



Encuentro
de Jóvenes
Investigadores

MICROENCAPSULACION CON ARABINOXILANOS COMO ESTRATEGIA DE PROTECCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS FRENTE A LA DIGESTION GASTROINTESTINAL

Heinen, Gabriel

Instituto de Tecnología de Alimentos ITA-UNL

Directora: Drago, Silvina R.

Codirector: Cian, Raúl

Área: Ingeniería

Palabras claves: Arabinoxilanos, Bioactividad, Encapsulación.

INTRODUCCIÓN

La hez de malta (HM) es el principal subproducto de la industria cervecera. Está compuesta mayoritariamente por 28% de lignina, 25% de hemicelulosa, 17% de celulosa y 30% de proteínas (MC Carty y col., 2012). La hemicelulosa consiste principalmente de arabinoxilanos (AX) que pueden estar presentes hasta el 40% en peso seco, constituyendo el principal carbohidrato no celulósico de cereales y hierbas (Lynch y col., 2016).

A partir de la HM es posible obtener AX. Estos están formados por una cadena lineal de xilas unidas por enlaces glicosídicos $\beta(1-4)$ a la cual se unen residuos de arabinosa mediante enlaces glicosídicos $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-2)$, o ambos. A su vez, las moléculas de arabinosa suelen presentar ácido ferúlico (AF) en su estructura, unido en la posición O-5. La estructura tiene un gran impacto no sólo en las propiedades fisicoquímicas tales como la solubilidad y la viscosidad, sino también en las propiedades bioactivas, asociadas a los ácidos hidroxicinámicos unidos a estos compuestos.

El alga verde *Ulva spp* es una fuente alternativa de proteínas y un ingrediente prometedor para el desarrollo de alimentos funcionales. Se encuentra a lo largo de las costas oceánicas en todo el mundo, y puede obtenerse en las costas de la patagonia argentina. Tiene un contenido proteico que oscila entre el 15 y el 35%, lo que la convierte en una buena fuente proteica para la producción de péptidos bioactivos (García-Vaquero y col., 2016). En este sentido, varios péptidos bioactivos derivados de *Ulva* se han obtenido por hidrólisis enzimática *in vitro* (Cian y col., 2018; Garcia-Vaquero y col., 2019). Estos péptidos han presentado propiedades bioactivas tales como: antioxidantes, anticancerígenas, antihipertensivas e inmunomoduladoras (Cian y col., 2018; Lafarga y col., 2020). Sin embargo, varios estudios han demostrado que la mayoría de los péptidos bioactivos que contienen más de 2-3 residuos de aminoácidos no resisten la digestión gastrointestinal simulada, perdiendo sus propiedades biofuncionales (De Koker y col., 2011). Una alternativa para protegerlos dentro del tracto gastrointestinal es mediante microencapsulación por secado spray utilizando diferentes biopolímeros (Cian y col., 2019b).

Título del proyecto: REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA CERVECERA. EXTRACCIÓN, PROPIEDADES TECNOLÓGICAS Y BIOFUNCIONALES Y APLICACIONES PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA DE PROTEÍNAS, CARBOHIDRATOS NO DIGERIBLES Y COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LA HEZ DE MALTA.

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: FONCYT

Director/a: Drago, Silvina R.



OBJETIVOS

Estudiar la microencapsulación de péptidos bioactivos del alga verde *Ulva spp* utilizando arabinosilanos de la hez de malta como material de pared, determinando la bioaccesibilidad de los péptidos microencapsulados con diferentes fórmulas.

METODOLOGÍA

Para obtener el hidrolizado proteico, se realizó una hidrólisis secuencial con Neutrasa y Flavourzyme en las condiciones sugeridas por el fabricante, sobre el extracto proteico del alga *Ulva spp*. La fracción soluble del hidrolizado (H) se encapsuló por secado spray utilizando como material de pared maltodextrina y arabinosilanos, con tres niveles de cloruro de calcio (0, 2 y 5 g/100 g sólidos), obteniéndose las cápsulas C1, C2 y C3, respectivamente.

La morfología y el tamaño de las microcápsulas se evaluaron por microscopía electrónica de barrido y también se determinó la eficiencia de encapsulación de proteínas.

Se realizó una digestión gastrointestinal (DGI) con diálisis siguiendo el método INFOGEST propuesto por Brodkorb y col., (2019) para estimar la bioaccesibilidad de los péptidos bioactivos. La etapa de diálisis fue realizada de acuerdo a Cian y col., (2019a) utilizando membranas de corte 6-8 kDa. , obteniéndose una fracción de digeridos y otra de dializados que fueron conservadas a -20°C hasta su análisis.

