

Ciclo de Seminarios «*Dr. Alberto Cassano*» 2019

“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

I N T E C



Grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología

Investigadores

- Dr. Mammarella, Enrique
- Dr. Manzo, Ricardo
- Dra. Meza, Bárbara
- Dr. Niizawa, Ignacio
- Dra. Olivares, María Laura
- Dr. Peralta, Juan Manuel
- Dr. Sihufe, Guillermo
- Dra. Zorrilla, Susana

Becarias Doctorales

- Lic. Eberhardt, Agustina
- Lic. Espinaco, Brenda
- Lic. López, Emilse
- Ing. Orona, Jesica

Personal de Apoyo

- Tec. De Piante Vicin, Daniel
- Ing. Marino, Fernanda

Pasantes de grado

- Ceballos, Lara
- Ceccato, Fiorella
- Suppo, Candela

“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

I N T E C



Encapsulación de astaxantina en partículas de alginato de sodio

Alimento (CAA): toda sustancia o mezcla de sustancias naturales o elaboradas que ingeridas por el hombre aporten a su organismo los materiales y la energía necesarios para el desarrollo de sus procesos biológicos.



Compuestos bioactivos

Alimentos funcionales

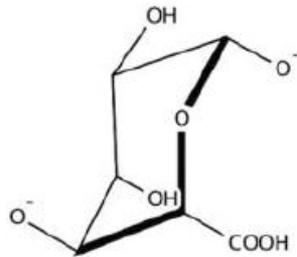


“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

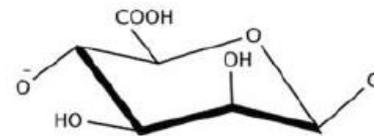
I N T E C



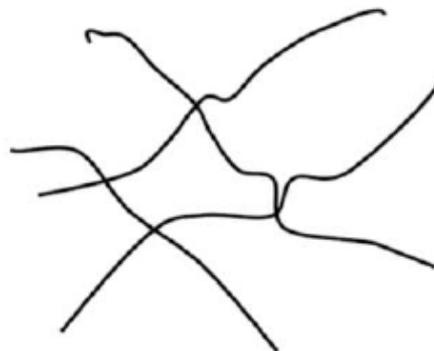
Encapsulación de astaxantina en partículas de alginato de sodio



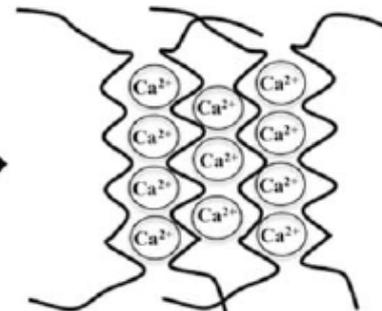
Ácido L-gulurónico (G)



Ácido D-manurónico (M)



Alginato de sodio
sin gelificar



Gel de Alginato de calcio
Estructura “egg box”

