

16. Ciencia, Tecnología e Innovación

Estudio del efecto de diferentes materiales de cubierta proteicos en la nanoencapsulación de vitamina E para uso en alimentación acuícola

Cerro, Daniela; Bustos, Rubén

daniela.cerro@usach.cl; ruben.bustos@usach.cl

Facultad de Ingeniería

Universidad de Santiago de Chile

Resumen

La nanoencapsulación de compuestos a partir de métodos de emulsificación se utiliza como alternativa tecnológica para mejorar la calidad de alimentación acuícola. El objetivo general fue desarrollar nanocápsulas de vitamina E con diferentes sistemas de cubierta proteicos. Los objetivos específicos fueron: determinar y caracterizar las condiciones óptimas para la formación de nanoemulsiones con el menor tamaño de partícula; obtener y caracterizar polvos con vitamina E mediante la técnica de secado por aspersión. La preparación de las emulsiones se realizó por el método de emulsificación por homogeneización seguido de una etapa de ultrasonido. A partir de diseños experimentales se determinaron las condiciones óptimas de las nanoemulsiones, mediante la medición del tamaño de partícula con un sistema de dispersión de luz dinámica para las matrices proteicas de concentrado de suero de leche y aislado de soya. La obtención de los polvos se realizó en el equipo secador por aspersión a una temperatura de 120°C y flujo de alimentación de 0,13 L/min, que fueron caracterizados en cuanto a sus propiedades físico químicas. Los resultados muestran que las condiciones óptimas en que se minimiza el tamaño de gota de las nanoemulsiones para ambas matrices fueron 0,67% Tween 80, 1,00-1,17 % aceite de maravilla con vitamina E y 30 minutos de ultrasonido, con tamaños de gota menores a 200 nm. Los polvos contienen humedad y actividad de agua mínimas. Mediante FT-IR se corroboran que los polvos contienen vitamina en su interior. Por lo cual se lograron desarrollar nanocápsulas de vitamina E con matrices proteicas que servirán como potencial uso en alimentación acuícola.

Palabras clave: Encapsulación, secado por aspersión, vitamina E, matrices proteicas.

Introducción

Chile se ha considerado como un país productor de recursos pesqueros altamente valorados a nivel mundial, concentrando un tercio de la producción global. Actualmente el salmón es el segundo producto más exportado, superando los 4.000 millones de dólares, abasteciendo principalmente a países como Japón, Estados Unidos y Brasil (Salmón Chile, 2018). Dentro de las principales especies que se exportan, destacan el Salmón del Atlántico (71%), el Salmón del Pacífico (21%) y la Trucha Arcoíris (8%), con un total de 522.871 toneladas netas para el 2017 (Salmón Chile, 2018). Enfermedades, mortandad o malformaciones en los peces generan pérdidas económicas considerables en la industria acuícola (Darias, Mazurais, Koumoundouros, Cahu, & Zambonino-Infante, 2011). Los esfuerzos se centran en mejorar la calidad nutritiva para evitar enfermedades alimentarias, y con ello evitar mermas en producción. Entre los requerimientos nutritivos de los peces destacan los aminoácidos, las proteínas, los lípidos, minerales y las vitaminas. La ingesta de estas últimas debe estar estudiadas ya que una dosis deficiente puede generar enfermedades, ya sea por h́iper o por avitaminosis. (Halver & Hardy, 2002). Entre las vitaminas liposolubles, la vitamina E funciona como un nutriente indispensable requerido para mantener las funciones fisiológicas normales en los peces (Pan et al., 2017). El requerimiento

