

## **ESTABILIZACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES POR ENCAPSULACIÓN Y SU INCORPORACIÓN A DERIVADOS LÁCTEOS CON VALOR AGREGADO**

**Acciarri Giuliana<sup>A</sup>**

<sup>A</sup> *Área Físicoquímica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR  
Becaria BIT de Fundación Banco Santa Fe*

**Área:** Ingeniería  
**Sub-Área:** Alimentos  
**Grupo:** Y

**Palabras clave:** extracción acuosa, antocianinas, yogurt

### **INTRODUCCIÓN**

El interés de los consumidores por productos alimentarios que promuevan beneficios para la salud ha provocado un incremento en la formulación y comercialización de alimentos “funcionales”. En particular, se ha detectado la incorporación a las fórmulas de fitoquímicos, que tienen la propiedad de reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer y diabetes. Dicho efecto protector estaría asociado a la capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos que previenen los procesos oxidativos involucrados en dichas patologías (Scalbert et al., 2005; Yao et al., 2004).

Los arándanos contienen antocianinas (AC), responsables de su capacidad antioxidante. Las AC, usadas como colorantes alimentarios, impactan sobre las características sensoriales de los alimentos y tienen importancia en la salud (De Pascual et al., 2008). La extracción de las AC se puede realizar a partir del fruto fresco. Para que el método extractivo sea eficiente se debe maximizar la recuperación de las AC minimizando la degradación del estado natural del principio activo. En general, se utilizan métodos extractivos que emplean solventes orgánicos que pueden ser tóxicos para la salud (Chandrasekhar et al., 2012). Por lo tanto, es de interés eliminarlos del proceso extractivo y reemplazarlos por alguna sustancia inocua que permita mantener la concentración de las AC ([AC]) y su elevado poder antioxidante (PA). Además, los productos que contienen AC son susceptibles al deterioro debido a la inestabilidad química de las mismas (Aurelio et al., 2008). La encapsulación en matrices poliméricas mejora su estabilidad, ya que retarda las reacciones químicas de las AC con el medio, promoviendo un aumento en la vida útil del producto, la liberación gradual del compuesto encapsulado y facilitando su manipulación (Fang et al., 2010).

Por otra parte, la producción de alimentos con valor agregado, en especial los lácteos y sus derivados, es de suma importancia en la Región Centro de nuestro país, cuenca lechera por excelencia.

Se optimizó la extracción de AC de arándanos usando soluciones acuosas y se analizaron las propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y de estabilidad de las mismas. Se desarrolló un método de encapsulación de las AC empleando un polisacárido natural de calidad alimentaria para mejorar la estabilidad de las AC estudiadas. Se estudió la estabilidad de las AC encapsuladas y se evaluó su estabilidad en el tiempo y su liberación controlada. Se desarrolló un yogurt natural al cual se le adicionaron los productos encapsulados seleccionados, previa liofilización y molienda de los mismos.

Proyecto: “Estabilización de antioxidantes naturales por encapsulación y su incorporación a derivados lácteos con valor agregado”.

Director del proyecto: Dra. María Eugenia Hidalgo

Director del becario/tesista: Dra. María Eugenia Hidalgo

## METODOLOGÍA

### Extracción acuosa de las AC de arándanos

Se evaluaron distintos medios acuosos para la extracción de AC: HCl 0,025M; 0,05M y 0,1M y ácido cítrico (Cit) 0,025M; 0,05M; 0,1M y 0,25M, en ausencia y presencia de calor. Los arándanos frescos se homogeneizaron a velocidad constante durante 2 min. en cada medio evaluado (20g arándanos/100mL) a temperatura ambiente. Para los sistemas ensayados en presencia de calor, los homogenizados fueron calentados durante 10 min. en baño María. Los extractos de arándanos (EA) obtenidos se filtraron para eliminar restos de semillas y cáscara y se conservaron a 4°C y al resguardo de la luz.

### Caracterización fisicoquímica y biológica de las AC extraídas

La [AC] en los EA se determinó por espectroscopia UV-visible, empleando el método del pH diferencial (Cedillo López et al., 2006). El PA de los EA se determinó empleando el método de captura del radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiasolina-6-ácido sulfónico) o ABTS (Re et al., 1999), a través de la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico o TBARS (Ohkawa et al., 1979), y por el método del poder quelante del Fe<sup>+2</sup>. Se evaluó la estabilidad de las AC por 7 días.