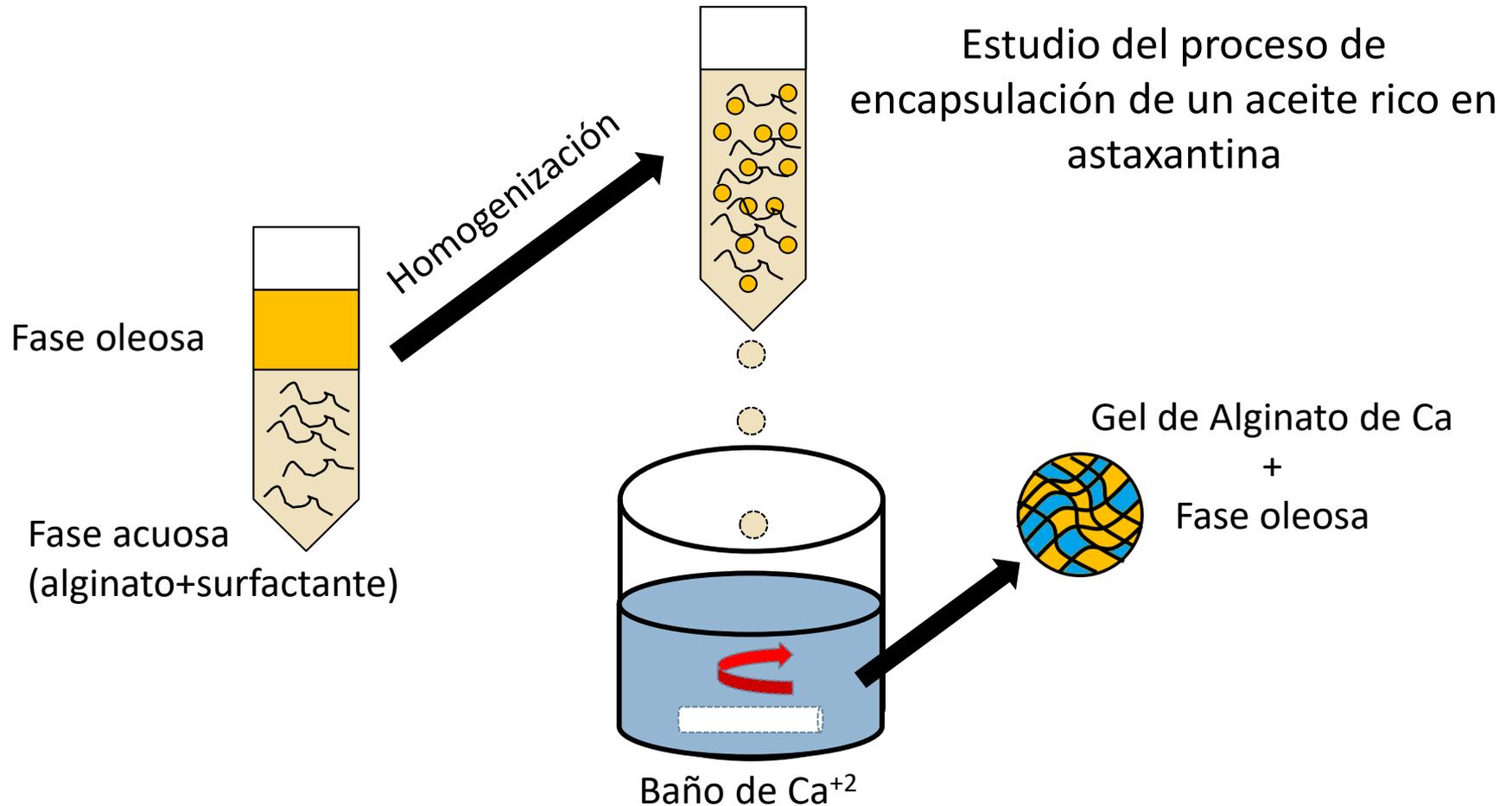
Ching SH, Bansal N, Bhandari B (2017) Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57:6, 1133-1152.

“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

I N T E C



Encapsulación de astaxantina en partículas de alginato de sodio



“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

I N T E C



Encapsulación de astaxantina en partículas de alginato de sodio

Variables Independientes estudiadas a través de un Diseño Central Compuesto

Variable independiente	Símbolo	Unidad	Niveles codificados				
			-1.495	-1	0	+1	+1.495
Concentración CaCl ₂	X ₁	mM	26	100	250	400	474
Concentración oleorresina	X ₂	μg astaxantina mL ⁻¹	30.1	40	60	80	89.9
Relación alginato/oleorresina	X ₃	v/v	1.49	2	3	4	4.49
Concentración de alginato	X ₄	% p/p	1.25	1.5	2	2.5	2.75
Concentración surfactante	X ₅	% p/p	0.50	1	2	3	3.49