Los diferentes ensayos de bioactividad se realizaron de acuerdo a Cian y col., (2018) y Donkor y col., (2012). El potencial anti-diabetogénico (AD) se determinó a través de la inhibición de la enzima α -glucosidasa de los digeridos y de la inhibición de la dipeptidilpeptidasa-IV (DPP-IV) en los dializados. La actividad antioxidante se evaluó midiendo la inhibición del radical ABTS⁺ (AAO) de los digeridos. La actividad antihipertensiva (AH), a través de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) en los dializados. Estas bioactividades se midieron también en la muestra H y en las fracciones obtenidas luego de la DGI. Para expresar los resultados, en todos los casos se determinó la cantidad de proteínas o de cápsulas (g/L) que inhiben el 50% de la enzima (IC50).

Se utilizó el software Statgraphic Centurion XVI para realizar los estudios estadísticos de ANOVA y test LSD para comparación de medias a un nivel de confianza de 95%.

RESULTADOS

Las microcápsulas presentaron formas redondas y lisas y algunas abolladuras en la superficie, que son características de los productos atomizados (Mohan y col., 2015). El tamaño de las capsulas estuvo en el rango de 4-18 μ m.

La eficiencia de encapsulación de proteínas fue de: 52,18 \pm 0,12^b, 48,98 \pm 0,11^a y 88,91 \pm 0,21^c% para C1, C2, y C3 respectivamente.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de las actividades AD de las diferentes fracciones de digestión de las formulaciones de las microcápsulas, indicando para cada metodología la muestra utilizada para el ensayo.

Para la inhibición de DPPIV, la DGI tendió a disminuir la actividad AD del H y la encapsulación con las fórmulas C1 y C2 protegió a los péptidos del ambiente GI. En el caso de la inhibición de la α -glucosidasa, el H no presentó actividad y la DGI generó nuevos péptidos inhibidores de esta enzima digestiva presente en el lumen intestinal. La encapsulación previno parcialmente la hidrólisis de H por las enzimas digestivas, por lo que disminuyó la actividad respecto a H digerido, siendo C2 y C3 las fórmulas que menos afectaron esta actividad.

Tabla 1. Actividad antidiabetogénica de fracciones de digestión de microcápsulas (C1, C2, C3) y del hidrolizado (H)

Muestra	Inhibición de la DPPIV IC50 (g proteínas/L)	Muestra	Inhibición α -glucosidasa IC50 (g capsulas/L)
Dializado C1	3,06 \pm 0,35 ^a	Digerido C1	8,29 \pm 0,58 ^c
Dializado C2	2,53 \pm 0,18 ^a	Digerido C2	5,45 \pm 0,42 ^b
Dializado C3	4,38 \pm 0,31 ^c	Digerido C3	6,75 \pm 0,61 ^b
Dializado H	3,80 \pm 0,34 ^{b,c}	Digerido H	1,43 \pm 0,03 ^a
H	3,22 \pm 0,21 ^{a,b}	H	Sin actividad

Letras diferentes en una columna implican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

En la Tabla 2 se muestran los resultados de las actividades AO (Inhibición ABTS⁺) y AH (medida a través de la inhibición de ECA I) de las diferentes fracciones de digestión de las formulaciones de las microcápsulas y del H.

Tabla 2. Actividad antioxidante y antihipertensiva de fracciones de digestión de microcápsulas (C1, C2, C3) y del hidrolizado (H)

Muestras	Inhibición ABTS ⁺ IC50 (g capsula/L)	Muestras	Actividad Antihipertensiva IC50 (g proteínas/L)
Digerido C1	23,82 \pm 1,13 ^c	Dializado C1	2,73 \pm 0,03 ^b
Digerido C2	24,62 \pm 0,83 ^c	Dializado C2	3,02 \pm 0,26 ^b
Digerido C3	22,68 \pm 1,08 ^c	Dializado C3	3,81 \pm 0,10 ^c
Digerido H	15,66 \pm 0,53 ^b	Dializado H	4,86 \pm 0,26 ^d
H	11,56 \pm 0,29 ^a	H	1,48 \pm 0,06 ^a

Letras diferentes en una columna implican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

La DGI disminuyó la AAO de los péptidos de H, y la encapsulación no fue favorable ya que la actividad de los péptidos microencapsulados fue aún menor, aunque las microcápsulas conservaron cierta actividad.

En cuanto a la AH, la DGI disminuyó la actividad AH de los péptidos del alga y la encapsulación con las fórmulas C1 y C2 protegió parcialmente los péptidos de dicha digestión.