### Encapsulación de las AC en perlas de alginato de calcio

Se disolvió alginato de sodio 2 o 3 % P/V (según corresponda) en los EA obtenidos con HCl 0,1M y con Cit 0,25M, en ausencia de calor, bajo agitación magnética y luego se "goteó" dicha solución sobre una solución de CaCl<sub>2</sub> 500 mM o 1M (según corresponda), obteniéndose cápsulas en forma de perlas. Se midió la [AC] libre en la solución de CaCl<sub>2</sub> remanente para determinar el rendimiento de la encapsulación. Las perlas obtenidas se congelaron a -20°C y se liofilizaron.

### Estudio del PA de las AC encapsuladas y su liberación controlada

Las perlas liofilizadas se molieron hasta un polvo fino y se disolvieron 120mg de las mismas en diferentes medios acuosos: mezcla metanol:agua en proporciones 1:1, 2:1 y 3:1 y buffer acético-acetato 500mM pH 4,5, con el objetivo de liberar las AC encapsuladas y así poder cuantificar su PA. El PA de las AC liberadas se evaluó por el método del ABTS.

### Elaboración de yogurt natural e incorporación de los productos encapsulados

Para la elaboración del yogurt, 1L de leche entera previamente calentada a 45 ± 5°C fue enriquecida en sólidos por la adición de 3% de leche en polvo, adicionando 1% de goma guar (espesante) y 10% de sacarosa. La mezcla se enfrió a 37°C y se adicionó el cultivo iniciador, formado por una combinación de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii spp. Bulgaricus* (fermento YF-L811). Se realizó la incubación a 43°C durante 8 h en una yogurtera. Las perlas molidas se adicionaron (1g/50mL) con agitación manual y se realizó un seguimiento del pH de los yogures durante 7 días.

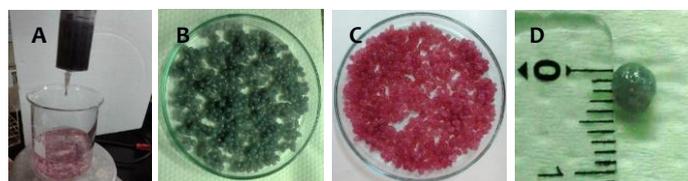
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Optimización del proceso de extracción acuosa de las AC y determinación del PA en los EA obtenidos. Evaluación de su estabilidad en el tiempo

La [AC] presente en los EA obtenidos con HCl aumentó al incrementarse la concentración del ácido y cuando se empleó HCl 0,1M la misma fue cercana (99 mg/L) a la obtenida en el EA control (106,87 mg/L). La [AC] en los EA obtenidos con Cit fue menor que con HCl, pero mejoró al incrementar la concentración del ácido y al calentar las muestras. Cuando se trabajó con Cit 0,25M, la [AC] alcanzada fue de 72,45 mg/L. No se observaron diferencias significativas en los valores de [AC] obtenidos para estos EA en presencia de calor. Respecto a los EA obtenidos con HCl en presencia de calor, la [AC] obtenida fue significativamente inferior a la observada en ausencia del mismo. El PA determinado por el método del ABTS, en los EA con HCl disminuyó en el tiempo, mostrando un valor mínimo el día 4. Al día 7, el PA volvió a subir alcanzando el valor inicial. A pesar de que la [AC] en los EA con Cit 0,025M y 0,05M fue baja, el PA de dichos EA a tiempo cero fue similar a la obtenida en los EA con Cit 0,1M. Dicha bioactividad aumentó con el tiempo y presentó un mínimo al día 7. Por lo tanto, sería factible reemplazar el uso de etanol en la extracción de AC empleando HCl 0,1M y/o Cit 0,25M, sin afectar significativamente el PA de dichos compuestos. El método TBARS no arrojó buenos resultados indicando que no sería válido, mientras que el método del poder quelante del Fe<sup>2+</sup> mostró resultados similares a los obtenidos por el método del ABTS. Por ello, se decidió trabajar de aquí en más sólo con este último.

### Encapsulación de los EA seleccionados con alginato de sodio

Los EA seleccionados para su encapsulación fueron los obtenidos con HCl 0,1M y Cit 0,25M en ausencia de calor. En el caso de los EA con HCl 0,1M se empleó 3% de alginato y 500mM de CaCl<sub>2</sub>, mientras que para los EA obtenidos con Cit 0,25M se usó 2% de alginato y 1M de CaCl<sub>2</sub>. La Figura 1 muestra imágenes de las perlas obtenidas.