para salmón está entre 35-60 mg por kg de dieta seca, los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados y los bajos niveles de vitamina C, selenio y astaxantina aumentan el requerimiento (Hamre, 2011). Se debe asegurar la protección de estas vitaminas, debido a que son sensibles a las condiciones de temperatura y oxidantes, entre otros. Una alternativa novedosa y prometedora es a partir de la nanoencapsulación, cuyos beneficios son su mayor biodisponibilidad, una gran estabilidad de almacenamiento y una liberación controlada de compuestos activos. (Katouzian & Jafari, 2016). La tecnología de encapsulación por secado spray tiene las ventajas de ser económica, flexible, continua y efectiva. En este proceso se elimina el agua generando polvos cuyo núcleo o compuesto bioactivo recubierto de un material de pared o membrana (Ray, Raychaudhuri, & Chakraborty, 2016). Este proceso de secado se realiza a partir de una nanoemulsión, donde el ultrasonido de alta intensidad es una tecnología efectiva para modificar las propiedades estructurales y funcionales utilizadas en nanoemulsiones (Lee et al., 2016). La selección del tipo de material de pared dependerá de la aplicabilidad que se desee realizar. Las proteínas son una buena opción para encapsular compuestos liposolubles, además que mejora la nutrición acuícola, debido a los altos requerimientos proteicos en

salmones, que asegurarán tanto su bioaccesibilidad como su biodigestibilidad. (Lee et al., 2016).

Objetivos

El objetivo general es desarrollar nano cápsulas de vitamina E mediante secado por aspersion a partir de emulsiones con diferentes sistemas de cubierta proteicos bioaccesibles para su aplicabilidad en alimentación acuícola.

Como objetivos específicos fueron:

- i) Determinar y caracterizar las condiciones óptimas para la formación de nanoemulsiones con mínimo tamaño de gota a partir de diferentes sistemas de cubierta proteicos.
- ii) Obtener polvos con vitamina E encapsulada y caracterizar a partir de las nanoemulsiones óptimas mediante técnica de secado por aspersion.

Materiales y Métodos

Como material de cubierta se utilizó concentrado de proteína de suero de leche (WPC-80) y aislado de proteína de soya (P-Soya) gentilmente donados por Quimatic S.A (Chile). Como fase oleosa se utilizó aceite de maravilla marca Natura y vitamina E acetato (DL-alpha-tocopheryl acetate) suministrado por BASF. Como surfactante se utilizó Tween 80 de Winkler (E.E.U.U).

La metodología consistió en preparar 100 mL de emulsión aceite en agua (o/w). La fase acuosa contiene 6% p/v de matriz

proteica agitada magnéticamente a 500 rpm, 30°C por 1h. Se adiciona surfactante Tween 80 y se agita durante 1h. Se almacenan por 24h para asegurar la hidratación. El contenido de aceite, que contiene una razón 9:1 aceite maravilla: vitamina E, se añadió a la fase acuosa gota a gota en la etapa de homogenización de alta velocidad con el equipo ULTRA-TURRAX® a 10.000 rpm por 10 min. Finalmente se somete a etapa de ultrasonido en equipo ultrasónico QSonica, USA, a condiciones de 80% amplitud, con ciclos de 15 segundos encendido y 10 segundos apagados a tiempos definidos.

Para obtener nanoemulsiones óptimas se realizó un diseño de superficie Box Behnken de 12 corridas de 3 factores y 2 niveles más tres puntos centrales, midiendo como variable respuesta el tamaño de gota con método de luz dinámica (DLS) con el equipo de difracción de láser Zetasizer Malver ZS, que además determina el índice de polidispersión, medida que indica la homogeneidad en los tamaños. La optimización del proceso en que se minimiza el tamaño de gota se realizó con el software de análisis estadístico Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.18. La validación del punto óptimo se realiza experimentalmente por triplicado. Se caracterizó en cuanto a pH, densidad, viscosidad y microscopía óptica. La etapa de secado de estas nanoemulsiones se

realizó mediante la técnica de secado por aspersion en el equipo Büchi mini Secador Spray B-290 a una temperatura entrada de 120°C, flujo de alimentación de 0,13 L/h. Se caracterizaron los polvos obtenidos, midiendo el rendimiento del proceso de secado, humedad, actividad de agua, e interacciones moleculares mediante FT-IR para corroborar la encapsulación de vitamina E en la matriz.

