

Efecto de extractos de chile serrano (*Capsicum annuum* L. var. serrano) sobre cepas probióticas

Origel-Rivas, I.^{1*} • Velasco-Olvera, I.¹ • Velázquez-Olivares, D.A.¹ • Marrón-Montiel, E.¹ • Rivas Castro, S.F.¹

Palabras clave: levadura, prebiótico, cinética de crecimiento.

Key words: yeast, prebiotic, growth kinetic

Introducción

En la actualidad existe un mercado creciente de alimentos funcionales que incluye una variedad importante de productos probióticos, estos productos pueden otorgar al consumidor beneficios a la salud cuando son ingeridos en cantidades adecuadas. Entre los principales beneficios derivados de consumo de probióticos se encuentran, el mejoramiento en la composición de la microbiota intestinal, la prevención y tratamiento de diarreas infecciosas, reducción de los síntomas de la inflamación intestinal, disminución de los niveles de colesterol, o bien revertir en cierto grado la intolerancia a la lactosa, entre otros [1, 2]. Sin embargo, también se conoce que en la dieta se encuentran compuestos que pueden evitar que los

probióticos se establezcan en el intestino de los consumidores o que inhiban el metabolismo de estos

Una de las características principales que destaca a la comida mexicana es sin duda el sabor picante, los mexicanos no podemos concebir nuestras comidas o golosinas principales sin dicho sabor, el ingrediente responsable de otorgar esta característica a nuestros alimentos son los chiles. La capsaicina es un compuesto que se encuentra en los chiles, es la molécula que produce sensación picante y es responsable del efecto de quemor e irritante tras su consumo. Se han realizado estudios para definir si la capsaicina puede tener en los alimentos el papel de conservador (agente bacteriostático o bactericida), además de aportar

1 Tecnológico de Estudios Superiores de Villa Guerrero. Carretera Federal Toluca-Ixtapan de la Sal, kilómetro 64.5, C.P. 51760, La Finca, Villa Guerrero, Estado de México, México.

* tzlorigel@gmail.com



picor, la revisión realizada por Omolo y colaboradores en 2014 [3] cita trabajos que evaluaron el efecto de la capsaicina pura (obtenida de Sigma Aldrich®) y extractos de diferentes especies vegetales sobre cepas de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*, en todos los casos se reportaron efectos inhibitorios del crecimiento microbiano. Marini y colaboradores en 2015 [4] estudiaron la actividad antimicrobiana de la capsaicina sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* eritromicina resistentes, ellos reconocieron que en un intervalo de concentración entre 64 y 128 µg/mL, la capsaicina tiene un efecto bactericida contra *Streptococcus pyogenes*, y en concentraciones subletales las cepas pierden la capacidad de invasión sobre las células blanco. El presente trabajo tiene el objetivo de evaluar el efecto de extractos de chile serrano (*Capsicum annum* L. var. serrano) sobre la viabilidad de diferentes cepas de microorganismos probióticos

Metodología

Fase 1: Aislamiento de cepas probióticas comerciales.

Se seleccionaron tres cepas probióticas

- i. A partir de Yakult® se aisló la cepa probiótica *Lactobacillus casei* Shirota en medio de cultivo Agar Man Rogosa Sharpe (AMRS).
- ii. A partir de Floratil® se aisló la cepa probiótica *Saccharomyces boulardii* en medio de cultivo Agar Dextrosa Sabourad (ADS).
- iii. A partir del producto comercial Sinuberase® se aisló la cepa probiótica *Bacillus clausii* en medio de cultivo Agar nutritivo (AN).

Fase 2: Preparación de extractos

Se realizaron cinco extractos con una concentración de 0.36 g de chile serrano por cada mililitro de agua destilada, diferenciados por las partes del chile que componían los extractos, 1) cuerpo, vena y semilla, 2) cuerpo, 3) cuerpo y vena, 4) semilla y 5) vena. Posteriormente se realizaron 3 extractos distintos cada uno con diferente concentración del cuerpo del chile, extracto A) 0.5 g/mL, B) 0.25 g/mL y C) 0.1 g/mL. En todos los casos la extracción se realizó por 24 h a temperatura ambiente, el extracto se esterilizó en autoclave y fueron separados los sólidos presentes.