**Figura 1:** (A) imagen del proceso de goteo de la solución de alginato de sodio + EA sobre el CaCl<sub>2</sub>; (B) estructura final de las perlas obtenidas con el EA de HCl 0,1M; (C) estructura final de las perlas obtenidas con el EA de Cit 0,25M; (D) tamaño promedio de las perlas (~4mm)

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos respecto al rendimiento de la encapsulación.

	Rendimiento de la encapsulación (%)
Perlas con EA de HCl 0,1M, alginato 3%P/V y CaCl <sub>2</sub> 500mM ( <b>perlas A</b> )	86,43
Perlas con EA de Cit 0,25M, alginato 2%P/V y CaCl <sub>2</sub> 1M ( <b>perlas B</b> )	90,90

**Tabla 1:** Resultados de la encapsulación de los EA seleccionados

En ambos casos, se logró encapsular más del 85% de las AC presentes en los EA, indicando que se podría emplear el alginato de sodio como matriz polimérica y el CaCl<sub>2</sub> como agente gelificante para encapsular las AC y mejorar su estabilidad.

### Estudio del PA de las AC encapsuladas y su liberación controlada

Las perlas A liofilizadas disueltas en la mezcla metanol:agua proporción 1:1 y 2:1 no liberaron las AC encapsuladas. Para la proporción de metanol:agua 3:1, la liberación controlada de las AC aumentó pero no fue total. El PA de estas AC liberadas fue de  $1,75 \pm 0,05$  nmoles de Trolox consumidos. Por otra parte, las perlas B liofilizadas liberaron totalmente las AC encapsuladas en todos los medios acuosos ensayados. El PA de las AC liberadas fue  $0,95 \pm 0,25$  nmoles de Trolox consumidos, indicando que siguen siendo bioactivas. En este punto se decidió trabajar específicamente con las perlas B liofilizadas ya que mantuvieron el PA de las AC luego de su encapsulación y liofilización y además el Cit está aceptado por el Código Alimentario Argentino. Simulando las condiciones de acidez de un yogurt, cuando las perlas B se disolvieron en buffer acético-acetato 500mM pH 4,5, las AC se liberaron parcialmente y mantuvieron su PA ( $0,83 \pm 0,06$  nmoles de Trolox consumidos).

### Elaboración del yogurt natural e incorporación de las perlas B

Se logró desarrollar un yogurt natural a escala de laboratorio al que se le incorporaron las perlas B previa liofilización y molienda de las mismas. Los yogures mantuvieron su pH óptimo (4,90-5,16) durante 7 días sin cambios significativos en sus características. Las perlas B liofilizadas y molidas se incorporaron efectivamente por agitación manual y se disolvieron en el yogurt sin observarse sedimentación del polvo adicionado. La Figura 2 muestra las perlas B liofilizadas enteras y molidas e imágenes del yogurt obtenido sin y con las perlas B molidas disueltas.



**Figura 2:** (A) Perlas B liofilizadas enteras, (B) perlas B liofilizadas molidas, (C) yogurt natural sin perlas y (D) yogurt natural con perlas B liofilizadas y molidas

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Aurelio, D., et al.**, 2008. Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion. *Int. J. Food Sci. & Tech.*, 43, 322-325.
- Cedillo López, D., et al.**, 2006. Cuantificación y estabilidad de los pigmentos presentes en 2 variedades del fruto del capulín (*Prunus Serotina Ehrenb. subs. capuli* (Cav.) McVaught). in IV Int. Congress XV National Congress of Biochem. Eng. México.
- Chandrasekhar, J., et al.**, 2012. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 615-623.
- De Pascual T., et al.**, 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochem. Review*, 7, 281-299.
- Fang, Z., et al.**, 2010. Encapsulation of polyphenols-a review. *Trends in Food Sci. & Tech.*, 21, 510-523.
- Ohkawa, H., et al.**, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochem.*, 95, 351-358.
- Re, R., et al.**, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. BiolMed.*, 26, 1231-1237.
- Scalbert, A., et al.**, 2005. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Sci. and Nut.*, 45, 287-306.
- Yao, L.H., et al.**, 2004. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nut.*, 59, 113-122.