Resultados y Discusión

1. Obtención de las nanoemulsiones óptimas.

A partir del diseño de superficie Box Behnken se obtienen los resultados de tamaño de gota para las emulsiones que se presentan en la Tabla 1, en donde se aprecian tamaños que varían entre 140 y 288 nm.

Tabla 1: Resultados del tamaño de gota

Aceite (%)	Tween 80 (%)	US (min)	Tamaño (nm)	
			WPC-80	P-Soya
2	0,6	20	210,3 ± 4,6	185,4 ± 2,1
3	0,6	10	257,7 ± 4,9	245,4 ± 5,1
3	0,9	20	229,9 ± 3,7	199,7 ± 1,7
1	0,6	30	186,0 ± 2,1	139,8 ± 2,5
2	0,9	30	187,5 ± 1,9	169,3 ± 4,2
2	0,6	20	207,1 ± 3,8	190,6 ± 3,7
2	0,9	10	201,6 ± 1,4	167,7 ± 2,1
1	0,6	10	205,3 ± 4,8	177,6 ± 4,4
3	0,6	30	245,1 ±	237,2 ±

			3,6	1,5
2	0,3	30	233,1 ± 1,7	201,6 ± 3,3
2	0,6	20	206,2 ± 4,3	171,6 ± 2,7
1	0,3	20	202,1 ± 2,4	175,2 ± 3,8
3	0,3	20	288,2 ± 5,3	253,6 ± 4,1
1	0,9	20	208,9 ± 3,5	164,1 ± 2,3
2	0,3	10	248,0 ± 4,1	229,2 ± 4,9

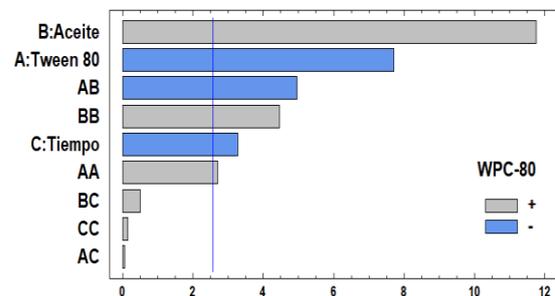


Figura 1: Diagrama de Pareto estandarizado para emulsiones WPC-80

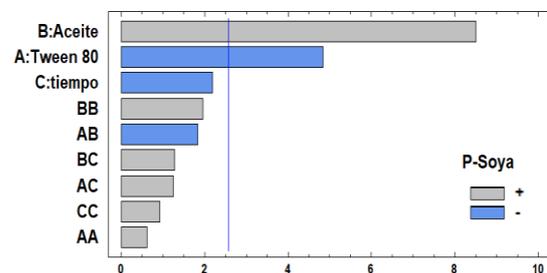


Figura 2: Diagrama de Pareto estandarizado para emulsiones P-Soya

El análisis de varianza indica los efectos que son significativamente diferentes de 0 con un nivel de confianza del 95%. Para emulsiones WPC-80, indica que son 6 los efectos, cuyo R^2 ajustado indica que el modelo se ajusta con un 94,7%. Para las emulsiones P-Soya, indica que son 2 los efectos y el R^2 indica que el modelo se ajusta con un es 88,0%.

Estos resultados se corroboran en el diagrama de Pareto de la Figura 1 y 2. Además, se aprecia que para ambas proteínas el aumento de aceite aumenta el tamaño, en cambio disminuye al aumentar el contenido de Tween 80, debido a que el surfactante tiene la capacidad de disminuir la tensión superficial entre las fases inmiscibles teniendo un efecto de disminución en el tamaño, al igual que al aumentar el tiempo de ultrasonido.

a los propuestos por el diseño en ambas matrices proteicas.

