

Emulsiones agua/agua gelificadas como posibles encapsulantes de antioxidantes naturales

Sanchez, María F.^{1,2}; Ingrassia, Romina N.^{2,3}; Risso, Patricia H.^{2,3}

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR); ²CONICET;

³Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades tecnofuncionales de geles ácidos de mezclas caseinato de sodio (NaCAS) y goma tara (GT), en ausencia y en presencia de extracto proteico de espirulina (EPE), como evaluación previa de la posible microencapsulación de EPE en microgeles de NaCAS. En el rango de concentraciones de NaCAS y GT evaluados se observó la formación de microgeles esféricos, pero no se obtuvieron en presencia de EPE hasta 3%.

Palabras clave: caseinato de sodio, goma tara, espirulina, ficocianina C, microgeles

Abstract

Gelled water/water emulsions as possible encapsulants of natural antioxidants.

This work aimed the techno-functional properties of acid gels of sodium caseinate (NaCAS) and tara gum (GT) mixtures, in the absence and the presence of spirulina protein extract (EPE), as a preliminary evaluation of the possible microencapsulation of EPE in NaCAS microgels. The formation of spherical microgels was observed in the range of NaCAS and GT concentrations evaluated, but they were not obtained in the presence of EPE up to 3%.

Keywords: sodium caseinate, tara gum, spirulina, phycocyanin, microgels

INTRODUCCIÓN

El interés de los consumidores por productos alimenticios que promuevan beneficios para la salud ha provocado un incremento en la formulación y comercialización de alimentos denominados “funcionales” y “nutracéuticos”. Por otra parte, el comercio de los bienes agroindustriales dentro del nuevo paradigma internacional involucra un intercambio de productos con mayor grado de elaboración y/o

valor. En particular, la extracción y purificación de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales, ha tenido un gran crecimiento debido al uso de estos fitoquímicos en la preparación de suplementos dietarios (nutracéuticos) y alimentos funcionales [1].

Las algas microscópicas han demostrado ser una fuente potencial para el enriquecimiento de alimentos debido a que presentan en su composición valiosas sustancias bioactivas [2]. La espirulina (ESP) posee un elevado contenido proteico (60-70% en base seca), con todos los aminoácidos esenciales y siendo la ficocianina C (FCC) la proteína mayoritaria [3]. La FCC se caracteriza por su color azul y capacidad antioxidante que contribuiría a prevenir el desarrollo de enfermedades originadas por estrés oxidativo [4]. Esta proteína es inestable frente a variaciones de pH, temperatura y luz, por lo tanto, se degradan en el extracto durante su almacenamiento o procesamiento industrial, observándose cambios de color y pérdida de su capacidad antioxidante [5,6].

Una forma de aumentar la estabilidad de la FCC es a través de su encapsulación en matrices biopoliméricas. La microencapsulación retarda las reacciones químicas con el medio que lo rodea promoviendo un aumento en la vida útil del producto, la liberación gradual del compuesto encapsulado e incluso facilita su manipulación [7]. Se han propuesto diversas técnicas de microencapsulación y diversos materiales de pared [8]. Esquena (2016) planteó la posibilidad del uso de emulsiones agua/agua (W/W) como plantillas para la formación de microgeles que pueden utilizarse para encapsular compuestos bioactivos hidrofílicos [9]. Las emulsiones W/W pueden formarse debido a la incompatibilidad termodinámica entre soluciones acuosas de ciertas combinaciones de polímeros hidrofílicos y pueden estabilizarse por la realización simultánea de procesos de separación de fases segregativa y gelación ácida, obteniendo dispersiones coloidales de microgeles [10]. El objetivo del trabajo fue evaluar las propiedades tecnofuncionales de geles ácidos de mezclas NaCAS/GT, en ausencia y en presencia de EPE, como evaluación preliminar de la posible microencapsulación de EPE en microgeles de NaCAS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó caseinato de sodio bovino (NaCAS), tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y glucono- δ -lactona (GDL) de Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Alemania), goma tara (GT) de G y G Suministros (Rosario, Argentina); CaCl₂, HCl y Rodamina B de

Ciccarelli SRL (San Lorenzo, Argentina) y espirulina (ESP) en polvo provista por la empresa Hydro Farming S. A. (Coronel Bogado, Argentina).