Respuestas estudiadas a través de un Diseño Central Compuesto

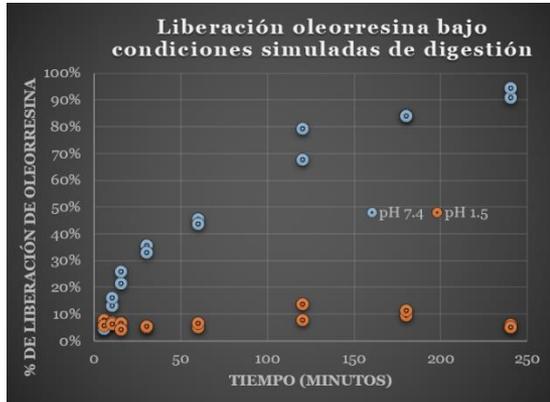
Respuesta	Símbolo	Unidad
Tamaño de partícula	Y ₁	mm
T _{1/2} de liberación	Y ₂	min
Eficiencia de encapsulación	Y ₃	%

31 ENSAYOS

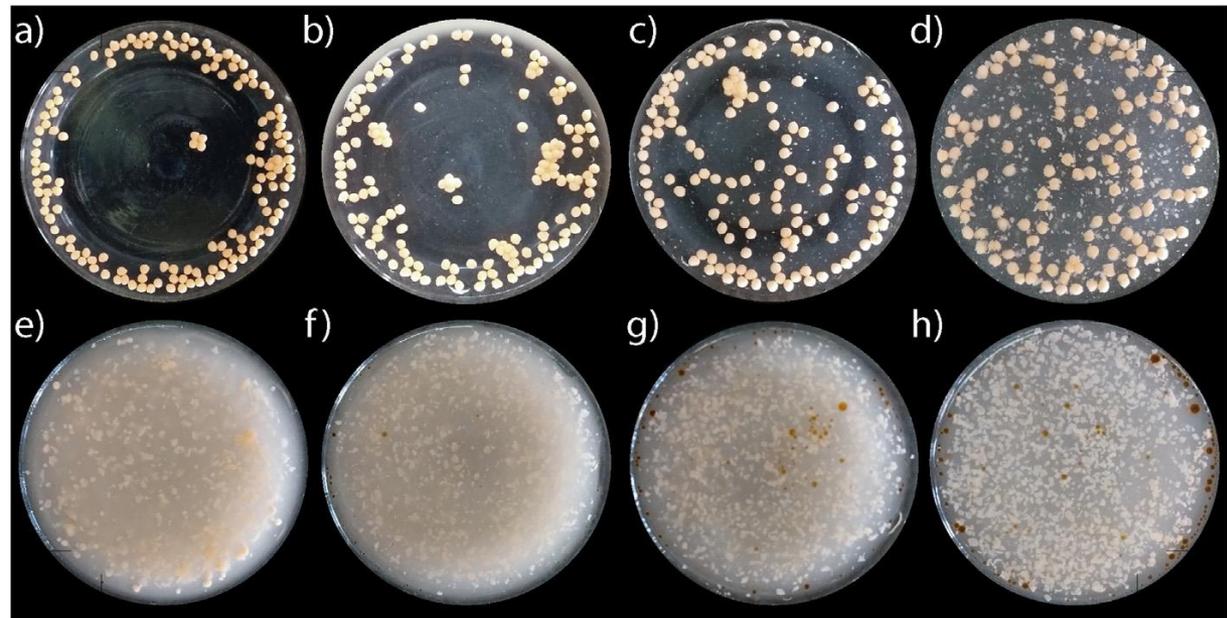


“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

Encapsulación de astaxantina en partículas de alginato de sodio



Proceso de liberación de oleorresina bajo condiciones simuladas de digestión



Astaxanthin oleoresin release process from erodible alginate microcapsules at different time periods: (a) 5, (b) 10, (c) 15, (d) 30, (e) 60, (f) 120, (g) 180 and (h) 240 min.

