones, se observaron las alícuotas de 5 mL de cada emulsión incubadas a 4 °C, 25 °C y 37 °C (solo en el caso de las W/O). Se consideraron estables aquellas emulsiones que cumplían con los requisitos descritos anteriormente en la prueba de estabilidad por centrifugación.

Supervivencia de la cepa probiótica en emulsión: Se evaluó la supervivencia de la cepa a 4 °C y 25 °C a las 24 horas, 7 días y 14 días, mientras que a -20 °C se evaluó a los 14 días después de la preparación de la emulsión. Para ello, se realizaron diluciones seriadas con agua de peptona de cada emulsión y siembra en placas agar MRS. Dichas placas se

incubaron a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ en aerobiosis durante $24\text{ h} \pm 6\text{ h}$. Tras la incubación, se realizó el recuento de colonias para obtener las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) utilizando la siguiente fórmula, siendo X UFC/mL:

$$\frac{n^{\circ} \text{ colonias contadas}}{V \text{ sembrado } (\mu\text{l})} = \frac{X}{1000 \mu\text{l}}$$

Prueba de actividad antimicrobiana de la cepa probiótica en emulsión mediante co-cultivo: Se evaluó la actividad antimicrobiana en medio líquido de las emulsiones que mejores resultados obtuvieron en las pruebas de supervivencia de la cepa frente al patógeno *Staphylococcus aureus*. Para ello, se inoculó 1 mL de un cultivo overnight del patógeno y 1 mL de la emulsión en 20 mL de medio líquido. Dicho medio líquido estaba compuesto por 10 mL de MRS y 10 mL de “Tryptone soya broth” (TSB). Además, a modo de control, se inoculó 1 mL del patógeno solo en un frasco con el mismo medio líquido. A continuación, los co-cultivos y el control se incubaron a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 17 h. Se realizaron diluciones seriadas con agua de peptona y siembra en placas de agar MRS y agar “Brain Heart Infusion” (BHI) al inicio y al final de la incubación. Dichas placas se incubaron a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $24\text{ h} \pm 6\text{ h}$. Tras la incubación, se realizó el recuento de células viables de la cepa probiótica en MRS y del patógeno en BHI. El co-cultivo se preparó por triplicado para cada emulsión.

Resultados.

Emulsiones

Se generaron 8 tipos de emulsiones con una consistencia cremosa ligera y de color blanco tal y como se refleja en la Figura 3.

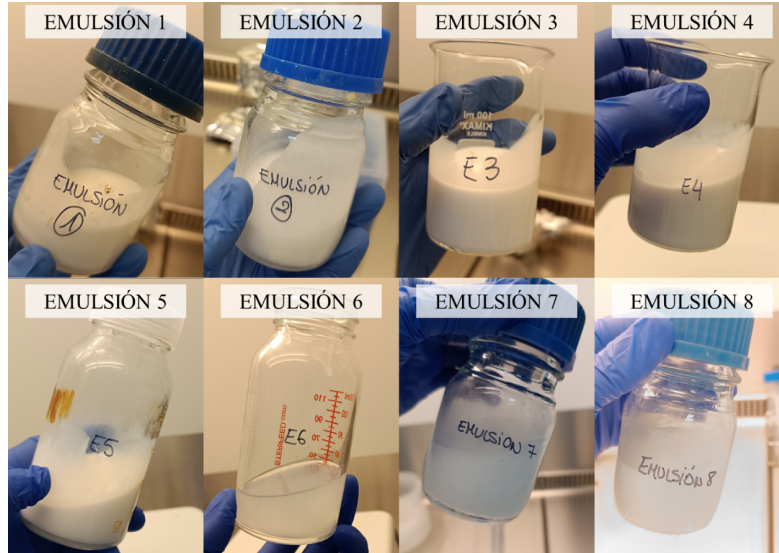


Figura 3. Emulsiones tras su preparación

Estabilidad de las emulsiones

La estabilidad de las emulsiones tras la centrifugación y a diferentes temperaturas durante 2 semanas se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Estabilidad de las emulsiones por centrifugación y a distintas temperaturas

	24 horas		2 semanas		
	Centrifugación	37 °C	4 °C	25 °C	
Emulsión 1	Inestable	Inestable	Inestable	Estable	
Emulsión 2	Inestable	Inestable	Inestable	Inestable	
Emulsión 3	Estable	N/A	Estable	Estable	
Emulsión 4	Estable	N/A	Estable	Estable	
Emulsión 5	Estable	N/A	Estable	Estable	
Emulsión 6	Estable	N/A	Estable	Estable	
Emulsión 7	Inestable	Inestable	Inestable	Inestable	
Emulsión 8	Inestable	Inestable	Inestable	Inestable	

N/A, no aplica para las emulsiones W/O/W o Gel/W

Supervivencia de la cepa probiótica en las emulsiones

Se llevó a cabo la prueba de supervivencia de la cepa probiótica en las 8 emulsiones a las 24 horas, 7 días y 14 días tras su preparación a diferentes temperaturas, dando lugar a los siguientes resultados.