Fase 3. Evaluación cualitativa del efecto de los extractos de chile serrano sobre el crecimiento microbiano de las cepas probióticas de trabajo

- Evaluación en medio líquido, en tubos de ensayo estériles con capacidad de 5 mL se prepararon las muestras para evaluar cualitativamente el efecto de los extractos 1, 2 y 3 sobre los microorganismos. La formulación de las muestras en contacto con los extractos fue la siguiente, muestra E1 2.5 mL de medio de cultivo y 1 mL de extracto 1, muestra E2 2.5 mL de medio de cultivo y 1 mL de extracto 2 y la muestra E3 con 2.5 mL de medio de cultivo y 1 mL de extracto 3. Se empleó una muestra como control con 2.5 mL de medio de cultivo y 1 mL de solución salina. Los medios de cultivo líquidos empleados fueron caldo nutritivo para *Bacillus clausii*, caldo MRS para *Lactobacillus casei* y caldo dextrosa Sabouraud en el caso de *Saccharomyces boulardii*.
- Método en césped microbiano, sobre un césped microbiano (sembrado en el mismo medio de cultivo sólido empleado en el aislamiento de cada microorganismo) se colocaron 3 discos de papel de 0.5 cm de diámetro esterilizados con luz ultravioleta, el primer disco de papel no contenía ningún extracto, el segundo disco contenía 50 µL de extracto 4 y el tercer disco 50 µL de extracto 5, las placas se incubaron de acuerdo con los requerimientos ambientales de cada microorganismo durante el tiempo correspondiente, después de su periodo de incubación se revisaron las placas, la presencia de un halo generado por la ausencia de crecimiento microbiano alrededor de los discos de papel indicó un efecto de inhibición.

Fase 4. Evaluación del efecto de los extractos de chile serrano sobre el crecimiento de las cepas de *Saccharomyces boulardii* y *Lactobacillus casei* en medio de cultivo líquido

La Tabla 1 muestra el diseño experimental del efecto de los extractos sobre *Saccharomyces boulardii*, el experimento se llevó a cabo en microtubos y por triplicado, el crecimiento microbiano fue medido por turbidez después de 24 h de cultivo empleando un espectrofotómetro (Absorbancia a 600 nm).

Posteriormente se realizó una cinética midiendo

el crecimiento a las 0, 24, 48 y 72 horas, utilizando una suspensión de *Saccharomyces boulardii* ajustada al tubo # 7 de McFarland. Para esta cinética se emplearon matraces Erlenmeyer de 50 mL, con un volumen de medio de 25 mL, cada muestra se evaluó por triplicado. En la Tabla 2 se muestra el diseño experimental.

Se realizó la cinética de crecimiento para *Lactobacillus casei* Shirota utilizando una suspensión ajustada al tubo # 5 de McFarland, el seguimiento de la cinética se realizó de la misma forma que para *Saccharomyces boulardii*. En la Tabla 3 se describe el diseño experimental

Tabla 1. Diseño experimental de la cinética de crecimiento de *S. boulardii* en microtubos.

Muestra	Volumen de caldo dextrosa Sabouraud (mL)	Volumen de extracto (mL)			Solución salina (mL)	Suspensión microbiana (mL)
		E1	E2	E3		
CS	0.9	-	-	-	0.1	-
CC	0.9	-	-	-	-	0.1
E1	0.6	0.3	-	-	-	0.1
E2	0.6	-	0.3	-	-	0.1
E3	0.6	-	-	0.3	-	0.1

CS: Control de reactivos. CC: Control de crecimiento.

Tabla 2. Diseño experimental de la cinética de crecimiento de *S. boulardii*

Muestra	Volumen de caldo dextrosa Sabouraud (mL)	Volumen de extracto (mL)			Solución salina (mL)	Suspensión microbiana (mL)
		EA	EB	EC		
CS	24	-	-	-	1	-
CC	24	-	-	-	-	1
EA	16	8	-	-	-	1
EB	16	-	8	-	-	1
EC	16	-	-	8	-	1

CS: Control de reactivos. CC: Control de crecimiento.

Tabla 3. Diseño experimental de la cinética de crecimiento de *L. casei*

Muestra	Volumen de caldo MRS (mL)	Volumen de extracto (mL)			Solución salina (mL)	Suspensión microbiana (mL)
		EA	EB	EC		
CS	24	-	-	-	1	-
CC	24	-	-	-	-	1
EA	16	8	-	-	-	1
EB	16	-	8	-	-	1
EC	16	-	-	8	-	1

CS: Control de reactivos. CC: Control de crecimiento.

Resultados y discusión

Evaluación cualitativa del efecto de los extractos de chile serrano sobre el crecimiento microbiano de las cepas de trabajo

La evaluación visual mostró crecimiento de las tres cepas probióticas en presencia de cualquier extracto de chile serrano tal como se muestra en la Tabla 4, las muestras que contenían extracto 3 (cuerpo y vena del chile) fueron en las que se apreció un mayor crecimiento visualmente, mientras que en el extracto 1 fue en el cual se observó un menor crecimiento, esto puede deberse a que el extracto 1 está compuesto de todas las partes del chile y por lo tanto la diversidad de componentes extraídos puede ser mayor.