Las enzimas digestivas pueden degradar los péptidos bioactivos disminuyendo su bioactividad y también la hidrólisis intraluminal puede aumentar la bioactividad a través de la generación de nuevos péptidos (Cian y col., 2019b). Considerando esto, la encapsulación puede o no resultar favorable como estrategia de protección de los péptidos del ambiente gastrointestinal. Los péptidos pueden presentar simultáneamente diferentes bioactividades, por lo que la encapsulación puede presentar un impacto diferente. Al respecto, la fórmula C2 fue la más apropiada para mantener la actividad AD ya sea a través de la inhibición de la DPPIV como de la α -glucosidasa. A su vez, la fórmula C2 fue la más apropiada para proteger la actividad AH, aunque sea parcialmente.

Sin embargo para la AO (inhibición del radical ABTS⁺) si bien se mantuvo cierta actividad, la encapsulación no fue eficiente. Se ha comprobado que los AX tienen capacidad de inhibición del radical ABTS (Bravi y col., 2021, Malunga, 2015), lo cual indicaría que al integrar el material de pared perjudican la capacidad de bloqueo del radical por parte de los péptidos, probablemente disminuyendo su bioaccesibilidad.



CONCLUSIONES

Estos resultados ponen de manifiesto que la encapsulación como estrategia de protección de los péptidos del ambiente gastrointestinal puede ser favorable o no según la bioactividad que se evalúe, ya que el mismo proceso de DGI puede reducir o aumentar su actividad. Los péptidos de *Ulva spp* poseen propiedades antihipertensivas y antidibetogéncias que son reducidas por la DGI. La encapsulación con arabinosilanos y calcio protegió a los péptidos del ambiente GI, por lo que sería una buena estrategia para generar ingredientes bioactivos para agregar a alimentos o como suplementos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bravi, E., Francesco, G. D., Sileoni, V., Perretti, G., Galgano, F., Marconi, O. 2021.** Brewing by-product upcycling potential: Nutritionally valuable compounds and antioxidant activity evaluation. *Antioxidants*, 10(2), 165.
- Brodkorb, A., Egger, L., Recio, I. 2019.** Nature Protocols. 14: 991-1014.
- Cian, R. E., Garzón, A. G., Martínez-Augustin, O., Botto, C. C., Drago, S. R. 2018.** Antithrombotic activity of brewers' spent grain peptides and their effects on blood coagulation pathways. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(3), 241-246
- Cian, R. E., Hernández-Chirlaque, C., Gómez-Belmonte, R., Drago, S. R., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O. 2018.** Green alga *Ulva spp.* hydrolysates and their peptide fractions regulate cytokine production in splenic macrophages and lymphocytes involving the TLR4-NFκB/MAPK pathways. *Marine Drugs*, 7, 235.
- Cian, R.E., Campos-Soldini, A., Chel-Guerrero, L., Drago, S., Betancur-Ancona, D. 2019b.** Bioactive *Phaseolus lunatus* peptides release from maltodextrin/gum arabic microcapsules obtained by spray drying after simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science and Technology*, 54, 2002–2009.
- Cian, R. E., Salgado, P. R., Mauri, A. N., Drago, S. R. 2019a.** Pyropia columbina phycocolloids as microencapsulating material improve bioaccessibility of brewers' spent grain peptides with ACE-I inhibitory activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(3), 1311-1317.
- De Koker, S., De Cock, L.J., Rivera-Gil, P. 2011.** Polymeric multilayer capsules delivering biotherapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 748–761.
- Donkor, O. N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., Vasiljevic, T. 2012.** Germinated grains—Sources of bioactive compounds. *Food chemistry*, 135(3), 950-959.
- García-Vaquero, M., Hayes, M. 2016.** Red and green macroalgae for fish and animal feed and human functional food development. *Food Reviews International*, 32, 15–45.
- García-Vaquero, M., Mora, L., Hayes, M. 2019.** In vitro and in silico approaches to generating and identifying angiotensin-converting enzyme I inhibitory peptides from green macroalga *Ulva lactuca*. *Marine Drugs*, 17(4), 204.
- Lafarga, T., Acién-Fernández, F. G., García-Vaquero, M. 2020.** Bioactive peptides and carbohydrates from seaweed for food applications: Natural occurrence, isolation, purification, and identification. *Algal Research*, 48, 101909.
- Lynch, K. M., Steffen, E. J., Arendt, E. K. 2016.** Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 553-568
- Malunga, L. N., Beta, T. 2015.** Antioxidant capacity of water-extractable arabinosilanol from commercial barley, wheat, and wheat fractions. *Cereal Chemistry*, 92(1), 29-36.
- McCarthy, A. L., O'Callaghan, Y. C., Piggott, C. O., FitzGerald, R. J., O'Brien, N. M. 2013.** Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: a review. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(1), 117-125.
- Mohan, A., Rajendran, S. R., He, Q. S., Bazinet, L., Udenigwe, C. C. 2015.** Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: A review. *Rsc Advances*, 5(97), 79270-79278.