- Emulsión 1:** Los resultados se representan en la Figura 4. En esta emulsión, se partió de una concentración de la cepa probiótica de 7,86 log UFC/mL. A 25 °C, la concentración de la cepa cayó 1,32 unidades logarítmicas en 24 horas, mientras que a 4 °C disminuyó 0,45 unidades logarítmicas. De las 24 h hasta la semana, se produjo una bajada más pronunciada de la concentración a 4 °C (-1,0 log UFC/mL) que a 25 °C (-0,22 log UFC/mL). Tras dos semanas, se observó menor pérdida de concentración con respecto a la concentración de partida a -20 °C (-1,08 log UFC/mL) que a 25 °C (-1,79 log UFC/mL) o a 4 °C (-1,55 log UFC/mL).

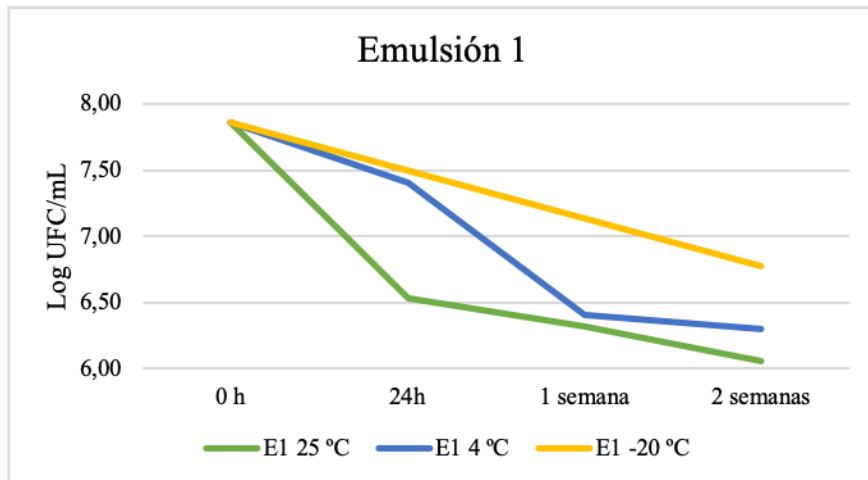


Figura 4. Supervivencia de la cepa probiótica en la emulsión 1

- Emulsión 2:** Los resultados se muestran en la Figura 5. La emulsión tenía una concentración de 7,32 log UFC/mL tras su preparación. A las 24 horas, a 4 °C, la concentración se incrementó a 7,74 log UFC/mL, mientras que a 25 °C tuvo un descenso de -0,31 unidades logarítmicas. A la semana, la concentración de la emulsión a 4 °C disminuyó hasta 6,76 log UFC/mL, y a 25 °C se produjo un descenso continuo en la concentración de 0,61 unidades logarítmicas. A las dos semanas, se observó menor pérdida de concentración con respecto a la de inicio a -20 °C (-0,06 log UFC/mL) que a 25 °C (-1,07 log UFC/mL) o a 4 °C (-0,64 log UFC/mL).

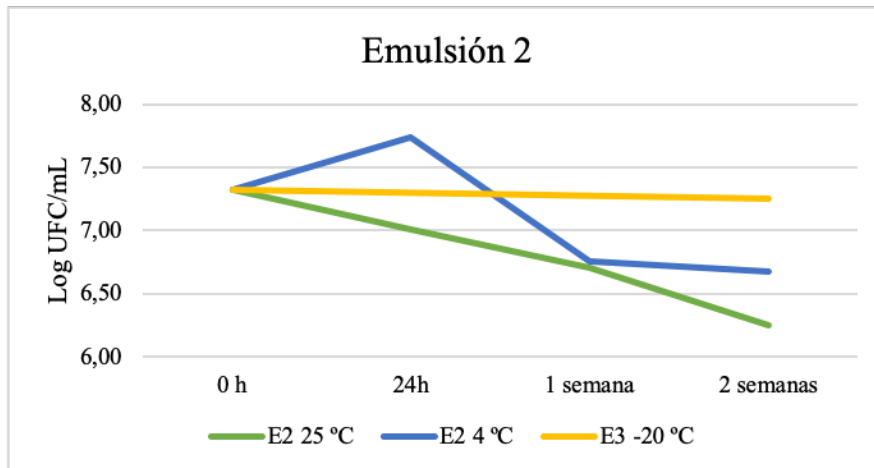


Figura 5. Supervivencia de la cepa probiótica en la emulsión 2

- Emulsión 3:** Los resultados se muestran en la Figura 6. La emulsión 3 partió con una concentración inicial de 8,08 log UFC/mL. A las 24 horas, la concentración disminuyó 0,18 unidades logarítmicas a 4 °C y 0,69 unidades logarítmicas a 25 °C. Pasada una semana, las concentraciones disminuyeron de manera constante llegando a 7,18 log UFC/mL a 25 °C y 7,68 log UFC/mL a 4 °C. Tras dos semanas, se observó una reducción menor de la concentración a - 20 °C y 4 °C (-0,28 y - 0,59 log UFC/mL, respectivamente) que a 25 °C (-1,84 log UFC/mL).