Korsmeyer-Peppas Model

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n$$

First – Order Model

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-kt)$$

Hopfenberg Model

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(1 - \frac{kt}{C_0 d}\right)^n$$

“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

Encapsulación de astaxantina en partículas de alginato de sodio

Response	Model						Lack of fit	
	F - Value	Prob > F	R ²	Adj. R ²	Adeq. prec.	C.V. (%)	F - Value	Prob > F
Y ₁	10.63	<0.0001	0.73	0.66	12.22	4.92	1.69	0.3276
Y ₂	6.33	0.0002	0.76	0.64	8.716	14.93	2.27	0.9620
Y ₃	9.55	<0.0001	0.78	0.70	10.45	3.02	2.71	0.1727

Resumen estadístico de los modelos de superficie de respuesta para Y₁, Y₂ y Y₃.

- a) X₂ - Oleoresin concentration (µg/mL): 60
 X₃ - Alginate to oleoresin ratio (v/v): 3
 X₅ - Surfactant concentration (%): 2

- b) X₁ - CaCl₂ concentration (mM): 250
 X₂ - Oleoresin concentration (µg/mL): 60
 X₅ - Surfactant concentration (%): 2

$$Y_m = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

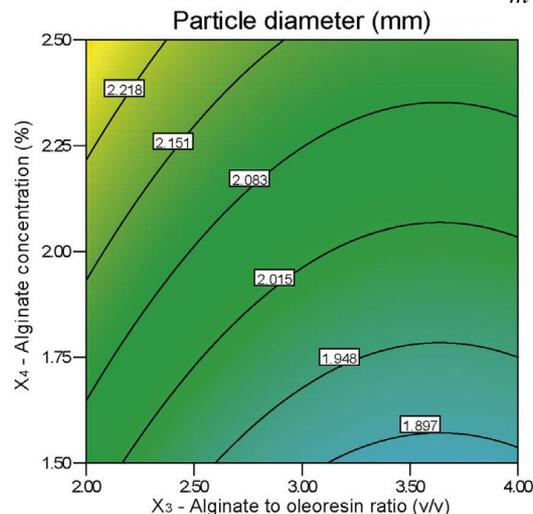
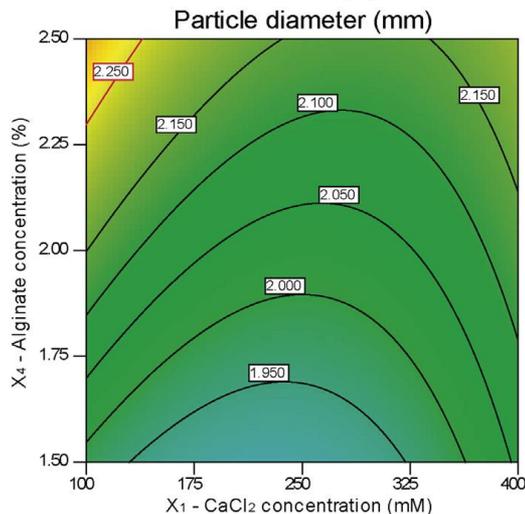


Fig. Contour plot showing the combined effect of: (a) CaCl₂ concentration (X₁) and alginate concentration (X₄); (b) alginate to oleoresin ratio (X₃) and alginate concentration (X₄), on the particle size (Y₁).

“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

I N T E C



Encapsulación de astaxantina en partículas de alginato de sodio

	Y_1 – Tamaño de partícula (mm)			Y_2 - $t_{1/2}$ liberación (min)			Y_3 – Eficiencia de encapsulación (%)		
	Modelo	Exp.	Error	Modelo	Exp.	Error	Modelo	Exp.	Error
Formulación 1	1.89	1.88±0.10	0.2%	51.2	56.4±4.4	10.0%	73.5	75.9±1.6	3.2%
Formulación 2	2.05	2.06±0.11	0.1%	84.5	74.4±1.4	12.0%	75.6	70.6±0.7	6.6%
Formulación 3	2.25	2.20±0.12	2.3%	51.2	56.1±2.0	9.5%	75.4	77.2±2.2	2.4%

Caracterización experimental de las formulaciones obtenidas frente a los valores predichos a partir de los modelos matemáticos.

