

NANOTECNOLOGÍA APLICADA AL DESARROLLO DE UN INGREDIENTE PARA UN ALIMENTO FUNCIONAL

Stechina, María Florencia

*Área de Biocoloides y Nanotecnología – ITA – FIQ - UNL
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Química
Director/a: MSc. Liliana Santiago
Codirector/a: Dr. Osvaldo Sponton*

Área: Ingeniería

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales se definen como aquellos alimentos naturales o formulados que contienen compuestos biológicamente activos (vitaminas, minerales, ácidos grasos esenciales, etc.), que proporcionan un beneficio a la salud clínicamente comprobado (Bhaskarachary y col., 2016). Varios de estos bioactivos son sensibles a la degradación frente a factores de deterioro. Para superar este problema se ha planteado el desarrollo de estructuras tanto micro como nanométricas a fin de protegerlos (McClements y Li, 2010).

Una de las estrategias nanotecnológicas desarrolladas consiste en la formación de complejos moleculares, en la cual se produce el ensamblaje de los diferentes componentes de la estructura, inducido por las condiciones del sistema (McClements y Li, 2010). Cabe mencionar que la nanotecnología se define como la comprensión y el control de la materia a escala nanométrica, en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nm (Tamjidi y col., 2013).

Si bien se han desarrollado y caracterizado sistemas para la protección de bioactivos por medio de formación de complejos moleculares, no se han encontrado estudios donde se formulen alimentos que contemplen la incorporación de un ingrediente desarrollado a partir de dicha estrategia nanotecnológica. Por lo tanto, mediante el presente trabajo se busca avanzar en el conocimiento en relación a la aplicación de esta nanotecnología en alimentos. Para ello, se han elegido materias primas comercialmente accesibles como la clara de huevo líquida (proteína), altamente disponible en nuestra región, la pectina de alto metoxilo (polisacárido) y el ácido linoleico (bioactivo) tomado como ácido graso poliinsaturado modelo. En relación a esto, cabe mencionar que la proteína de la clara de huevo presenta la capacidad de unir ácido linoleico por medio de interacciones hidrofóbicas, y a su vez la pectina de alto metoxilo se une a la proteína por medio de interacciones electrostáticas (Sponton y col., 2017a, b).

OBJETIVOS

Reunir conocimientos para el desarrollo de un ingrediente alimenticio a partir de nanopartículas biopoliméricas que permitan la incorporación de ácido linoleico en un producto alimenticio.

METODOLOGÍA

Obtención y caracterización de nanopartículas de proteína de clara de huevo (PCHn)

Las PCHn se obtuvieron a partir de tratamiento térmico de una solución de proteína de clara de huevo (PCH) al 5%, pH 11,4. Esta solución se colocó en un recipiente de vidrio de 1 L y se calentó por circulación de agua mediante un termo-circulador. Una vez que la temperatura llegó a los 85°C se mantuvo por 5 min. Luego se realizó el enfriamiento por circulación de agua (baño de hielo). Se determinó el tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano ZS90,

Título del proyecto: Desarrollo de nanoingredientes funcionales a partir de clara de huevo: Aplicación a productos cárnicos.

Instrumento: Proyecto Investigación Orientada (PIO 2010-033-16).

Año convocatoria: 2016.

Organismo financiador: Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTel).

Director/a: Liliana G. Santiago.

Malvern). Por otro lado, se realizaron mediciones de intensidad de fluorescencia extrínseca de soluciones de PCHn con concentraciones crecientes de ácido linoleico (AL), a fin de obtener la cantidad de AL que se une a las PCHn (g AL / g PCHn).