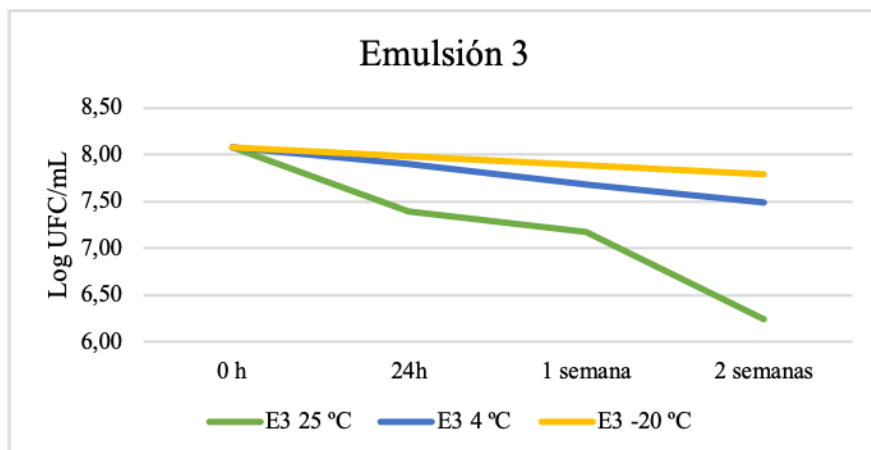


Figura 6. Supervivencia de la cepa probiótica en la emulsión 3

- Emulsión 4:** Los resultados se representan en la Figura 7. Se partió de una concentración de 8,27 log UFC/mL. Tras 24 horas, la emulsión a 25 °C tuvo un ligero descenso en la concentración de 0,18 unidades logarítmicas, mientras que a 4 °C se mantuvo la concentración inicial. Tras una semana, se observó un fuerte descenso de la concentración a 25 °C (-1,39 log UFC/mL) y a 4°C (-2,23 log

UFC/mL) respecto a la concentración de partida. A las dos semanas, se observó menor pérdida de concentración con respecto a la concentración de partida a -20 °C ($-0,56\text{ log UFC/mL}$) que a 25 °C ($-1,99\text{ log UFC/mL}$) o a 4 °C ($-2,47\text{ log UFC/mL}$).

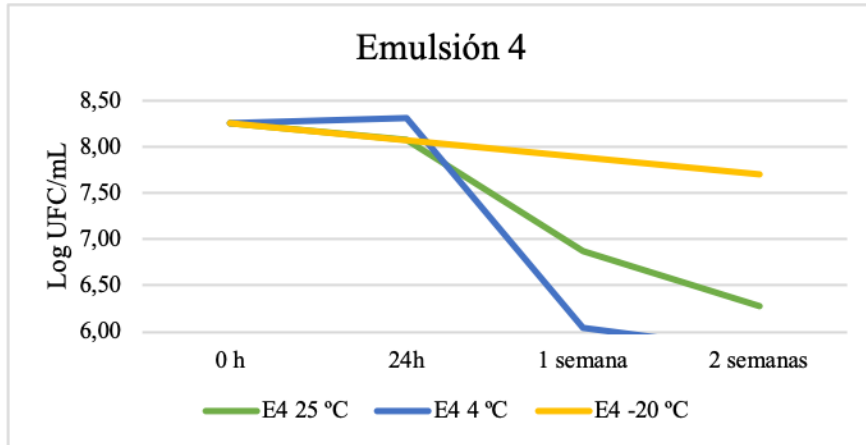


Figura 7. Supervivencia de la cepa probiótica en la emulsión 4

- Emulsión 5:** Los resultados se muestran en la Figura 8. La emulsión partió con una concentración de $8,37\text{ log UFC/mL}$. Pasadas 24 horas, la concentración se mantuvo a 4 °C , mientras que a 25 °C se produjo un descenso de la concentración de $0,41$ unidades logarítmicas. Pasada una semana, se observó un descenso de la concentración tanto a 4 °C como a 25 °C llegando a $7,93\text{ log UFC/mL}$ y $7,24\text{ log UFC/mL}$, respectivamente. A las 2 semanas, se observó una pérdida de concentración menor con respecto a la concentración de partida a -20 °C ($-0,88\text{ log UFC/mL}$), y una mayor pérdida a 4 °C ($-2,15\text{ log UFC/mL}$) y a 25 °C ($-2,02\text{ log UFC/mL}$)