International Journal of Biological Macromolecules 121 (2019) 601–608



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



Natural astaxanthin encapsulation: Use of response surface methodology for the design of alginate beads



Ignacio Niizawa *, Brenda Y. Espinaco, Susana E. Zorrilla, Guillermo A. Sihufe

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC) – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Güemes 3450 (S3000GLN), Santa Fe, Argentina

Encapsulación de astaxantina en partículas de alginato de sodio

Resultados y conclusiones

- A partir de los ensayos realizados se logró ajustar una serie de ecuaciones capaces predecir la influencia de 5 de las principales variables del proceso estudiado sobre la generación de partículas de alginato de sodio para la encapsulación astaxantina.
- El sistema de ecuaciones obtenido puede ser utilizado para el diseño de nuevas partículas de alginato de sodio de características deseadas de acuerdo a la aplicación buscada.
- Es necesario continuar con el análisis de los aceites encapsulados.
- Se debe continuar con el estudio de los mecanismos de liberación de la oleorresina encapsulada.

“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

I N T E C



Diseño de agregados de proteínas de lactosuero para la obtención de emulsiones estables de aceites

Emulsiones estabilizadas por partículas de microgeles

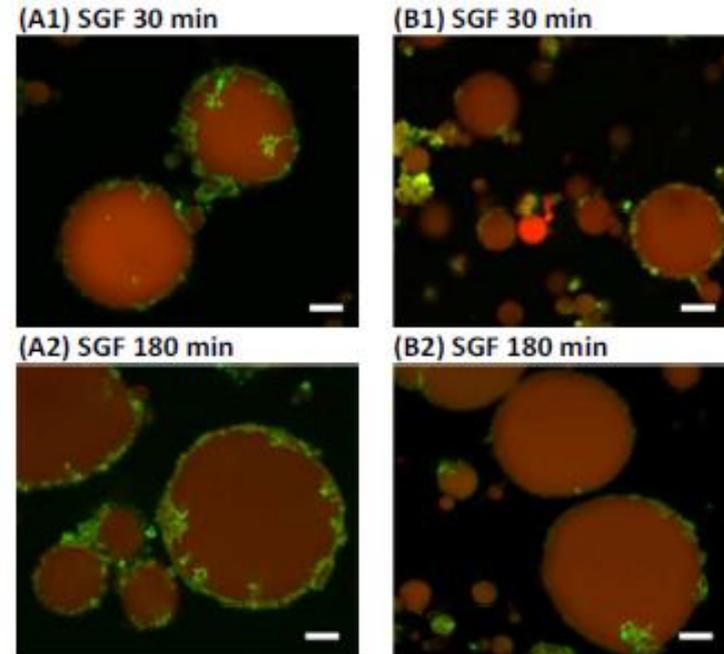


Figure 8. Microstructure of (A) WPM and (B) HT WPM-stabilized emulsions as a function of digestion time. Green colour represents protein (stained by Fast green) red colour represents the oil phase (stained by Nile Red), and black colour represents air or water. Scale bar represents 50 μm .

Sarkar A., Murray B., Holmes M., Ettelaie R., Abdalla A., Yang X. (2016) In vitro digestion of Pickering emulsions stabilized by soft whey protein microgel particles: influence of thermal treatment. *Soft Matter*. 12(15): 3558-69.

“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

I N T E C



Diseño de agregados de proteínas de lactosuero para la obtención de emulsiones estables de aceites

El **lactosuero** es un líquido amarillento que se obtiene durante la fabricación del queso en la etapa de coagulación.

Las proteínas del lactosuero constituyen el 20% de las proteínas de la leche, e incluyen principalmente a la β -lactoglobulina (50-55%), la α -lactoalbúmina (25-30%), la albúmina sérica bovina (5-10%) e inmunoglobulinas (10-15%).