Extracción y caracterización del EPE

Se realizaron dispersiones al 10% de la ESP en solución acuosa de CaCl₂ 1,5% con agitación magnética durante 7,5 h y posterior centrifugación a 930xg durante 20 min y a 25°C. Se realizó la cuantificación de la FCC en el sobrenadante obtenido por espectroscopía en el rango visible, utilizando un espectrofotómetro Jasco V-550 (Tokyo, Japan). Se realizaron espectros de absorción utilizando diferentes diluciones del extracto.

La concentración de FCC en mg/mL (C_{FCC}) se calculó como:

$$C_{FCC} = A_{615} - 0,474 \times A_{652} / 5,34 \quad (1)$$

siendo Ab_{615} y Ab_{652} las absorbancias a 615 y 652 nm, respectivamente. Luego, se calculó la concentración de FCC en mg/g ESP seca.

Además, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia para evaluar el estado conformacional de la FCC, excitando a 609 nm, en un espectrofluorómetro Aminco Bowman Serie 2 (Massachusetts, USA). Se realizaron espectros de emisión utilizando diferentes diluciones del extracto.

Para evaluar la capacidad antioxidante del EPE se realizó el método de captura del radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiasolina-6-ácido sulfónico) (ABTS+), determinando la disminución de la absorbancia a 730 nm del radical en presencia del extracto [11]. La capacidad antioxidante se expresó como la equivalente a la concentración de Trolox (μ M), usado como estándar de referencia.

Preparación de las soluciones

Las concentraciones fueron expresadas como porcentaje P/P (g de compuesto/100 g de solvente). Las soluciones madre de NaCAS y GT se prepararon al 8% y al 1%, respectivamente, en agua destilada o en *buffer* Tris-HCl 10 mM, pH 7 (BT).

Compatibilidad termodinámica

La compatibilidad termodinámica de las mezclas de proteínas (NaCAS y EPE) y polisacárido (GT) se determinó mediante el método descrito por Spyropoulos y col. (2010) [12]. Los sistemas binarios y ternarios se prepararon utilizando una concentración constante de NaCAS en BT (3%), utilizando en un caso la misma concentración de GT

pero variando la concentración de EPE en un rango de 0,0-3,0 % y, en otro caso, usando la misma concentración de EPE y variando la de GT (0,0-0,3 %). Los sistemas se mezclaron en vórtex durante 10 s, luego se incubaron por 24 y 48 h a 37°C en baño termostático y luego se realizó una inspección visual.

Preparación de geles ácidos y evaluación de sus parámetros reológicos y texturales, capacidad de retención de agua (CRA) y microestructura

Los geles se prepararon a 37 °C por adición de GDL a las dispersiones en una relación de R de 0,5 siendo R el cociente entre la concentración (%) de GDL y la concentración (%) de NaCAS. Se realizaron medidas de la viscosidad de las dispersiones en un viscosímetro biko-visc premium de BYK Instruments (Berlín, Alemania). Para las mediciones, se colocaron muestras de 50 g en un vaso de precipitados y se utilizó una geometría con un radio de 1,5 cm y a una velocidad de 100 rpm. Se registraron los valores de viscosidad a lo largo del tiempo (t) hasta la gelificación de los sistemas, determinada por el aumento brusco de la viscosidad, obteniéndose el tiempo de formación del gel (t_{gel}).

La CRA se determinó como:

$$CRA (\%) = 100\% (\text{peso gel} - \text{peso suero}) / \text{peso gel} \quad (2)$$

Se colocaron 10 gramos de muestra en tubos de Khan, se adicionó GDL y se dejó en reposo durante 120 min en baño termostático a 37°C. Una vez gelificadas las muestras, se centrifugaron a 930xg y se descartó el suero expelido.

Para evaluar la textura de los geles se realizaron análisis de doble compresión en un texturómetro Perten TVT 6700 (Suecia) acoplado a un dinamómetro digital (celda de carga de 10 N) con una geometría cilíndrica de 2 cm de diámetro, a una velocidad constante de 1 mm/s y con penetración a una distancia de 25 mm. Las muestras (20 g) fueron colocadas en cilindros de 3 cm de diámetro de sección y 3 cm de altura.