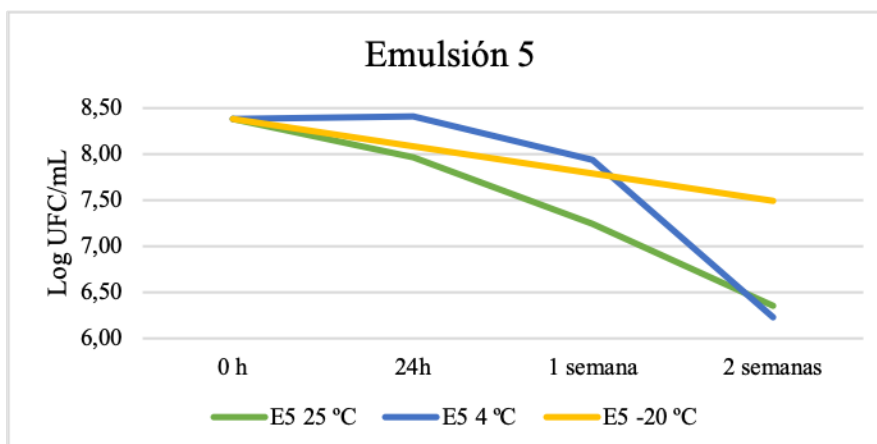


Figura 8. Supervivencia de la cepa probiótica en la emulsión 5

- Emulsión 6:** Los resultados se representan en la Figura 9. Esta emulsión partió de una concentración inicial de 8,33 log UFC/mL. Pasadas 24 horas, la concentración a 4 °C se mantuvo, mientras que a 25 °C se produjo un descenso de 1,03 unidades logarítmicas. Pasada una semana, a 4 °C se observó un descenso de la concentración de la emulsión 6 de 1,12 unidades logarítmicas con respecto a su anterior valor. La cepa no sobrevivió tras una semana a 25 °C por lo que no se tomó en consideración esta condición para la siguiente medición. Tras 2 semanas, la concentración de la emulsión 6 a 4 °C tuvo un gran descenso de 5,52 unidades logarítmicas con respecto a la concentración de partida, y a -20 °C, aunque menor, también se observó descenso en la concentración de 1,91 unidades logarítmicas.

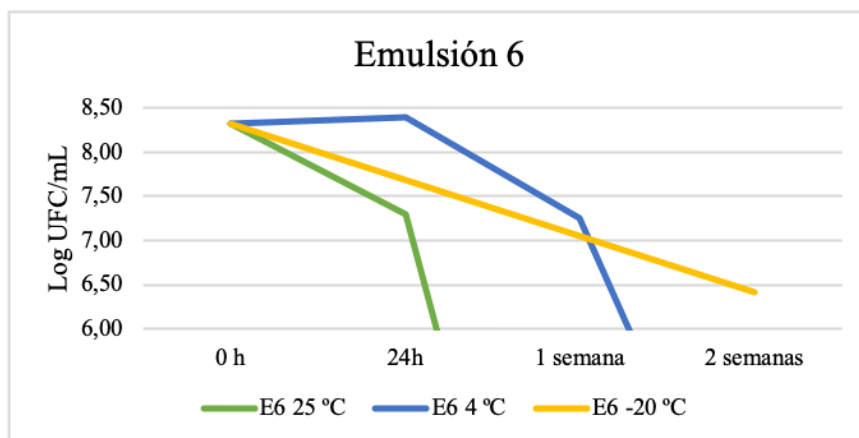


Figura 9. Supervivencia de la cepa probiótica en la emulsión 6

- Emulsión 7:** Se muestran los resultados en la Figura 10. Se inició con una concentración de partida de 7,62 log UFC/mL en esta emulsión. A las 24 horas, se observó un aumento de la concentración a 25 °C, llegando a ser 8,51 log UFC/mL, mientras que a 4 °C se produjo un leve descenso de la concentración de 0,15 unidades logarítmicas. A la semana, a 25 °C se observó un descenso de la concentración, llegando a 6,99 log UFC/mL, mientras que a 4 °C se mantuvo la concentración. A las dos semanas, se observó un aumento de la concentración de partida a -20 °C de 0,55 unidades logarítmicas, se mantuvo a 4 °C y disminuyó 0,88 unidades logarítmicas a 25 °C.

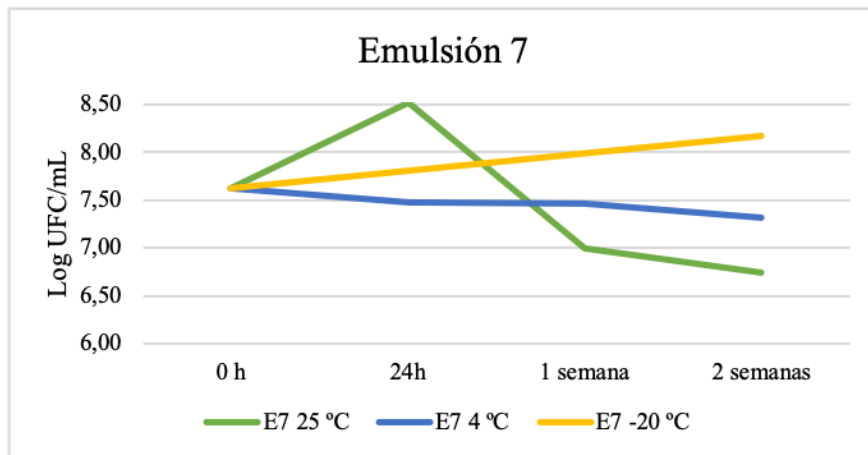


Figura 10. Supervivencia de la cepa probiótica en la emulsión 7

- Emulsión 8:** Se muestran los resultados en la Figura 11. La emulsión partió de una concentración inicial de 7,45 log UFC/mL. Pasadas 24 horas, se observó un aumento en la concentración tanto a 25 °C (+0,49 log UFC/mL) como a 4 °C (+0,67 log UFC/mL). Pasada una semana, se produjo un leve descenso de la concentración a 4 °C y a 25 °C, aunque a 4 °C la concentración seguía siendo mayor que la de partida (+0,21 log UFC/mL). A las dos semanas, se observó un aumento de la concentración de partida a -20 °C de 0,55 unidades logarítmicas, y disminuyó 0,25 unidades logarítmicas a 4 °C y 25 °C.