Obtención del lactosuero a partir de la producción de quesos

“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

I N T E C



Diseño de agregados de proteínas de lactosuero para la obtención de emulsiones estables de aceites

Mecanismo de agregación de las proteínas de lactosuero

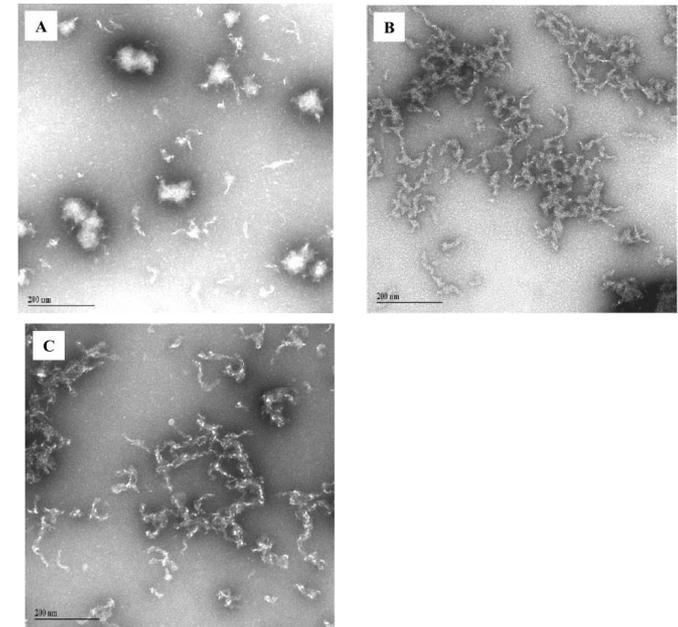
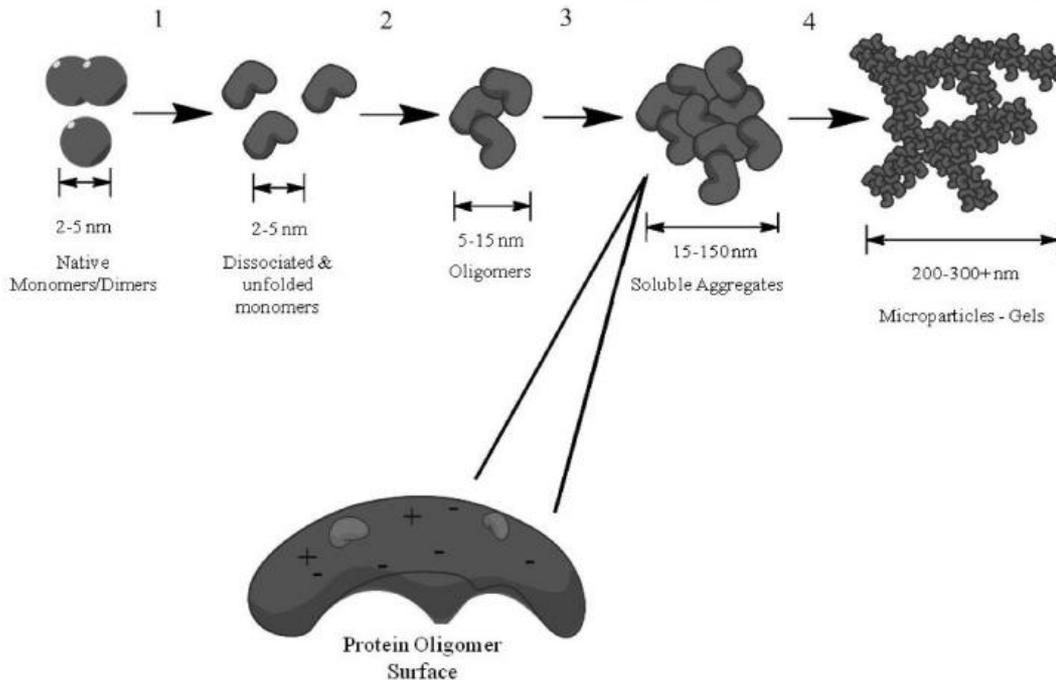