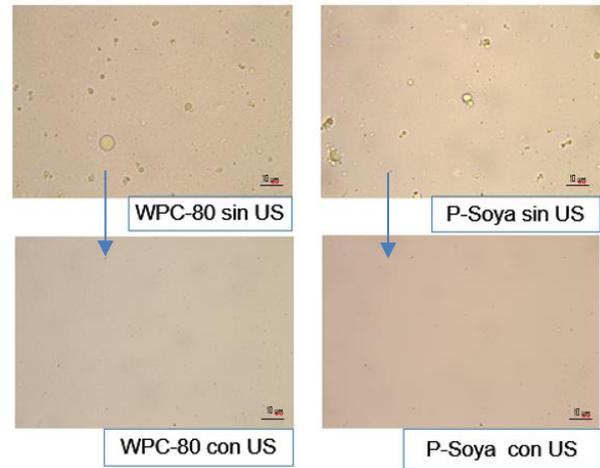


Figura 3: Microscopías ópticas a 100x

Los análisis de microscopía óptica de la Figura 3 muestra que en la etapa de homogeneización previa al ultrasonido se aprecia una emulsión con pequeñas gotitas de aceite menores a 10 μm . Pero al pasar estas emulsiones a etapa ultrasónica ya no se visualizan estas gotas, esto se atribuye a que la aplicación de ultrasonido fragmenta las partículas disminuyendo su tamaño a escala nanométrica. Esto se corrobora con los datos en la Tabla 2 de tamaño de gota que muestran que los tamaños no superan los 200 nm.

Tabla 2: Optimización del diseño

Factores	WPC-80	P-Soya
Tween 80 (% p/p)	0,67	0,67
Aceite/VE (% v/v)	1,17	1,00
Tiempo (min)	30,00	30,00
Tamaño gota teórico (nm)	186,60	148,50
Tamaño gota experimental (nm)	182,30 \pm 3,60	143,60 \pm 1,48

La optimización consiste en encontrar las condiciones en que se minimiza el tamaño de gota. La Tabla 2 muestra que el diseño determina las mejores condiciones de los factores con 1,17-1,00% de aceite/VE, 0,67% p/p Tween80 y 30 minutos de ultrasonido; con tamaños de gota óptimos teóricos de 186,6 nm y 148,5 nm para WPC-80 y P-Soya, respectivamente. Se validan las condiciones obteniendo tamaños de gota experimentales similares

Tabla 3: Caracterización condición óptima

Caracterización	WPC-80	P-Soya
Índice de polidispersión	0,25 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01
Viscosidad (cp)	1,51 \pm 0,07	2,89 \pm 0,06
Densidad (g/mL)	1,04 \pm 0,00	1,05 \pm 0,00
pH	6,48 \pm 0,24	6,54 \pm 0,15

Los resultados de la Tabla 3 muestran que el índice de polidispersión es menor a 0,5, estableciendo que las poblaciones de las nanoemulsiones son homogéneas. La viscosidad de las nanoemulsiones WPC-80 y P-Soya son $1,51 \pm 0,07$ cp y $2,89 \pm 0,06$ cp, respectivamente. Si se analizan las viscosidades de los componentes por separado tanto de la fase acuosa (1-4 cp), y aceite maravilla (42,9 cp) (Diamante & Lan, 2014), es posible notar que las emulsiones se asemejan a la fase acuosa, debido a la microestructura que se forma al mezclar las dos fases inmiscibles que conforman la emulsión, se asemejan al agua debido a que las emulsiones tienen un contenido de agua de más del 94%. Estos resultados se corroboran además con la medición densidad que también se asemeja a las propiedades del agua, esto es beneficioso, pues altas viscosidades interfieren con el proceso de secado y conducen a la formación de gotitas alargadas y grandes que afectan adversamente (Gharsallaoui et al., 2007). Los pH de las nanoemulsiones están sobre el punto isoeléctrico, cuyo valor de pI de ambas proteínas está entre 4-5. de las proteínas entre pH 4-5. La medición del pH es importante ya que la solubilidad de las proteínas depende del pH de la solución, en el punto isoeléctrico la solubilidad es mínima.

2. Obtención de los polvos encapsulados

De las condiciones operacionales en que se obtienen nanoemulsiones con el menor de tamaño de gota, estas se secan mediante secado por aspersión a una temperatura de entrada de 120°C.