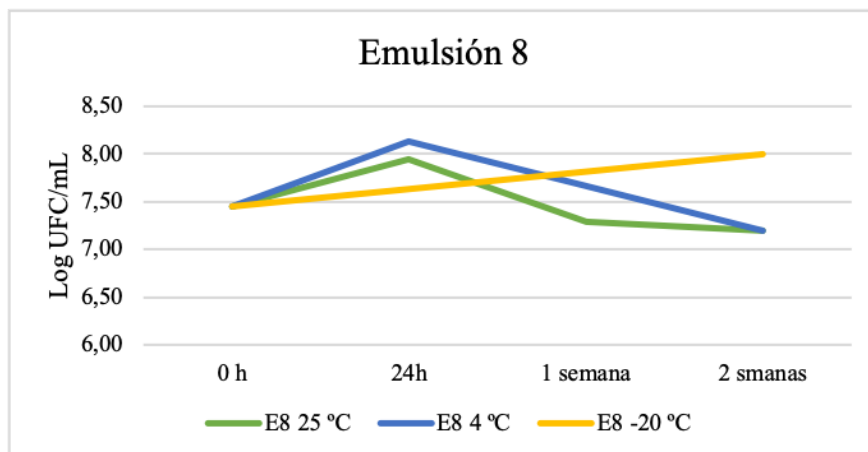


Figura 11. Supervivencia de la cepa probiótica en la emulsión 4

En la Tabla 4 se resume la diferencia de concentración de la cepa probiótica en cada emulsión a diferentes temperaturas tras dos semanas con respecto a la concentración inicial. En las emulsiones 7 y 8, preparadas con parafina, la cepa obtuvo mejores resultados de supervivencia tras dos semanas en las tres condiciones de temperatura.

Tabla 4. Diferencia de concentración de la cepa probiótica en emulsión tras 2 semanas a diferentes temperaturas

	Pérdida Log UFC/mL a las 2 semanas		
	25 °C	4 °C	-20 °C
Emulsión 1	-1,79	-1,55	-1,08
Emulsión 2	-1,07	-0,64	-0,06
Emulsión 3	-1,84	-0,59	-0,28
Emulsión 4	-1,99	-2,47	-0,56
Emulsión 5	-2,03	-2,15	-0,88
Emulsión 6	-8,33	-5,51	-1,91
Emulsión 7	-0,87	-0,23	0,56
Emulsión 8	-0,25	-0,25	0,55

Actividad antimicrobiana de la cepa probiótica en emulsión

La prueba de actividad antimicrobiana se llevó a cabo en las emulsiones con mejores resultados en cuanto a supervivencia de la cepa probiótica. Por tanto, se realizó el co-cultivo en medio líquido utilizando las emulsiones 7 y 8 frente al patógeno *S. aureus*. Los resultados de los co-cultivos de las emulsiones 7 y 8 frente a *S. aureus* se representan en las Figuras 12 y 13, respectivamente. En el control, en ausencia de las emulsiones 7 y 8, los recuentos del patógeno se mantuvieron estables durante la incubación de 17 horas. En cambio, en los co-cultivos, la concentración de *S. aureus* disminuyó 2,47 unidades logarítmicas en el co-cultivo de la emulsión 7 y 2,90 unidades logarítmicas en el co-cultivo de la emulsión 8.

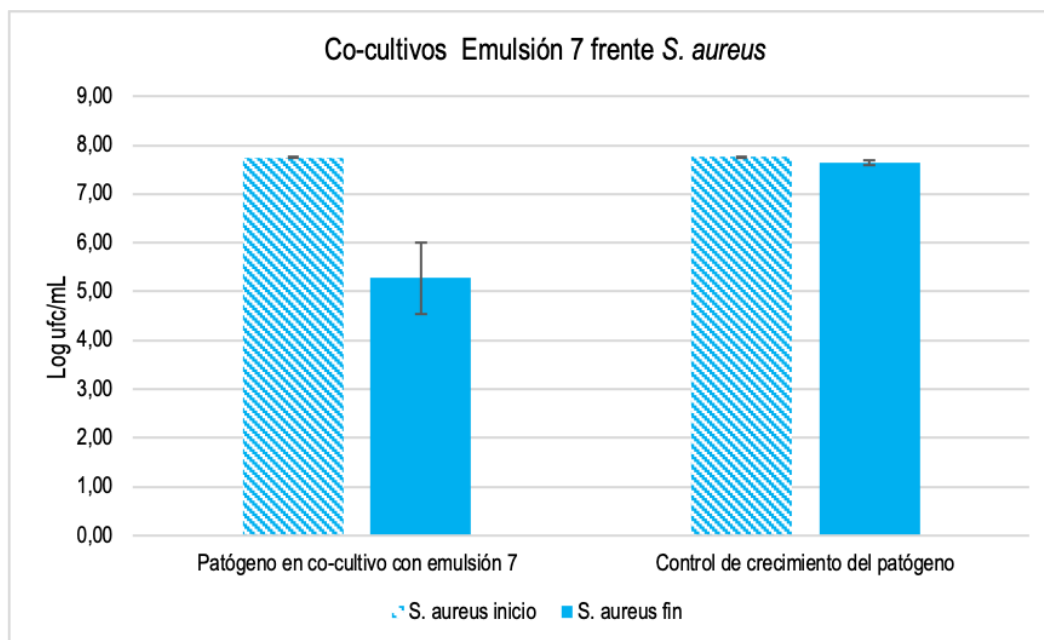


Figura 12. Concentración del patógeno (log UFC/ml) en co-cultivos con la emulsión 7 y solo en el medio de cultivo antes (0h) y después (17h) de la incubación.

