



Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

Identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL) del proceso de fermentación de cacao reemplazando el mucílago por pulpa de maracuyá y banana.

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

Autor de la tesis:

Santiago Fabián Villacrés Chérrez

Director de la tesis:

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

Cuenca, Ecuador 2021

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada principalmente a mis padres, los cuales me brindaron el apoyo para poder seguir adelante, depositaron toda su confianza en mí y supieron guiarme hasta este momento.

A todas las personas que formaron parte de mi vida y brindaron todo su apoyo para poder continuar durante esta gran travesía.

AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres, por haber confiado en mí y en mis aptitudes y por brindarme el honor de formar parte de este gran proyecto y compartir su vasto conocimiento conmigo. Gracias por haber dedicado su tiempo a guiarme, ayudarme y aconsejarme durante este proceso y así lograr un gran proyecto de titulación, sobretodo, por haberlo dado todo como docente, director de tesis y amigo.

De igual forma, quiero agradecer a la Universidad del Azuay por brindar las facilidades de trabajar en sus instalaciones y por procurar siempre la salud de todos aquellos que conformamos esta noble y gran institución. Igualmente, a los docentes, laboratoristas, pasantes y todo aquel que forma parte de la institución y que, a su manera, contribuyeron con mi desarrollo profesional.

Un agradecimiento especial al Ing. Miguel Urgilez, por brindarnos un espacio en sus instalaciones para poder llevar a cabo la experimentación requerida en este proyecto y por estar siempre dispuesto a compartir sus ideas y brindar su ayuda.

También quiero agradecer a mi madre la Ing. Gielene Chérrez y a mi padre el Ing. Santiago Villacrés, quienes, a pesar de las dificultades, dieron todo de sí para formarme como un gran ser humano y un gran profesional. A mi modelo a seguir, el Dr. Rodrigo Chérrez, por enseñarme sobre la fuerza de voluntad y la capacidad de levantarme después de cada caída. Por último, a todos mis familiares que me apoyaron desde el primer día y me dieron el empuje para llegar hasta la cima.

Finalmente, a aquellas personas que hoy llamo mis amigos y muy pronto podré llamarlos colegas, gracias por formar parte de esta gran experiencia como estudiante, lograron que este proceso de aprendizaje sea único y memorable. Cada una de sus enseñanzas me ayudaron a no rendirme y siempre dar todo para lograr cada objetivo propuesto.

RESUMEN

La identidad de bacterias ácido lácticas (BAL) de granos de cacao CCN-51 fermentados con una mezcla de frutas (89% maracuyá:11% banano) no ha sido determinada. Este trabajo tuvo como objetivo identificar las BAL responsables de la fermentación modificada en Putucay. Se tomaron muestras por seis días, se sembraron en medio de cultivo MRS y las bacterias aisladas fueron identificadas con herramientas de biología molecular. *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* fueron los principales géneros identificados de BAL, además de *Gluconobacter*, una bacteria ácido acética. Esta información permitió conocer los géneros bacterianos responsables de esta fermentación y su potencial importancia.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas, cacao CCN-51, fermentación modificada, biología molecular, bacteria ácido acética.



Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

Director de tesis



María Fernanda Rosales Medina

Directora de escuela



Santiago Fabián Villacrés Chérrez

Autor

ABSTRACT

The identity of lactic acid bacteria (LAB) of CCN-51 cacao beans fermented with a fruit mixture (89% passion fruit: 11% banana) has not been determined. This study aimed to identify the LAB responsible for the modified fermentation in Putucay. Samples were taken for six days, they were grown in an MRS culture medium and the isolated bacteria were identified with molecular biology tools. The main identified genera of LAB were *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* and *Lactococcus*, in addition, *Gluconobacter*, an acetic acid bacterium, was identified. This information allowed the recognition of the bacterial genera responsible for this fermentation and their potential value.

Keywords: lactic acid bacteria, CCN-51 cacao, modified fermentation, molecular biology, acetic acid bacteria.



Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

Thesis Director



María Fernanda Rosales Medina

Faculty Director



Santiago Fabián Villacrés Chérrez

Author

Translated by



Santiago Fabián Villacrés Chérrez

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE ANEXOS	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: MATERIALES Y MÉTODOS	7
1.1. Fermentación	7
1.2. Aislamiento de BAL	7
1.3. Extracción y Amplificación de ADN	7
1.4. Obtención y análisis de las secuencias de ADN	9
1.5. Análisis independiente de cultivo (metagenómica)	9
CAPÍTULO 2: RESULTADOS	10
2.1. Aproximaciones dependientes de cultivo	10
2.2. Aproximaciones independientes de cultivo (metagenómica)	14
CAPÍTULO 3: DISCUSIONES	18
3.1. Identificación de BAL	18
3.2. Identificación de BAA	19
CONCLUSIONES	22
RECOMENDACIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	23
ANEXOS	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento de las bacterias durante los seis días de fermentación en medio de cultivo MRS (agar) con 0.2% de sorbato a pH 6.5, 5.5 y 5.....	11
Figura 2. Géneros bacterianos identificados en las aproximaciones dependientes de cultivo. Se muestran los porcentajes de representación del total de muestras de bacterias aisladas provenientes de la fermentación del cacao con reemplazo del mucílago por pulpa de maracuyá y banano.....	14
Figura 3. Porcentajes de las especies más representativas según el análisis metagenómico separadas por géneros. <i>Lactobacillus</i> (a), <i>Lactococcus</i> (b), <i>Leuconostoc</i> (c) y <i>Weissella</i> (d). Datos obtenidos de la fermentación de los granos de cacao con reemplazo del mucílago por pulpa de maracuyá y banano.....	16
Figura 4. Comportamiento de las especies bacterianas más abundantes, según el análisis metagenómico. Se incluyen los 6 días de fermentación de los granos de cacao con reemplazo del mucílago por pulpa de maracuyá y banano.....	17

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies bacterianas presentes en distintas fermentaciones de cacao Recopilado de (Papalexandratou et al., 2011).....	3
Tabla 2. Procedencia y características de las bacterias aisladas obtenidas por la fermentación del cacao con sustituto del mucílago por pulpa de fruta.....	12

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. ADN genómico extraído de bacterias Gram+ (b) comparado con un ladder 1Kb (a) y un ladder 100 bp (c). Ambos ladders provenientes de la empresa Invitrogen.	26
Anexo 2. Ladder 1kb (M) y ADN amplificado de seis bacterias Gram+ (Carriles 1 a 6).....	26
Anexo 3. Ladder 1kb (M) y ADN purificado de 4 bacterias bacterias Gram+ (Carriles 1 a 4).	27
Anexo 4. Requisitos solicitados por la empresa Macrogen para las muestras a secuenciar (https://dna.macrogen.com/pageLinkDnaSys.do?menuCd=SUP100200&layout=page_sub&link=%2Fsupport%2FretrieveGuideCes#none).....	27
Anexo 5. Ejemplo de una secuencia obtenida (Software SnapGene) y de las secciones de mala calidad (a, c) y la sección de buena calidad (b).	27
Anexo 6. Levaduras identificadas por medio de microscopia (aumento 100X).	28
Anexo 7. Bacterias Gram- identificadas por microscopia (aumento 100X).	28
Anexo 8. Bacterias Gram+ con forma de bacilos identificadas por microscopia (aumento 100X).	29
Anexo 9. Bacterias Gram+ con forma de cocobacilos identificadas por microscopia (aumento 100X).	29
Anexo 10. Bacterias Gram+ forma de coco identificadas por microscopia (aumento 100X).	30

Santiago Fabián Villacrés Chérrez

Trabajo de graduación

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

Abril 2021

Identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL) del proceso de fermentación de cacao reemplazando el mucílago por pulpa de maracuyá y banana.