Para comprobar si los extractos a partir de la vena y la semilla del chile provocaban la inhibición del crecimiento sobre las cepas se empleó la metodología de césped microbiano, en ningún caso se presentó inhibición de crecimiento.

*Evaluación del efecto de los extractos de chile serrano sobre el crecimiento de las cepas de *Saccharomyces boulardii* y *Lactobacillus casei* en medio de cultivo líquido*

En la Figura 1 se observan los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento de *S. boulardii* cuando se puso en contacto con las diferentes formulaciones de los extractos.

El crecimiento de la levadura en el medio de cultivo sin la adición de ningún extracto (Control de crecimiento en el medio de cultivo) se encuentra por debajo del crecimiento presentado por la levadura cuando se pone en contacto con los diferentes extractos (A, B y C). Se puede observar que el cultivo con extracto A presentó un 18% más crecimiento en comparación con el control de crecimiento, un 7% más crecimiento en comparación con el extracto B y un 13% más crecimiento en comparación con el extracto C.

En la Figura 2 se observan los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento de *L. casei* cuando se puso en contacto con diferentes formulaciones de extractos.

El crecimiento de *L. casei* en el medio de cultivo sin

la adición de ningún extracto se encuentra por debajo del crecimiento presentado por los medios de cultivo adicionados con algún extracto. Se observa que el medio de cultivo adicionado con extracto A presenta un 37% más crecimiento en comparación con el medio de cultivo sin extracto (CC), un 2% más en comparación con el extracto B y un 5% más en comparación con el extracto C.

Se ha reportado un efecto antimicrobiano de extractos de *Capsicum annum* sobre microorganismos Gram negativos como *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* [5], este efecto se le ha atribuido principalmente al contenido de capsaicinoides, sin embargo se conoce que algunos otros componentes también son responsables de dicho efecto tales como el 2H-Tetrahidrotiopirano, ácido α -hidroxido-decanoico, α -D-glucopiranosido, entre otros [6], sin embargo, los resultados obtenidos al emplear extractos formulados con las diferentes partes que componen al fruto, mostraron que no existe un efecto inhibitorio sobre *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus casei* y *Bacillus clausii* tanto en medio líquido como en medio sólido, lo efectos de inhibición referenciados se realizaron con microorganismos patógenos a diferencia de nuestro estudio.

Los resultados de ambas cinéticas de crecimiento muestran en todos los casos que, a mayor concentración de chile en el extracto, mayor crecimiento indistintamente del microorganismo empleado, estos resultados probablemente se deban a la presencia de componentes del fruto que puedan servir de sustrato de los microorganismos probióticos.

En recientes estudios donde se han realizados caracterizaciones bioquímicas de frutos del género *Capsicum*, se ha encontrado un contenido de carbohidratos que oscila en 9.5% de su peso seco, de los cuales 1.75% corresponde a fibra, una descripción más detallada de la composición de los carbohidratos presentes indica la existencia de cierto porcentaje de almidón, pectina y algunos azúcares reductores disponibles como Gal, Rha, Ara, Xyl y Glc.

Otro hallazgo importante indica que una de las fracciones de las pectinas está constituida de arabino-

Tabla 4. . Evaluación cualitativa del efecto de los extractos de chile serrano sobre el crecimiento microbiano de las cepas de trabajo.

Muestra	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bacillus clausii</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
Control	++	++	++
Extracto 1	+	+	+
Extracto 2	++	++	++
Extracto 3	+++	+++	+++
Extracto 4	++	+	++

(+) Presencia de crecimiento, (++) crecimiento notable, (+++) crecimiento abundante.

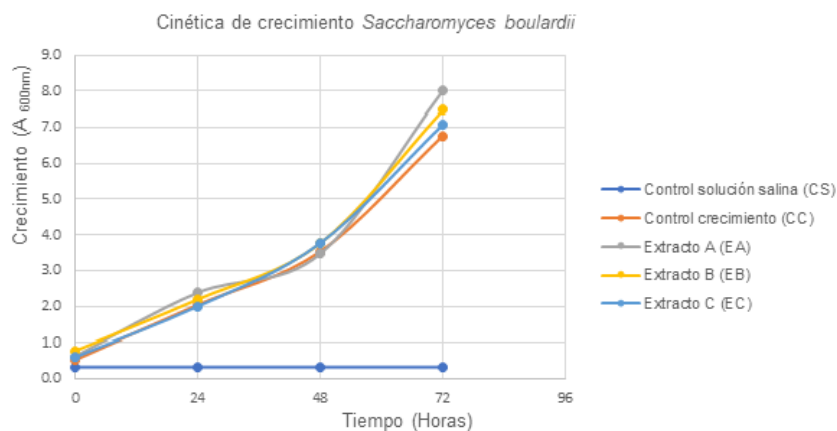


Figura 1. Cinética de crecimiento de *S. boulardii* en muestras control (CS y CC) y extractos (EA, EB y EC) a las 0 h, 24 h, 48 y 72 h. CS) medio de cultivo y solución salina, CC) medio de cultivo y suspensión de *S. boulardii*, EA) extracto con una concentración de 0.5 g/mL, EB) extracto con una concentración de 0.25 g/mL y EC) extracto con concentración de 0.1 g/mL.