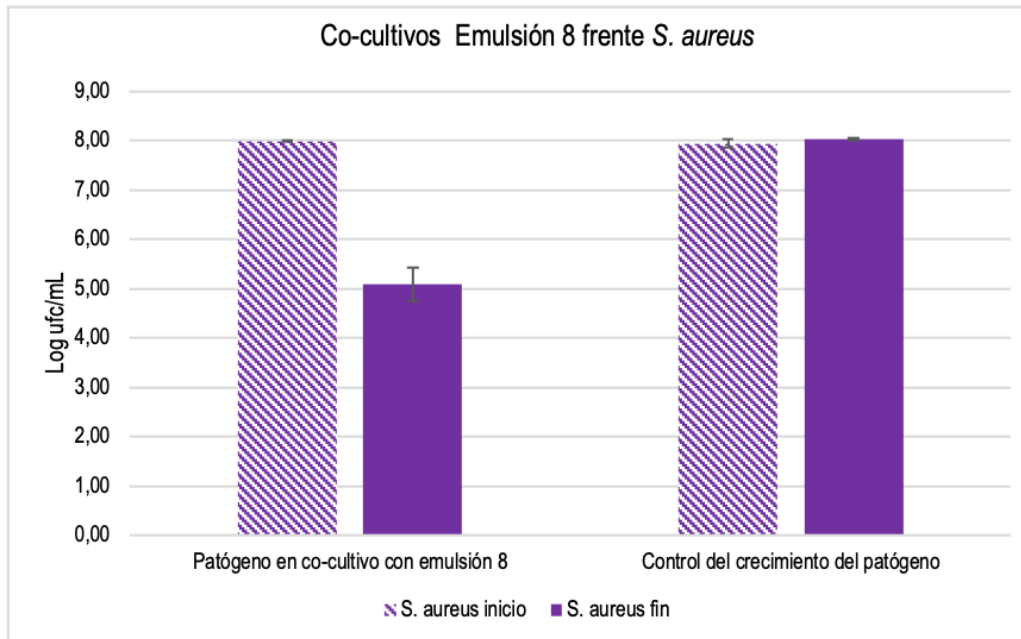


Figura 13. Concentración del patógeno (log UFC/ml) en co-cultivos con la emulsión 8 y solo en el medio de cultivo antes (0h) y después (17h) de la incubación.

Discusión.

Una vez probadas las propiedades beneficiosas de los probióticos *in vitro*, se debe garantizar que puedan sobrevivir a los procesos de fabricación y almacenamiento, además de llegar a la diana terapéutica en las cantidades adecuadas para llevar a cabo el efecto beneficioso deseado. Con el fin de proteger de las condiciones ambientales a una cepa probiótica con características beneficiosas previamente evaluadas, en este estudio se realizó un ensayo preliminar utilizando 8 emulsiones diferentes para vehicular dicha cepa.

Una emulsión estable permitirá encapsular la cepa probiótica protegiéndola de los factores ambientales, por tanto, es importante realizar el análisis de estabilidad de la emulsión. La evaluación de la estabilidad mediante centrifugación aporta una idea inicial de la estabilidad de las emulsiones antes de las 2 semanas. En nuestro estudio, los resultados de estabilidad de las emulsiones obtenidos por centrifugación se corresponden con los obtenidos a distintas temperaturas pasadas 2 semanas en todas las emulsiones excepto en la emulsión 1 (W/O). En dicha emulsión, a pesar de que en centrifugación resultó inestable, mostró estabilidad a 25 °C tras dos semanas. Las emulsiones 3, 4, 5 (W/O/W) y 6 (Gel/W) fueron estables en todas las condiciones estudiadas, lo cual era lo esperado, ya que dichas emulsiones se formularon a partir de preparados comerciales,

cuyas cantidades de fase oleosa y emulsificante se encuentran ajustadas. Sin embargo, las emulsiones 1 y 2 no fueron estables a pesar de estar formuladas también a partir de preparados comerciales. En este caso, la limitación en cuanto al homogeneizador utilizado supuso un cambio en las instrucciones de fabricación de las emulsiones 1 y 2 (se utilizaron 10.000 rpm en lugar de 5.000 rpm ya que era el mínimo admitido por el homogeneizador), por lo que probablemente se podrían obtener mejores resultados de estabilidad ajustando las condiciones del homogeneizador. Respecto a las emulsiones 7 y 8, ambas fueron inestables en las condiciones estudiadas. Estas emulsiones se formularon por componentes a escala laboratorial, por lo que sería necesario ajustar las condiciones de preparación y la formulación para conseguir emulsiones estables con parafina. En un estudio previo (6), se comprobó que en emulsiones con fase oleosa basada en el aceite de colza, la β -ciclodextrina ejercía un mayor efecto estabilizante que el Tween 80 en estudios con *Lactobacillus delbrueckii*, por lo que sería un candidato a tener en cuenta como emulsificante en el futuro.