Tabla 4: Caracterización de los polvos

Caracterización	WPC-80	P-Soya
Rendimiento (%)	$76,7 \pm 1,7$	$81,0 \pm 1,5$
Humedad (%)	$4,43 \pm 0,26$	$5,01 \pm 0,59$
Actividad de agua (aw)	$0,261 \pm 0,016$	$0,295 \pm 0,024$

La Tabla 4 muestra que se obtuvieron altos rendimientos de secado debido a que se recolectó lo que estaba en el vaso y el ciclón, con alrededor del 80% de recuperación del total de muestra. Esto indica que las pérdidas sólo se deben a fracción del polvo que queda el equipo y no por volatilización de los compuestos. Además, los polvos contienen un bajo contenido de humedad (<5%) y actividad de agua (<0,3), beneficioso para mantener la estabilidad física y química de los polvos durante el tiempo de almacenamiento. El bajo contenido de agua minimiza la liberación del contenido de vitamina E encapsulado, además se evita la oxidación lipídica.

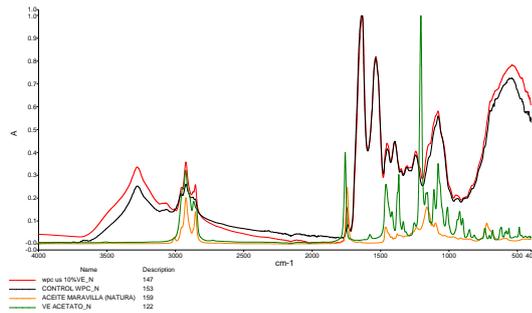


Figura 4: Análisis FT-IR para WPC-80

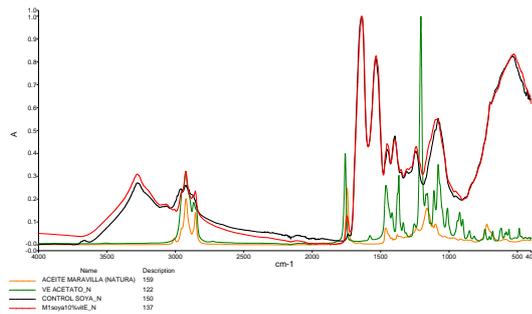


Figura 5: Análisis FT-IR para WPC-80 (arriba) y P-Soya (abajo)

Los resultados de las Figuras 4 y 5 muestran que todos los polvos analizados presentan un pico alrededor de los 3300 cm^{-1} , correspondientes a vibraciones en los enlaces del grupo OH del agua, interpretando que las muestras tienen un grado de humedad (Panyoyai, Shanks, & Kasapis, 2017). Estos datos se corroboran con la medición de humedad de la Tabla 4 que cuantifica la humedad de las muestras, menor a un 5%

Las muestras se nanoencapsularon con una fase oleosa que contenía una relación aceite de maravilla: vitamina E de 9:1. Las bandas de asignación alfa tocoferol acetato predominantes se encuentran a 1204,57 cm^{-1} , correspondiente al grupo éter C-O-C del anillo, y a 1758,23 cm^{-1} correspondiente al grupo C=O (Panyoyai

et al., 2017). Las bandas características de aceite de maravilla se encuentran a 2923,18 cm^{-1} de vibraciones de estiramiento simétrica y asimétrica del grupo metileno CH₂. En 1743,74 cm^{-1} se encuentra el grupo carbonilo C=O, del enlace éster de triacilglícerol (Rohman, Che Man, Hashim, & Ismail, 2011)

En los polvos nanoencapsulados para ambas matrices proteicas, se detecta levemente el peaks a 1744 y 2924 cm^{-1} lo que muestra que se encuentra una pequeña porción de aceite de maravilla en la superficie de los polvos. Pero no se detectan los peaks característicos de vitamina, esto se puede deber a que se encuentra encapsulada dentro de la matriz proteica, sumado a que la baja concentración menor a un 2% hace difícil la detección. Además, se detectan peaks característicos a 1633 cm^{-1} de la banda de grupos amida secundaria, esta interacción se detecta en gran variedad de proteínas (Gbassi et al., 2012). Finalmente se detecta un peak característico desplazado a 1081 cm^{-1} que se puede deber a interacciones entre grupos proteicos y Tween 80 (1066 y 1095 cm^{-1}).