Estudio de la interacción entre PCHn y pectina de alto metoxilo (PAM)

Para este estudio se prepararon sistemas PCHn-PAM mezclando soluciones de PCHn y PAM de modo tal que la concentración final de PCHn fue de 1 g/L, mientras que la concentración de PAM fue 0,75, 0,50 y 0,375 g/L. Una vez preparados los 3 sistemas, se colocaron en agitación y se ajustó el pH con HCl 1 N en un rango de 7 a 2,5. Para cada pH se tomaron muestras para determinar luego turbidez (absorbancia a 400nm) y potencial Zeta a partir de la determinación de movilidad electroforética (Zetasizer Nano ZS90, Malvern).

Obtención y caracterización del ingrediente AL-PCHn-PAM en polvo

Para obtener el ingrediente AL-PCHn-PAM en polvo, se realizaron las siguientes etapas: i) obtención de PCHn por calentamiento; ii) obtención de complejos AL-PCHn, mezclando solución de PCHn a pH 7 con solución etanólica de AL; iii) obtención de complejos AL-PCHn-PAM, por agregado de solución de PAM a los complejos AL-PCHn y posterior ajuste a pH a 3,5; iv) centrifugación a ~2000g durante 60 min y a 20°C; v) separación del pellet AL-PCHn-PAM; vi) congelación y liofilización mediante equipo Flexi-Dry TM (USA) a presión < 500 mT y temperatura de condensación de -80°C.

El contenido de AL en el polvo se determinó por HPLC (Cromatógrafo HPLC Prominence Serie 20A, Shimadzu, Japón).

También se realizó el recuento microbiológico de células viables de bacterias totales, número de coliformes y mohos y levaduras.

Formulación y caracterización de yogur con ingrediente AL-PCHn-PAM en polvo

Para la formulación del yogur se disolvió leche en polvo descremada (12%) y sacarosa (8%) en agua. Luego se calentó en un baño de agua a 90°C por 5 min. Después se enfrió en baño de agua hasta 43°C y se agregó el fermento. Una vez que el pH disminuyó hasta ~4,7 se enfrió en baño de hielo. Posteriormente se agregó el AL-PCHn-PAM en polvo hasta una concentración de 0% (control), 0,5% y 1%. Por último, se agregó el saborizante (crema).

El contenido de AL en el polvo se determinó por HPLC.

Se realizó la evaluación sensorial (n=20) de las muestras utilizando una escala hedónica de siete puntos donde cada uno de ellos fue categorizado desde 1 (me disgusta mucho) hasta 7 (me gusta mucho).

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Obtención y caracterización de nanopartículas de proteína de clara de huevo (PCHn)

En la Fig. 1.A se observa que hasta un 97% del volumen de las partículas presentaron un tamaño menor a 100 nm. Además, se observaron dos poblaciones principales, una de ellas con tamaño menor a 10 nm, y la otra en un rango entre 10 y 100 nm. Por otro lado, es importante destacar que las distribuciones estuvieron muy cercanas entre sí, demostrando la reproducibilidad del proceso.

En la Fig. 1.B puede observarse que a medida que aumentó la concentración de ligando, la intensidad de fluorescencia extrínseca disminuyó como consecuencia de la menor disponibilidad de sitios de unión para el ANS (Sponton y col., 2016). Por otro lado, se realizó el ajuste al modelo de Scatchard modificado de los datos de intensidad de fluorescencia extrínseca para determinar la cantidad de AL que se une a las PCHn ($n = \text{g AL} / \text{g PCHn}$), el cual fue de $n = 0,5$.