Conocer la supervivencia de la cepa a diferentes condiciones y tiempos nos ayudará a comprender la capacidad protectora de las emulsiones al exponerlas a diferentes temperaturas de almacenaje (4 °C, 25 °C o -20 °C) o fisiológica (37 °C) y comprobar cuánto tiempo podrían mantener las concentraciones óptimas en esas condiciones. Las emulsiones que mejores resultados obtuvieron fueron la 7 y 8 al lograr la menor pérdida de concentración de la cepa probiótica tras dos semanas, siendo dicha pérdida menor a 1 unidad logarítmica a 4 °C y 25 °C y manteniéndose a -20 °C. Por el contrario, los peores resultados de estabilidad de la cepa se obtuvieron con la emulsión 6, por lo que este tipo de emulsión en gel no es adecuado para la protección de este tipo de cepas vivas. En el resto de las emulsiones de este estudio (1, 2, 3, 4 y 5), observamos una pérdida de concentración de la cepa de *Lactobacillus* de entre 1,07 y 2,03 log UFC/mL. Resultados similares fueron obtenidos por Sipailiene y colaboradores en 2026 (16), los cuales llevaron a cabo una emulsión de tipo W/O/W, cuya composición era manitol en la fase acuosa interna, extracto de orujo de espino amarillo lipofílico en la fase oleosa y alginato en la fase acuosa externa. Con dicha emulsión los autores probaron la supervivencia de otra cepa de *Lactobacillus* a 25 °C y obtuvieron una pérdida en la concentración celular de 2 log UFC/mL tras dos semanas. Por lo tanto, la combinación de parafina líquida (fase oleosa) y Tween 80 (fase acuosa) parece presentar mayor eficacia en cuanto a la protección de cepas de *Lactobacillus*.

Los mejores resultados de supervivencia en todas las emulsiones se obtuvieron a -20 °C. A dicha temperatura la concentración de la cepa probiótica disminuyó levemente con respecto a la concentración de partida, excepto en las emulsiones 1 y 6, en las que la concentración de la cepa disminuyó más de 1 log UFC/mL. Por el contrario, los peores resultados de supervivencia se obtuvieron a 25 °C. Por lo tanto, la supervivencia de la cepa en emulsión se mantiene mejor a temperaturas más bajas. Esto se corresponde con lo descrito en cepas del género *Lactobacillus* liofilizadas, las cuales mantienen mayor viabilidad a temperaturas de refrigeración o congelación en comparación con temperatura ambiente (19).

Para la prueba de actividad antimicrobiana en co-cultivo se seleccionaron las emulsiones 7 y 8 al presentar los mejores resultados de supervivencia de la cepa de *Lactobacillus*. Aunque dichas emulsiones no obtuvieron los mejores resultados de estabilidad, prevalecieron los resultados de supervivencia de la cepa, ya que se podrán realizar ajustes a escala laboratorial en el futuro para mejorar la estabilidad de las emulsiones. Las emulsiones 7 y 8 mostraron una capacidad de inhibición frente *S. aureus* de 2,47 unidades logarítmicas (emulsión 7) y 2,90 unidades logarítmicas (emulsión 8) en co-cultivo. Hasta la fecha no existen estudios previos que evalúen la actividad antimicrobiana en co-cultivo de una cepa de *Lactobacillus* en emulsión. Sin embargo, previos estudios (20,21) que han evaluado diferentes cepas de *Lactobacillus* en co-cultivo en medio de cultivo frente a *S. aureus*, han obtenido una reducción del patógeno similar, entre 1,2 y 2,61 unidades logarítmicas. La cepa de *Lactobacillus* de nuestro estudio fue evaluada previamente en co-cultivo sin emulsionar (resultados no mostrados) obteniendo una reducción del mismo patógeno de más de 2 unidades logarítmicas, por lo que la cepa mantiene su actividad antimicrobiana cuando es vehiculada en emulsión.

Vehicular probióticos en emulsiones, que prolonguen su vida útil y faciliten su almacenaje y su administración manteniendo sus propiedades beneficiosas, es una herramienta interesante para las industrias farmacéutica, alimentaria o cosmética. De esta forma, se podrían utilizar probióticos en emulsión para acelerar la sanación de una herida infectada al inhibir el desarrollo de los patógenos (22) o como loción antioxidante en el sector de la cosmética (23). En este estudio, las emulsiones a base de parafina líquida han mostrado ser una posibilidad que podría facilitar el almacenaje de los probióticos a

temperatura ambiente, manteniendo su concentración y actividad antimicrobiana. Sin embargo, aún son necesarios más estudios para mejorar la estabilidad de dichas emulsiones y que permitan su escalado a nivel industrial. Además, será necesario evaluar la supervivencia y actividad antimicrobiana de la cepa en periodos de tiempo más prolongados.

Conclusiones.

- De las 8 emulsiones testadas, fueron estables las emulsiones 3, 4, 5 (W/O/W) y 6 (Gel/W).
- La cepa probiótica presentó mejores resultados de supervivencia en las emulsiones 7 y 8 (W/O), a base de parafina líquida, durante 2 semanas a 25 °C, 4°C y -20 °C.
- La cepa probiótica mantuvo su actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* formulada en emulsión W/O con parafina líquida.
- Las emulsiones a base de parafina líquidas son una buena opción para incrementar la supervivencia de la cepa probiótica, sin embargo, harán falta nuevos ensayos para optimizar su estabilidad y probar su protección en periodos prolongados.