INTRODUCCIÓN

Marco Teórico

Características del cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol de 4-8 m de alto perteneciente a la familia *Esterculiácea*. Es nativo de las regiones tropicales de América, con semillas que contienen una cantidad significativa de grasas (40-50%) y polifenoles (10%). (Vera Chang et al., 2015).

En Ecuador existen tres variedades principales de cacao: Forastero, Criollo y Trinitario. La variedad Forastero es la más cultivada en el mundo, ya que, posee un alto rendimiento. Por otro lado, el cacao Criollo es cultivado en menor proporción ya que su rendimiento es menor y, por último, el cacao Trinitario es el resultado de la mezcla entre el cacao Forastero y Criollo (Zambrano, 2017). La variedad CCN-51 es un clon, elaborada a partir de variedades de Trinitario y otros cultivos para obtener un cacao de calidad, resistente a plagas, enfermedades y con altos niveles de producción. Se obtuvo en el cantón de Naranjal en la hacienda "Sofía" (Campoverde & Zambrano, 2019).

Los grandes productores, han preferido el uso de la variedad CCN-51 ya que permite un sistema de producción de monocultivo con alta utilización de insumos, lo que ayuda a tener un mayor control de plagas. Sin embargo, esta variedad no presenta las características únicas del "Cacao Fino de Aroma", las cuales son tan solicitadas en el mercado internacional (Quingaísa & Riveros, 2007).

Fermentación del cacao

La fermentación del cacao consiste en una serie de cambios físicos-químicos que desarrollan el sabor y aroma a chocolate (Teneda, 2016). En la fermentación se desarrollan los precursores del sabor a chocolate. Estos compuestos interactúan en el proceso de tostado, produciendo los componentes específicos del aroma y sabor a chocolate, tales como alcoholes, éteres, fenoles, furanos, ésteres, aldehídos, cetonas, entre otros, estos contribuyen a una agradable impresión sensorial (Díaz et al., 2012).

El proceso de fermentación se lleva a cabo mediante la colocación de los granos de cacao en recipientes adecuados o en sacos formando pilas. Estos son cubiertos con hojas de plátano

u otro material, que no sea plástico, para crear un ambiente semicerrado. El número de días que demoran en desarrollarse los fenómenos bioquímicos de la fermentación depende de diferentes factores. Por lo general el tipo criollo necesita de 3-4 días, el trinitario de 5-6 días, forastero de 5-8 días y el CCN-51 de 6-7 días (Campoverde & Zambrano, 2019). El número de días de fermentación influirá directamente sobre los distintos compuestos formados, que agregan sabor y aroma al grano (chocolate, caramelo, dulce, nuez, miel, fruta y flor) (Pallares-Pallares et al., 2016)

Es necesario mencionar que este es un bioproceso espontáneo, por ende, las especies microbianas que se encuentran presentes difieren entre lotes, estaciones y ubicaciones geográficas (Raspor & Goranovič, 2008). Es un proceso que se ve afectado por muchas variables, algunas de las cuales son controlables, sin embargo, la complejidad del mismo permite ofrecer recomendaciones generales sobre los tiempos y formas de fermentación (COEXCA, 2011).

Existen distintos procesos que se pueden utilizar para mejorar la calidad del chocolate, una de estas es un tipo específico de fermentación modificada. Esta consiste en la sustitución del mucílago, propio del cacao, por una mezcla de la pulpa de maracuyá junto con banano. Los datos obtenidos por los análisis físicos y químicos demostraron que, para obtener un correcto proceso de fermentación y cumpliendo con las características deseadas, es necesario reemplazar al mucílago con 89% de pulpa de maracuyá y 11% de banano. Finalmente, se realizó un análisis sensorial para comparar la pasta de cacao obtenida de un proceso de fermentación normal y otra pasta de cacao obtenida de la fermentación modificada. Los encuestados señalaron que la pasta proveniente de la fermentación modificada poseía mejores características en comparación a la otra pasta, dando a entender que este proceso fermentativo genera mejoras en cuanto a las características organolépticas del producto final (Carrión, 2018).

Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las BAL constituyen un grupo de bacterias Gram positivas las cuales producen principalmente ácido láctico durante la fermentación de carbohidratos (Salminen & Wright, 2004). Son conocidas en la industria alimentaria por su uso como cultivos iniciadores en la producción de leche ácida, yogur, mantequilla, quesos madurados, etc. (Carr et al., 2017). Este grupo de bacterias aportan en el sabor, olor, textura, características sensoriales, entre otras (Parra, 2010).

Distintos experimentos realizados alrededor del mundo indican que las BAL se encuentran como los organismos predominantes durante la fermentación del cacao (Schwan et al., 2014). En la fermentación del cacao, la presencia de bacterias ácido lácticas es baja al comienzo, pero a medida que el proceso de fermentación continúa, estas aumentan, llegando a un máximo en el segundo día, para el tercer día disminuye su presencia, pero se mantiene constante hasta el final de la fermentación (Salazar et al., 2017). Otro estudio describe mayor

presencia de las bacterias ácido lácticas entre el primer y segundo día de la fermentación de cacao y se mantenían constantes hasta el último día de fermentación (Vuyst & Weckx, 2016).

Una forma de agrupar a estas bacterias es por su capacidad fermentativa, es decir, si son homofermentativas o heterofermentativas. Las bacterias homofermentativas producen ácido láctico como principal compuesto proveniente de la fermentación de la glucosa, mientras que, las bacterias heterofermentativas producen un mayor número de compuestos aparte del ácido láctico, incluyendo ácido acético, etanol y CO₂ (Carr et al., 2017). Aparte del ácido láctico, algunas BAL han sido reconocidas por su capacidad de producir bacteriocinas, que puede influir en la ecología microbiana de la fermentación. También evitan el crecimiento de hongos tóxicos durante el proceso de secado y su posterior almacenamiento (Schwan et al., 2014).

Entre los géneros dominantes en la fermentación del cacao encontramos a *Lactobacillus* como el principal, seguido de *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactococcus* (Vuyst & Weckx, 2016). Otro estudio demostró que los géneros predominantes durante la fermentación del cacao son *Acetobacter* y *Lactobacillus* (Bortolini et al., 2016).

Como se puede apreciar en la tabla 1, dependiendo del tipo de fermentación utilizada, las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden variar o mantenerse. (Papalexandratou et al., 2011).

Tabla 1. Especies bacterianas presentes en distintas fermentaciones de cacao

Recopilado de (Papalexandratou et al., 2011)

	P1	P2	B1	B2
<i>Lactobacillus cacaonum</i>	-	+	-	-
<i>Lactobacillus fabifermentans</i>	+	-	-	-
<i>Lactobacillus nagelii</i>	-	+	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+
<i>Lactobacillus lactis subsp. lactis</i>	+	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-	-	-
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	+	+	+	+
<i>Weissella cibaria</i>	+	-	-	-
<i>Weissella fabaria</i>	+	+	-	+

P1: fermentación en plataforma 1; P2: fermentación en plataforma 2; B1: fermentación en caja 1; B2: fermentación en caja2.

+: la especie bacteriana se encontraba en la fermentación.

-: la especie bacteriana no se encontraba en la fermentación.

Algunos estudios indican que, *Lactobacillus plantarum* es una especie dominante en fermentaciones realizadas en diferentes partes del mundo (Ouattara et al., 2017; Schwan et al., 2014). De igual forma, se ha encontrado que *Lactobacillus fermentum* es una especie dominante en la fermentación de cacao. Otras especies que se han logrado identificar

bacterias son *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactobacillus cacaonum*, *Weissella fabaria* y *Weissella ghanensis*, sin embargo, estas se encontraban generalmente al azar y no eran consistentes entre fermentaciones (Schwan et al., 2014).