Figure: Negative - staining transmission electron micrographs of WPI dispersions at 1 wt % after heat treatment at 85 °C for 15 min at pH ranging from 6.0 to 7.0 in the presence of NaCl: pH 6.0 - 5 mM(A), pH 6.6 - 70 mM (B), pH 7.0 - 120 mM (C). Scale bars represent 200 nm. (Schmitt et al. 2007)

Figure: Model of β -lactoglobulin (β -lg) denaturation and aggregation at pH>5.7. (Ryan et al. 2013)

Ryan K.N., Zhong Q., Foegeding E.A. (2013) Use of whey protein soluble aggregates for thermal stability-a hypothesis paper. Journal of Food Science. 78(8): 1105-1115.

Schmitt, C.; Bovay, C.; Rouvet, M.; Shojaei-Rami, S.; Kolodziejczyk, E. Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: Physicochemical, interfacial, and foaming properties. Lang. ACS J. Surf. Coll. 2007, 23, 4155-4166.

“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

I N T E C



Diseño de agregados de proteínas de lactosuero para la obtención de emulsiones estables de aceites

Variables Independientes estudiadas a través de un Diseño Central Compuesto

Variable independiente	Símbolo	Unidad	Niveles codificados				
			-1.682	-1	0	+1	+1.682
Temperatura tratamiento	X ₁	°C	67.9	71.0	75.5	80.0	83.1
Concentración proteínas	X ₂	%	3.49	4.00	4.75	5.50	6.01
pH	X ₃	-	6.49	6.75	7.13	7.50	7.76

Respuestas estudiadas a través de un Diseño Central Compuesto

Respuesta	Símbolo	Unidad
Tamaño de agregados	Y ₁	µm
T _{1/2} de desnaturalización	Y ₂	min
Cte. de veloc. de exposición grupos SH	Y ₃	min ⁻¹

19 ENSAYOS



“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

Diseño de agregados de proteínas de lactosuero para la obtención de emulsiones estables de aceites

$$Y_m = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

Respuesta	Modelo						Falta de Ajuste	
	Coef. F	Prob. > F	R ²	R ² Ajust.	Prec. Adec.	C.V. (%)	Coef. F	Prob. > F
Y ₁	77.69	<0.0001	0,97	0.96	29.771	8.45	0.31	0.9320
Y ₂	186.26	<0.0001	0.99	0.98	48.581	6.64	2.09	0.2494
Y ₃	68.24	<0.0001	0.94	0.92	27.460	19.09	0.58	0.7788

Resumen estadístico de los modelos de superficie de respuesta para Y₁, Y₂ y Y₃.

Agregado	T	CP	pH	Y1			Y2			Y3		
				Modelo	Exp.	Error	Modelo	Exp.	Error	Modelo	Exp.	Error
1	71.0	4.0	7.08	352.0	362.6	3.0%	15.3	13.7	10.5%	0.045	0.044	2.3%
2	80.0	4.3	7.50	352.2	364.6	3.5%	2.1	2.3	9.5%	0.290	0.298	2.8%
3	75.7	5.5	6.75	692.8	773.0	11.6%	5.9	6.4	8.5%	0.085	0.075	11.8%