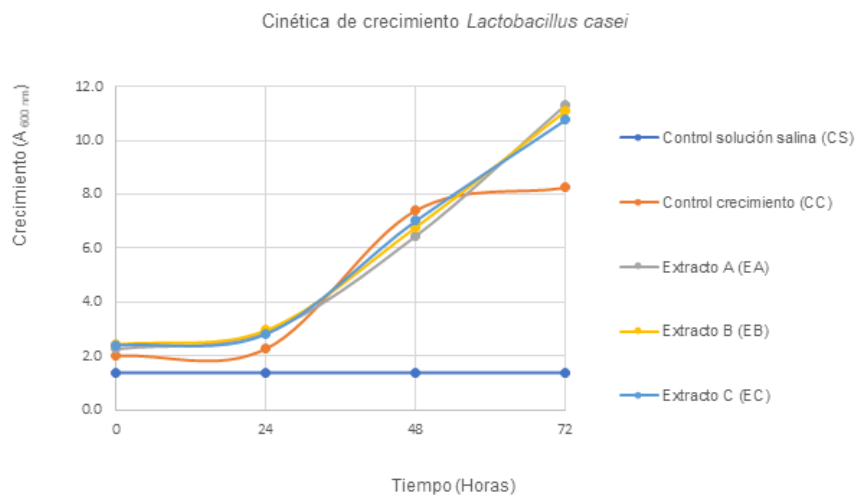


Figura 2. Cinética de crecimiento de *L. casei* en muestras control (CS y CC) y extractos (EA, EB y EC) a las 0 h, 24 h, 48 h, y 72 h. CS) medio de cultivo y solución salina, CC) medio de cultivo y suspensión de *L. casei*, EA) extracto con una concentración de 0.5 g/mL, EB) extracto con una concentración de 0.25 g/mL y EC) extracto con concentración de 0.1 g/mL.

galactanos del tipo I y II, los cuales se han identificado como sustratos que incrementan significativamente las poblaciones de lactobacilos en intestinos de adultos [6-8], los resultados obtenidos, en conjunto con lo citado anteriormente vislumbran la posibilidad de que ciertos componentes de los extractos obtenidos pudiesen ser considerados sustratos prebióticos.

Conclusiones

Con base a los resultados obtenidos se concluye que los extractos empleados de chile serrano (*Capsicum annuum*) no solo no presentan efecto de inhibición sobre las cepas probióticas empleadas, sino que, promueven su crecimiento, vislumbrando un posible efecto prebiótico.

Referencias

1. Garrote A, Ramon Bonet Y. *Farmacia Abierta*. Vol 31.; 2017.
2. Serrano S, Burillo T, Fernández C, López J, Serrano P, Hernández C. Asociación Entre El Síndrome Coronario Agudo y El Consumo de Antiinflamatorios No Esteroides. *Ars Pharmaceutica* Vol 56.; 2015. <http://farmacia.ugr.es/ars>
3. Omolo M. Antimicrobial Properties of Chili Peppers. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*. 2014. doi:10.4172/2332-0877.1000145
4. Marini E, Magi G, Mingoia M, Pugnali A, Facinelli B. Antimicrobial and anti-virulence activity of capsaicin against erythromycin-resistant, cell-invasive group A streptococci. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6(NOV). doi:10.3389/FMICB.2015.01281/ABSTRACT
5. Santos MMP, Vieira-Da-Motta O, Vieira IJC, et al. Antibacterial activity of *Capsicum annuum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*. *Journal of Natural Medicines*. 2012. doi:10.1007/s11418-011-0579-x
6. Malakar S, Sarkar S, Kumar N, Santanu Malakar C, Jaganmohan R. Studies of biochemical characteristics and identification of active phyto-compounds of king chili (*Capsicum chinense* Jacq.) using GC-MS. ~ 3100 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018;7(3):3100-3104.
7. do Nascimento GE, Iacomini M, Cordeiro LMC. New findings on green sweet pepper (*Capsicum annuum*) pectins: Rhamnogalacturonan and type I and II arabinogalactans. *Carbohydr Polym*. 2017. doi:10.1016/j.carbpol.2017.05.029
8. Chen O, Sudakaran S, Blonquist T, Mah E, Durkee S, Bellamine A. Effect of arabinogalactan on the gut microbiome: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial in healthy adults. *Nutrition*. 2021. doi:10.1016/j.nut.2021.111273