La dispersión acuosa del NaCAS, con y sin GT (0,2%) se tiñó con solución de rodamina B (2 mg/L). Para iniciar la gelación ácida, se añadió GDL en relación R=0,5, se colocaron alícuotas de 200 μ L placas LAB-TEK II y se incubaron a 37°C. Una vez formados, los geles fueron observados en un microscopio confocal de barrido invertido NIKON Eclipse TE-2000-E (Nikon Instruments Inc., Japón), con objetivo 20 \times , zoom 4 \times , láser He-Ne con excitación a 543 nm y banda de emisión 605-675 nm. Las imágenes se almacenaron en formato TIFF. También se obtuvieron imágenes en presencia de EPE con y sin rodamina B y de suspensiones acuosas de EPE.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desvío estándar de al menos tres determinaciones independientes. El análisis estadístico fue realizado mediante análisis de la variancia (ANOVA). Se consideraron a las diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Caracterización del EPE extraído y evaluación de la compatibilidad termodinámica

La concentración de FCC fue (100 ± 10) $\mu\text{g FCC/g ESP}$. Los espectros de fluorescencia revelaron un pico de emisión máxima a 639 nm. La capacidad antioxidante fue equivalente a (49 ± 8) μM de Trolox.

En la Figura 1 se muestra el diagrama de fases binario (EPE o GT 0%) y ternario a una concentración constante de NaCAS (3%) observado a las 24 y 48 h, donde los símbolos representan una solución monofásica límpida (\circ) o un sistema bifásico (\bullet).

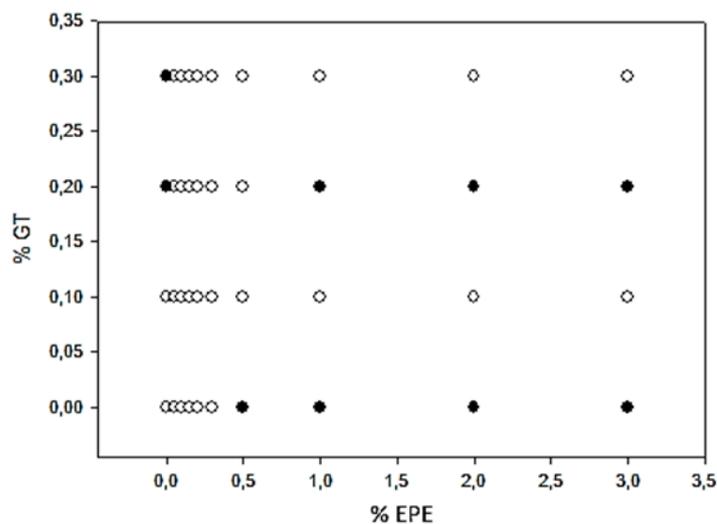


Figura 1. Diagrama de fases de mezclas binarias y ternarias de NaCAS (3%), GT (0-0,3%) y EPE (0-3%) en buffer BT, luego de 24 y 48 h a 37 °C.

En ausencia de EPE, se observa separación de fases a partir de 0,2% de GT, ya reportado por Hidalgo y col. [13]. A pH 7, el NaCAS y el EPE poseen carga neta negativa mientras que la GT no posee carga, por lo cual se trata de una separación de fases segregativa, en la que cada biopolímero se reparte en mayor proporción en una de las fases. En ausencia de GT, hay separación de fases segregativa entre NaCAS y el EPE a partir de una concentración de este último de 0,5%. En presencia de GT y EPE, sólo se

observó separación de fases para GT 0,2% y EPE \geq 1%. La presencia de GT modifica el rango de concentraciones de EPE en la cual el NaCAS 3% es co-soluble con éste.

Evaluación de parámetros reológicos y texturales, capacidad de retención de agua (CRA) y microestructura de los geles ácidos mixtos

A concentraciones de GT \geq 0,2% y/o de DPE \geq 0,3%, el t_{gel} fue significativamente mayor ($p < 0,001$) y la viscosidad final alcanzada menor ($p = 0,013$), asumiendo valores de 50 ± 3 min y de $0,5 \pm 0,2$ P, respectivamente. En comparación, los geles mixtos de otra composición presentaron t_{gel} de 39 ± 5 min y viscosidad final de $0,9 \pm 0,2$ P. Los geles, en general, son débiles, pero los geles con GT \geq 0,2% y/o DPE 3% presentaron menor dureza ($p < 0,001$), con rango de valores de 0,07-0,15 N, que el resto (0,32-0,53 N). Para la elasticidad, vinculada con la capacidad de recuperación de la muestra entre el final de la primera compresión y el inicio de la segunda, no se observaron diferencias significativas ($p = 0,929$), con valores de 0,78-1,11. La cohesividad representa el punto límite hasta el cual puede deformarse el material antes de romperse, vinculado a la fuerza con la que están unidas las partículas. Los geles sin GT tuvieron menor cohesividad (0,54-0,77) independientemente de la concentración de DPE ($p < 0,001$), mientras que en presencia de GT hubo una mayor interacción entre partículas (0,82-0,96). Además, los geles sin GT tuvieron mayor masticabilidad (28 ± 16 J) y gomosidad (270 ± 40 mN) ($p < 0,001$), en comparación con el resto de los geles con masticabilidad de 9 ± 4 J y gomosidad de 66 ± 9 mN. La primera es una medida de la energía y la segunda de la fuerza requeridas para desintegrar el gel hasta que se pueda tragar.