Conclusiones

Se lograron desarrollar nanocápsulas de vitamina E con dos materiales de cubierta: concentrado de proteína de suero de leche (WPC-80) y aislado de proteína de suero de leche (P-Soya). Se determinaron las condiciones en que se minimiza el tamaño de gota de las nanoemulsiones. El punto óptimo para WPC-80 fue de 0,67% Tween 80, 1,17% aceite de maravilla y 30 minutos de tratamiento ultrasónico, con un tamaño de $182,3 \pm 3,6$ nm. Para P-Soya fue de 0,67% Tween 80, 1,00% aceite de maravilla y 30 minutos de tratamiento ultrasónico, con un tamaño de $143,6 \pm 1,5$ nm. Ambas nanoemulsiones son homogéneas, con un índice de polidispersión 0,24 y 0,25 respectivamente. Sus propiedades físico químicas se asemejan a las propiedades del agua, lo que facilita que sean secadas por el método de secado por aspersion.

Se secaron las nanoemulsiones a una temperatura de 120°C , obteniendo polvos con vitamina E encapsulada, con contenidos de humedad menores a 5% y actividad de agua menor a 0,3, asegurando mínimas interacciones y liberación del compuesto activo. Los resultados FT-IR corroboran que los polvos contienen vitamina en su interior.

Bibliografía

Darias, M. J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Cahu, C. L., & Zambonino-Infante, J. L. (2011). Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. *Aquaculture*, 315(1-2), 49-60.

Diamante, L. M., & Lan, T. (2014). Absolute viscosities of vegetable oils at different temperatures and shear rate range of 64.5 to 4835 s⁻¹. *Journal of food processing*, 2014.

Gbassi, G. K., Yolou, F. S., Sarr, S. O., Atheba, P. G., Amin, C. N., & Ake, M. (2012). Whey proteins analysis in aqueous medium and in artificial gastric and intestinal fluids. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(4), 1828-1837.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.

Halver, J. E. (2002). The vitamins. *Fish nutrition*, 3, 61-141.

Hamre, K. (2011). Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. *Aquaculture nutrition*, 17(1), 98-115.

Katouzian, I., & Jafari, S. M. (2016). Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. *Trends in Food Science & Technology*, 53, 34-48.

Lee, H., Yildiz, G., Dos Santos, L. C., Jiang, S., Andrade, J. E., Engeseth, N. J., & Feng, H. (2016). Soy protein nano-aggregates with improved functional properties prepared by sequential pH treatment and ultrasonication. *Food Hydrocolloids*, 55, 200-209.

Pan, J. H., Feng, L., Jiang, W. D., Wu, P., Kuang, S. Y., Tang, L., ... & Liu, Y. (2017). Vitamin E deficiency depressed fish growth, disease resistance, and the immunity and structural integrity of immune organs in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Referring to NF- κ B, TOR and Nrf2 signaling. *Fish & shellfish immunology*, 60, 219-236.

Panyoyai, N., Shanks, R. A., & Kasapis, S. (2017). Tocopheryl acetate release from microcapsules of waxy maize starch. *Carbohydrate polymers*, 167, 27-35.

Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76-83.

Rohman, A., Che Man, Y. B., Hashim, P., & Ismail, A. (2011). FTIR spectroscopy combined with chemometrics for analysis

of lard adulteration in some vegetable oils. *Cyta-Journal of Food*, 9(2), 96-101.

Salmon Chile (2018) Exportaciones. Recuperado el 1 de agosto del 2018 de: <http://www.salmonchile.cl/es/exportaciones.php>

Agradecimientos

Los autores agradecen a Quimatic por facilitar las muestras proteicas de concentrado de suero de leche y aislado de proteína de soya.

Financiamiento

Los autores agradecen el apoyo financiero al Proyecto CEN LEITAT CHILE. Línea de micronutrientes para la acuicultura CORFO 13CEI2-21839