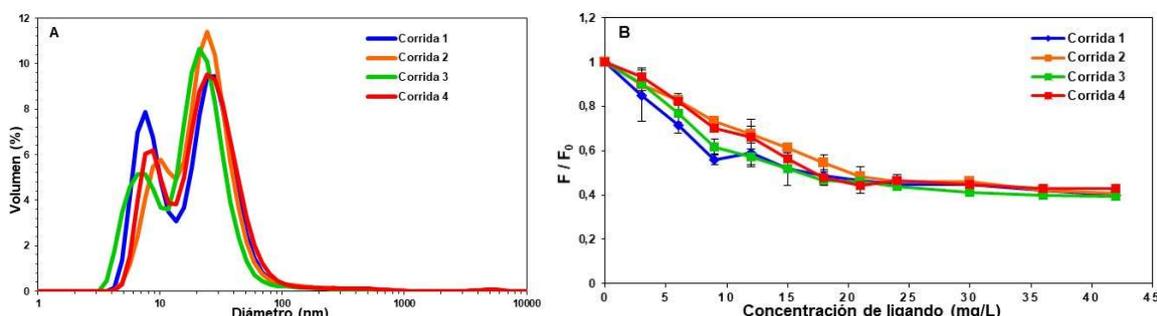


Figura 1. A) Distribución de tamaño de partícula de PCHn y B) Intensidad de fluorescencia extrínseca de PCHn (50 mg/L) en función de la concentración de AL.

Estudio de la interacción entre PCHn y pectina de alto metoxilo (PAM)

En la Fig. 2.A se presentan las mediciones de turbidez de PCHn-PAM. Puede notarse que el sistema sin PAM presentó un máximo de turbidez a pH entre 5,0 y 4,5; mientras que los 3 sistemas con PAM presentaron la mayor turbidez a pH de 3,5, el cual sería el pH que permite la máxima formación de complejos de PCHn-PAM.

Por otro lado, en la Fig. 2.B se puede observar que: i) en el caso del sistema de PCHn el potencial Zeta cambió de signo en el valor de pH 4,70, correspondiente al pI; ii) para los sistemas PCHn-PAM el potencial Zeta fue aumentando a medida que disminuyó el pH; iii) a pH 2,5 solo la relación PCHn-PAM 1:0,75 fue la que presentó valor negativo, mientras que las otras presentaron valores positivos. Por lo tanto, para asegurar una cobertura completa de PAM sobre PCHn, se eligió la relación 1:0,75, para la producción del ingrediente.

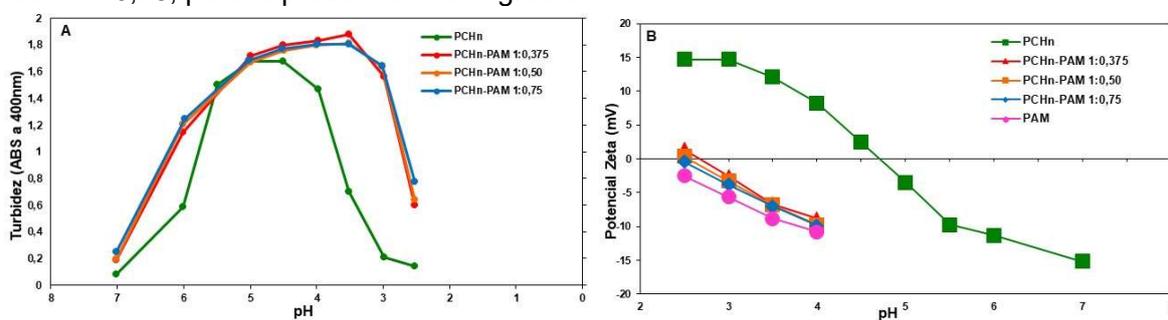


Figura 2. A). Turbidez inicial (A) y Perfil de potencial Zeta versus pH (B) de sistemas PCHn-PAM.