En la Figura 2 se muestran imágenes obtenidas de una suspensión de EPE 10% en agua destilada con (A) y sin (B) Rodamina B, marcador fluorescente que tiñe de rojo a las proteínas. Por otra parte, la FCC en los EPE tiene autofluorescencia.

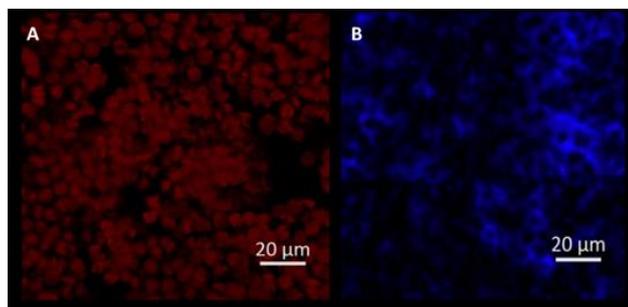


Figura 2. Imágenes digitales de microscopía confocal de EPE 10% en agua destilada, con (A) y sin (B) Rodamina B.

En la Figura 2A se observan todas las proteínas presentes en el extracto, mientras que en la 2B sólo se observa a la FCC. En la Figura 3 se muestran imágenes digitales de geles ácidos de algunas de las mezclas del diagrama de fases de la Figura 1. Las proteínas están teñidas de rojo, mientras que las zonas negras corresponden a la fase rica en GT.

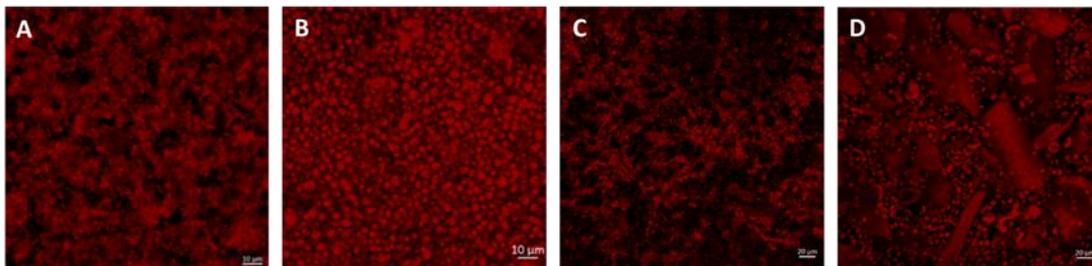


Figura 3. Imágenes digitales de microscopía confocal de geles de NaCAS 3% (A), de NaCAS 3% y GT 0,2% (B), de NaCAS 3%, GT 0,2% y EPE 0,3% y de NaCAS 3% y EPE 3%.