Bibliografía.

1. Mustafa Ozen, Dinleyici. The history of probiotics: the untold story. Wageningen Academic Publishers. 26 de septiembre de 2014;
2. Manoj Kumar Yadav, Indu Kumari, Bijender Singh, Krishna Kant Sharma, Santosh Kumar Tiwari. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. Springer-Verlag GmbH. 11 de enero de 2022;
3. Jotham Suez, Niv Zmora, Eran Segal, Eran Elinav. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. Nature medicine. mayo de 2019;
4. Gilliland, Stanley E, Morelli Lorenzo, Reid Gregor. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations y World Health Organization. octubre de 2001;
5. Saif Ul Islam. Clinical Uses of Probiotics. Medicine. 29 de diciembre de 2015;
6. Fatemah Haji, James Cheon, Jiyoo Baek, Qi Wang, Kam Chiu Tam. Application of Pickering emulsions in probiotic encapsulation- A review. Current Research in Food Science. 12 de septiembre de 2022;
7. Grégoire Wieërs, Leila Belkhir, Raphaël Enaud, Sophie Leclercq, Jean-Michel Philippart de Foy, Isabelle Dequenne, et al. How Probiotics Affect the Microbiota. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 15 de enero de 2020;
8. Jun Chen, Qi Wang, Cheng-mei Liu, Joshua Gong. Issues Deserve Attention in Encapsulating Probiotics: Critical Review of Existing Literature. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 9 de enero de 2015;
9. Hongxia Gao, Xin Huang, Youfa Xie, Suqiong Fang, Wenrong Chen, Kui Zhang, et al. Improving the gastrointestinal activity of probiotics through encapsulation with biphasic gel water-in-oil emulsions. Food & Function. 2 de septiembre de 2022;
10. Marina Scillato, Ambra Spitale, Gino Mongelli, Grete Francesca Privitera, Katia Mangano, Antonio Cianci, et al. Antimicrobial properties of Lactobacillus cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. MicrobiologyOpen. 9 de abril de 2021;
11. Esther Jiménez, Victor Ladero, Irene Chico, Antonio Maldonado-Barragán, María López, Virginia Martín, et al. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. BMC Microbiology. 10 de diciembre de 2013;
12. Ellie J. C. Goldstein, Kerin L. Tyrrell, Diane M. Citron. Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. Oxford journals. 6 de mayo de 2015;
13. David H. Martin. The Microbiota of the Vagina and Its Influence on Women's Health and Disease. The American Journal of the Medical Sciences. enero de 2012;
14. Rodrigues, Cedran, Bicas, Sato. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review. Food Research International. 6 de septiembre de 2020;
15. Shubhi Singh, Rishibha Gupta, Sonam Chawla, Pammi Gauba, Manisha Singh, Raj Kumar Tiwari, et al. Natural sources and encapsulating materials for probiotics delivery systems: Recent applications and challenges in functional food development. Frontiers in Nutrition. 21 de septiembre de 2022;
16. Ausra Sipailiene_, Greta Slimaite_, Sigita Jezniene_, Petras Rimantas Venskutonis, Daiva Leskauskaite_. W/O/W double emulsion-loaded alginate capsules containing Lactobacillus plantarum and lipophilic sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) pomace extract in different phases. Food Science and Technology International. 26

de abril de 2021;

17. Huan Liu, Steve W. Cui, Maoshen Chen, Yue li, Rong Liang, Feifei Xu, et al. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 9 de julio de 2019;

18. Qiu-Yue Dong, Meng-Yan Chen, Yang Xin, Xue-Yan Qin, Zhuo Cheng, Lu-E Shi, et al. Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 25 de noviembre de 2012;

19. Latife Betul Gul, Ahmet Hilmi Con, Osman Gul. Storage stability and sourdough acidification kinetic of freeze-dried *Lactobacillus curvatus* N19 under optimized cryoprotectant formulation. *Cryobiology*. 20 de julio de 2020;

20. Kamila Zdenkova, Babek Alibayov, Ludmila Karamonova, Sabina Purkrtova, Renata Karpiskova, Katerina Demnerova. Transcriptomic and metabolic responses of *Staphylococcus aureus* in mixed culture with *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus durans* in milk. *Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*. 24 de junio de 2016;

21. Sulaiman F. Aljasir, Dennis J. D'Amico. The effect of protective cultures on *Staphylococcus aureus* growth and T enterotoxin production. *Food Microbiology*. 30 de abril de 2020;

22. Zunzhen Ming, Lin Han, Meiyu Bao, Huanhuan Zhu, Sujing Qiang, Shaobo Xue, et al. Living Bacterial Hydrogels for Accelerated Infected Wound Healing. *Advanced Science*. 8 de diciembre de 2021;

23. Hyo-Tae Kim, Jiseon Lee, Yeon-Ji Jo, Mi-Jung Choi. Application of Liposome Encapsulating *Lactobacillus curvatus* Extract in Cosmetic Emulsion Lotion. *Materials*. 9 de diciembre de 2021;