El género *Lactobacillus*

Son microorganismos aerotolerantes o anaeróbicos, necesitan de nutrientes como carbohidratos, aminoácidos, péptidos, vitaminas, etc. (Hammes & Vogel, 1995). Una de las especies importantes es *Lactobacillus cacaonum*, la cual es una bacteria Gram positiva y anaerobia facultativa, cuya temperatura de crecimiento óptima es de 37°C en caldo de cultivo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) a pH 3.9. Esta bacteria se encarga del metabolismo de la glucosa y los principales metabolitos que produce son ácido láctico y ácido acético (De Bruyne et al., 2009). Se adapta fácilmente a la pulpa del cacao debido a su preferencia por la fructosa. Esta bacteria es de alto interés ya que se la puede utilizar como un cultivo iniciador de la fermentación de los granos de cacao (Lefeber et al., 2011).

Entre otras especies importantes se encuentra *Lactobacillus plantarum*, es una bacteria heterofermentativa importante por sus aplicaciones en alimentación y salud (Siezen et al., 2011). A esta especie se le ha atribuido la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos que pueden llegar a ser patógenos como *Escherchia coli* y *Salmonella spp*, esto debido a la producción de bacteriocinas (Fernández et al., 2014).

El género *Lactococcus*

Entre las principales funciones de este género está la producción de ácido láctico a partir de lactosa y otros azúcares, la hidrólisis de caseína, la lipólisis y la fermentación del ácido cítrico. Estos productos afectan directa o indirectamente a la textura y el sabor del producto final. *Lactococcus lactis subsp. hordniae* únicamente crea ácido a partir de la sacarosa y trehalosa, su crecimiento se da a temperaturas menores a 40°C y con un 2% de NaCl. Posiblemente puede tener la característica de producir nisina, la cual es una bacteriocina que evita el crecimiento de *Clostridium botulinum* (Kim, 2014)

El género *Leuconostoc*

El género *Leuconostoc* se puede encontrar presente en diversos ambientes, pero su hábitat natural es la vegetación y sus raíces. En la producción de alimentos fermentados, este género puede provenir de la materia a procesar, del ambiente de trabajo o de los utensilios, de los restos de anteriores fermentaciones o incluso se puede conseguir en el ámbito comercial como un cultivo iniciador de la fermentación. El género *Leuconostoc* contribuye a que los alimentos fermentados sean más comestibles, seguros y saludables, aunque es más reconocido por mejorar el aroma y textura de los productos (Hui & Özgül, 2012).

Leuconostoc pseudomesenteroides está presente en muchos productos fermentados (Meslier et al., 2012). Es una bacteria heterofermentativa y tiene la capacidad de producir dextranos, los cuales contribuyen a una mejor percepción de las texturas (Meslier et al., 2012). En el

proceso fermentativo del cacao *Leuconostoc mesenteroides* influye en la creación de ácido láctico junto con ácido acético lo que contribuye al aumento de la acidez de los granos de cacao (PASSOS et al., 1984).

El género *Weissella*

Se caracteriza por fermentar la glucosa de forma heterofermentativa, produciendo CO₂, etanol y/o acetato. Dependiendo de la especie, las temperaturas de crecimiento oscilan entre los 12°C hasta los 45°C. El hábitat de crecimiento de *Weissella* es variado, aunque, normalmente se le asocia con los productos alimenticios fermentados. *W. ghanensis* y *W. fabaria* han sido detectadas en la fermentación tradicional de los granos de cacao y *W. paramesenteroides* se ha detectado en muestras de suelo. El cultivo para su identificación se puede hacer tanto en medio LAB como en medio MRS. (Lahtinen et al., 2012).