En la Figura 3A se observa la red proteica compacta de NaCAS, correspondiente con una procedencia de mezcla monofásica, lo que explica valores mayores de viscosidad ($1,2 \pm 0,2$ P), dureza ($0,53 \pm 0,02$ N), masticabilidad (30 ± 5 J) y gomosidad (295 ± 5 mN) y menores valores de cohesividad ($0,57 \pm 0,02$). En la Figura 3B se muestra la formación de microgeles esféricos de NaCAS (3%) en presencia de GT 0,2% con un diámetro medio de 2-4 μm . Esto se corresponde con su procedencia de un sistema bifásico y con la mayor cohesividad ($0,83 \pm 0,04$), debida a la interacción NaCAS-NaCAS durante la formación de las microesferas de gel, y menor viscosidad ($0,7 \pm 0,2$ P), dureza ($0,075 \pm 0,005$ N), masticabilidad ($6,7 \pm 0,6$ J) y gomosidad (67 ± 6 mN). Pero en presencia de EPE 0,3%, la microestructura cambia a una malla de gel con poros más grandes, gel formado a partir de un sistema monofásico y que presenta viscosidad de $0,6 \pm 0,2$ P. Además, hay diferencias significativas de la dureza ($p=0,011$), cohesividad ($p<0,001$), masticabilidad ($p=0,003$) y gomosidad ($p<0,001$) con respecto al gel de NaCAS, pero no con respecto a la muestra de NaCAS y GT. Los valores obtenidos fueron $0,088 \pm 0,001$ N, $0,82 \pm 0,04$, 7 ± 1 J y 72 ± 6 mN para dureza, cohesividad, masticabilidad y gomosidad, respectivamente. La Figura 3D corresponde a un gel ácido de NaCAS y EPE, ambos al 3%, en ausencia de GT, y que proviene de una mezcla bifásica como se observa en la Figura 1. Se pueden observar estructuras de diversos tamaños y formas, que se diferencian en la Figura 4 como restos de ESP (células rojas) y agregados de ficobiliproteínas en azul y magenta, pero no se observan microgeles de NaCAS a esta relación de concentraciones. Estos geles también presentaron valores de dureza, significativamente diferentes de los geles de NaCAS

($p=0,001$), con valores de $0,085\pm 0,001$ N, masticabilidad de $5,7\pm 0,6$ J y gomosidad de $58,8\pm 0,01$ mN, respectivamente. Sin embargo, la cohesividad resultó mayor ($p=0,021$) con valores de $0,70\pm 0,06$ pero menor que en presencia de GT ($p=0,038$). Esto indica interacciones entre las partículas proteicas, pero de menor magnitud que en presencia de GT.

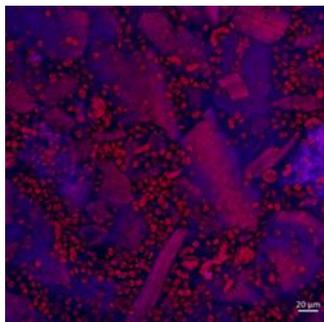


Figura 4. Imágenes digitales de microscopía confocal de gel de NaCAS 3% y EPE 3%.

En conclusión, la microestructura y características de los geles variaron según la compatibilidad termodinámica de los biopolímeros. En el rango de concentraciones de NaCAS y GT evaluados se observó la formación de microgeles esféricos, pero no se obtuvieron en presencia de EPE hasta 3%. La presencia de células de ESP en los geles indica que es necesario optimizar el método de extracción de los EPE para obtener un mayor grado de pureza en FCC.

CITAS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] K. Kaur, Functional nutraceuticals: Past, present, and future. A. Grumezescu (Ed.), *Nutraceuticals. Nanotechnology in the Agri-Food industry*, Vol. 4, Academic Press, London, UK, 2016.
- [2] M. Koller, A. Muhr & G. Braunegg, *Algal Res.* **6**, 52 (2014).
- [3] Y. Benchikh, A. Filali & S. Rebai, *J. Food Process. Preserv.* **45**, e15170 (2021).
- [4] V. Pandey, A. Pandey & V. Sharma, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2**, 89 (2013).
- [5] F. S. Antelo, J. A. V. Costa & S. J. Kalil, *Biochem. Eng. J.* **41**, 43 (2008).
- [6] M. Campos Assumpção de Amarante, A. R. Cavalcante Braga, L. Sala & S. Juliano Kalil, *Food Res. Int.* **137**, 109602 (2020).
- [7] J. S. Ribeiro & C. M. Veloso, *Food Hydrocolloid.* **112**, 106374 (2021).
- [8] S. Singh, V. Aeri & V. Sharma, *J. Food Process Eng.*, e14311 (2023).
- [9] J. Esquena, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **25**, 109 (2016).
- [10] M. Stieger & F. van de Velde, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **18**, 334 (2013).
- [11] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang & C. Rice-Evans, *Free Radical Bio. Med.* **26**, 1231 (1999).
- [12] F. Spyropoulos, A. Portschi & I. T. Norton, *Food Hydrocolloid.* **24**, 217 (2010).
- [13] M. E. Hidalgo, R. Ingrassia, N. S. Nielsen, M. C. Porfiri, D. Tapia-Maruri & P. H. Risso, *Int. J. Dairy Technol.* **73**, 521 (2020).