Obtención y caracterización del ingrediente AL-PCHn-PAM en polvo

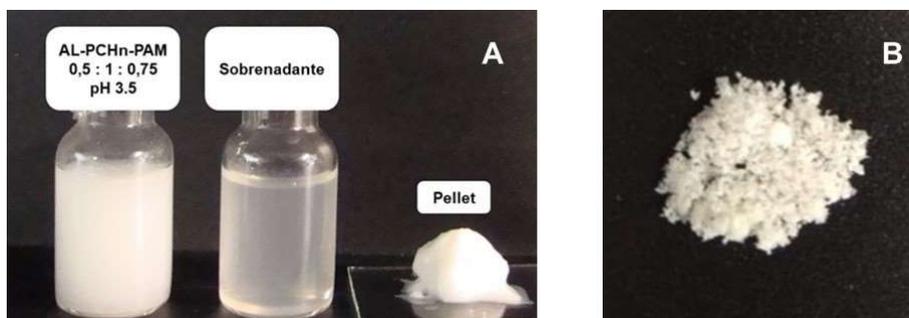


Figura 3. A) Sistema AL-PCHn-PAM a pH 3,5 antes (izquierda) y después de centrifugar (2000 g, 60 min): sobrenadante (centro) y pellet (derecha). B) AL-PCHn-PAM luego de liofilizar.

En la Fig. 3.A se observa que luego de centrifugar el sistema AL-PCHn-PAM hubo separación de fases obteniendo por un lado el sobrenadante clarificado y por el otro el pellet. Luego de liofilizar el pellet se obtuvo un polvo de color blanco (Fig. 3.B).

El contenido de AL presente en el ingrediente fue de $15,2 \pm 1,9\%$. Además, presentó un bajo recuento microbiológico, lo que permitiría su incorporación a un alimento.

Formulación y caracterización de yogur con ingrediente AL-PCHn-PAM en polvo

En relación a los resultados de la evaluación sensorial, pudo observarse que tanto el yogur control como el formulado con 0,5 % de ingrediente presentaron una alta aceptabilidad, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ($6,45 \pm 0,69$ y $5,95 \pm 0,89$, respectivamente). El yogur formulado con 1 % presentó una menor aceptabilidad ($4,25 \pm 1,29$).

Por una parte, la cantidad de AL presente en el yogur control fue de $0,036 \pm 0,004$ %, mientras que el yogur con 0,5% y 1% de ingrediente en polvo, presentaron un contenido de AL de $0,158 \pm 0,001$ % y $0,263 \pm 0,004\%$, respectivamente.

Conclusiones

En primer lugar, se logró desarrollar un proceso de obtención de PCHn con capacidad de ligar AL a partir de clara de huevo líquida industrial. Dicho procedimiento correspondió a un escalado del método de producción a escala laboratorio y mostró una reproducibilidad elevada.

En segundo lugar, se reunió conocimiento en relación al desarrollo de un método de producción de AL-PCHn-PAM en polvo a través de la estrategia nanotecnológica de formación de complejos moleculares.

En tercer lugar, se logró formular el yogur con el agregado de AL-PCHn-PAM en polvo evaluando su aceptabilidad por parte del consumidor.

Mediante el presente trabajo se reunieron conocimientos en relación al desarrollo de un ingrediente en polvo usando materias primas comercialmente accesibles y de grado alimenticio, aplicando estrategias nanotecnológicas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bhaskarachary, K., Vemula S.R., Gavaravarapu S.R.M., Joshi A.K.R., 2016. Traditional Foods, Functional Foods and Nutraceuticals. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 82, 5, 1565-1577.
- McClements, D. J., Li, Y., 2010. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159, 213–228.
- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., Nasirpour, A., 2013. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 19 (2013), 29-43.
- Sponton, O.E., Perez, A.A., Carrara, C.R., Santiago, L.G., 2016. Complexes between ovalbumin nanoparticles and linoleic acid: Stoichiometric, kinetic and thermodynamic aspects. *Food Chemistry*, 211, 819–826.
- Sponton, O.E., Perez, A.A., Ramel, J.V., Santiago, L.G., 2017a. Protein nanovehicles produced from egg white. Part 1: Effect of pH and heat treatment time on particle size and binding capacity. *Food Hydrocolloids*, 73, 67-73.
- Sponton, O.E., Perez, A.A., Santiago, L.G., 2017b. Protein-polysaccharide associative phase separation applied to obtain a linoleic acid dried ingredient. *Food Hidrocolloids*, 71, 158-167.