Para algunos géneros específicos como *W. paramesenteroides* se ha atribuido la producción de bacteriocinas. A esta última especie también se la reconoce por ser resistente a medios ácidos, tolera altas concentraciones de NaCl y soporta temperaturas de crecimiento de hasta 30°C (Björkroth et al., 2014)

Bacterias ácido acéticas (BAA)

Las BAA son un grupo de microorganismos que poseen la capacidad de oxidar el alcohol y transformarlo a ácido acético. Estas bacterias se suelen encontrar en elementos azucarados como frutas o flores. Las frutas que ya han sufrido un proceso parcial de fermentación donde algunos de sus azúcares se han transformado en alcohol, son un excelente medio para la proliferación de las BAA (Guillamón & Mas, 2017). En la fermentación del cacao, a medida que la temperatura y los niveles de alcohol aumentan, es el momento preciso para que se dé el crecimiento y dominio de las BAA (Raspor & Goranovič, 2008; Yucel & Karabiyikli, 2011).

Su pH óptimo de crecimiento es de 5.5 hasta 6.3, aunque esto no impide que también proliferen en pHs más ácidos, entre 3.0 y 4.0. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25 – 30 °C. Los medios de cultivo más utilizados para BAA, suelen poseer componentes como Glucosa, manitol, extracto de levadura, CaCO₃, peptona y agar. (Guillamón & Mas, 2017; Matsushita et al., 2016; Raspor & Goranovič, 2008).

Entre las BAA, los géneros más importantes y reconocidos son *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Raspor & Goranovič, 2008; Yucel & Karabiyikli, 2011). Algunas especies de *Gluconobacter* se pueden desarrollar en presencia de oxígeno, mientras que otras son microaerófilas. Las especies del género *Acetobacter* pueden oxidar el ácido acético producido y transformarlo a CO₂ y agua (Raspor & Goranovič, 2008).

Herramientas de biología molecular

Una gran variedad de métodos han sido utilizados para la caracterización de microorganismos, con el objetivo de obtener una colección más comprensiva de datos

describiendo sus propiedades. Con todo esto, se pueden comparar las características de los microorganismos y se los puede clasificar en grupos con los que compartan características similares. En el análisis de propiedades filogenéticas, una de las moléculas marcadoras filogenéticas más usadas e investigadas son los RNA ribosomales, específicamente el rRNA 16S y el rRNA 23S. Ambas moléculas proveen todos los requisitos de las moléculas marcadoras filogenéticas, es decir, su distribución universal, la conservación estructural y funcional y el tamaño suficiente (Ludwig & Schleifer, 1994). Las secuencias de rRNA consisten en regiones conservadas y otras variables. Estas secuencias pueden ser una característica específica para una especie de microorganismo o grupo y se puede utilizar para su identificación. Los organismos pertenecientes a un grupo específico, pueden ser identificados en cultivos puros y en muestras complejas. Para un análisis cualitativo, la sensibilidad de la técnica puede mejorarse mediante la amplificación *in vitro* de ácido nucleicos específicos mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando primers de oligonucleótidos universales para reconocer el rRNA. Después de determinar la secuencia del organismo en cuestión, esta es analizada filogenéticamente al compararla con una base de datos y utilizada para el diseño de sondas específicas (Ludwig & Schleifer, 1994). Entre otras herramientas de biología molecular se encuentra la metagenómica, este proceso se basa en el uso de técnicas de biología molecular para analizar la diversidad de genomas microbianos (metagenomas) mediante el uso del gen 16S rRNA y la secuenciación masiva de ADN (Cortés-López et al., 2020).

Ecuador es uno de los principales países productores de cacao CCN-51 (Teneda, 2016; Vera Chang et al., 2015). Este cacao es de alto rendimiento, sin embargo, no posee características organolépticas de alta calidad para la producción de chocolates (Quingaísa & Riveros, 2007). Esto motivó una investigación en la cual se sustituyó el mucílago de este cacao. El reemplazo de mucílago con un 89% maracuyá y un 11% banana entregó buenos resultados (Carrión, 2018), no obstante, se desconoce la diversidad de microorganismos responsables de esta fermentación modificada. El objetivo de este trabajo fue identificar las BAL responsables de la fermentación espontánea del cacao CCN-51 con pulpa de maracuyá y banano como sustituto del mucílago.