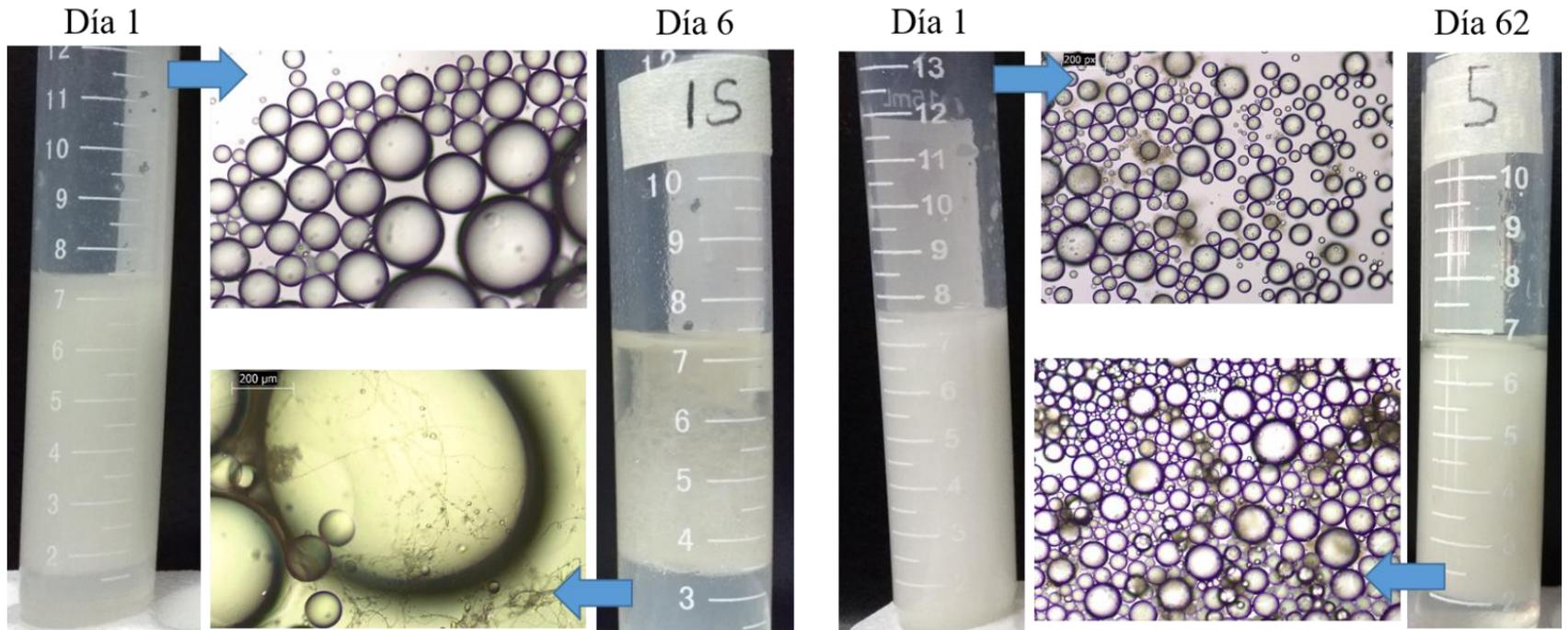
Condiciones de tratamiento para la obtención de 3 AGPL nuevos de acuerdo a los modelos matemáticos obtenidos: temperatura en grados centígrados (T); porcentaje de concentración de proteínas (CP) y pH. Se muestran también los resultados de la caracterización experimental de los AGPL obtenidos frente a los valores predichos a partir de los modelos matemáticos.

“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

I N T E C



Diseño de agregados de proteínas de lactosuero para la obtención de emulsiones estables de aceites



“Estudio de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos naturales para la formulación de alimentos funcionales”

I N T E C



Diseño de agregados de proteínas de lactosuero para la obtención de emulsiones estables de aceites

Resultados y conclusiones

- Los modelos ajustados lograron predecir correctamente las características de los agregados proteicos diseñados.
- Se lograron obtener emulsiones estabilizadas por los agregados de proteínas de lactosuero diseñados.
- Desarrollar un mayor número de emulsiones y profundizar el estudio de la influencia de las características de los agregados proteicos sobre sus propiedades.
- Profundizar la caracterización de los agregados proteicos y de las emulsiones obtenidas con diferentes técnicas: microscopias, DSC, potencial zeta, etc.
- Evaluar la estabilidad de los aceites encapsulados en el tiempo.
- Llevar adelante estudios de liberación de los aceites encapsulados bajo condiciones gastrointestinales.