



CYTAL-ALACCTA 2019
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

MICROENCAPSULACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES DEL ACEITE DE CHÍA MEDIANTE COMPLEJACIÓN POR INCLUSIÓN

Andrea E. Di Marco, Vanesa Y. Ixtaina, Mabel C. Tomás

*Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), CCT
CONICET La Plata, CICPBA, Facultad de Ciencias Exactas UNLP, La Plata,
Argentina*

E-mail: andreadimarco@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

Los beneficios nutricionales de los ácidos grasos omega-3 en muchos procesos biológicos y metabólicos se han reflejado en un mayor consumo de suplementos dietarios y de alimentos que los contengan. El aceite de chía constituye la fuente vegetal con el mayor tenor de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido α -linolénico (omega-3 ~65%). Sin embargo, uno de los mayores desafíos en el desarrollo de alimentos funcionales con aceite de chía está relacionado con su adecuada preservación por su alta susceptibilidad al deterioro oxidativo. La microencapsulación mediante complejación por inclusión con amilosa es una técnica novedosa para proteger dichos compuestos sensibles de la influencia adversa del entorno químico (O_2 , T, luz, pH, fuerza iónica). Se basa en la inclusión de moléculas de lípidos dentro de la estructura de simple hélice de la amilosa, induciendo la formación de una estructura conocida como V-amilosa. Luego de la asociación inicial amilosa-lípido y según las condiciones de reacción, los complejos obtenidos pueden adquirir un cierto grado de ordenamiento originando estructuras cristalinas/semicristalinas.

El objetivo del presente trabajo fue obtener micropartículas de ácidos grasos provenientes de la hidrólisis del aceite de chía mediante esta metodología, evaluando la influencia de las condiciones operativas (T, t) en la eficiencia del proceso. Para ello, se llevó a cabo la hidrólisis enzimática del aceite de chía utilizando una lipasa de *Candida rugosa*, siendo monitoreada a través de la medición de los ácidos grasos liberados en función del tiempo. Posteriormente, se prepararon los complejos de inclusión por el método alcalino, utilizando almidón de maíz con alto contenido de amilosa (Hylon VII, 70% amilosa) y distintas condiciones de temperatura (50, 70, 90 °C) y tiempo (2, 6 h) de reacción. Los complejos fueron secados por liofilización y caracterizados mediante difracción de rayos-X, calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía de transmisión de infrarrojo (FTIR) con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR).

Los resultados obtenidos indicaron rendimientos máxicos en un rango de 60 a 72%, exhibiendo los diversos complejos patrones de difracción de rayos-X con la presencia de picos situados alrededor de 7,5; 13 y 20° (2θ), en concordancia con un patrón típico de V-amilosa. Los termogramas obtenidos mediante DSC presentaron una temperatura de pico (T_p) comprendida entre 86 y 94 °C, observándose un incremento de la misma principalmente con el aumento de la temperatura de la reacción de complejación ensayada y valores de ΔH de ~8,0 J/g. A través de FTIR pudo corroborarse la desaparición del pico a 1742 cm^{-1} correspondiente al enlace éster del aceite sin hidrolizar y la aparición del pico a 1707 cm^{-1} correspondiente al grupo carboxilo de los ácidos grasos liberados. Este último

se observó también en los complejos obtenidos, aunque con una intensidad más débil. Los espectros de los diversos complejos originados a partir de los distintos parámetros operativos mostraron resultados similares. Por todo lo expuesto, estos complejos podrían constituir potenciales sistemas de provisión o vehiculización útiles para el enriquecimiento de alimentos con ácidos grasos omega-3.

Palabras clave: aceite de chía, ácidos grasos omega-3, microencapsulación, complejación por inclusión

1. Introducción

Los beneficios nutricionales de los ácidos grasos omega-3 sumados a la susceptibilidad que presentan frente al deterioro oxidativo han despertado un creciente interés en el desarrollo de métodos de encapsulación para poder ser luego utilizados en formulaciones de alimentos. Uno de estos métodos es la complejación por inclusión con amilosa. La amilosa, en presencia de ciertos ligandos, adopta una estructura de tipo hélice, con su parte hidrofóbica orientada hacia el interior en donde se halla la molécula complejada. De acuerdo a las condiciones experimentales, estas hélices pueden ordenarse dando origen a una estructura cuyo patrón de difracción se conoce como V-amilosa. Estos complejos, a su vez, se pueden clasificar de acuerdo a su temperatura de fusión en tipo I ó II con menor o mayor temperatura de fusión, respectivamente (Biliaderis, 1989; Karkalas, 1995). Trabajos previos han demostrado la formación de complejos amilosa-ácidos grasos poliinsaturados y señalado que las condiciones de complejación (pH, tiempo y temperatura de cristalización, naturaleza del ligando) tienen incidencia en las características fisicoquímicas del material obtenido (Karkalas, 1995; Lalush, 2005; Seo, 2015). Sin embargo, en dichos estudios se han utilizado ácidos grasos comerciales como ligandos.

El objetivo del presente trabajo fue obtener y caracterizar complejos de amilosa con ácidos grasos provenientes de la hidrólisis enzimática de una fuente natural (aceite de chía), evaluando el efecto de las condiciones experimentales (tiempo y temperatura de cristalización) en sus propiedades fisicoquímicas.

Dichos complejos podrían constituir un sistema de provisión o vehiculización de ácidos grasos poliinsaturados aplicable al enriquecimiento de alimentos.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Para la realización del presente trabajo se utilizó almidón de maíz con alto contenido de amilosa (Hylon VII, >70 % amilosa) (Ingredion Inc., USA) y aceite de chía (Solazteca SDA S.A., Argentina), composición relativa de ácidos grasos: linolénico (65,4 %), linoleico (18,0 %), palmítico (7,8 %), oleico (5,8 %), esteárico (2,6 %), araquídico (0,2 %) y eicosenoico (0,2 %). Para la hidrólisis enzimática se utilizó una enzima lipasa de *Candida rugosa* Tipo VII (actividad >700 U/mg, 1 unidad hidroliza 1 μ Eq de ácido graso en 1 h a pH 7,2 a 37 °C) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Todos los demás reactivos empleados fueron de grado analítico.

2.2. Hidrólisis enzimática de aceite de chía

Se preparó una emulsión aceite de chía/agua destilada en una relación 20 % p/p y se ajustó el pH a 7 con NaOH 1 M. La reacción de hidrólisis se inició por medio de la adición de la enzima lipasa (4 g enzima/100 g aceite) y se llevó a cabo a una temperatura constante de 37 °C con agitación magnética a 400 rpm, en un frasco de vidrio color caramelo sellado herméticamente con atmósfera de nitrógeno para disminuir posibles deterioros debido a la oxidación lipídica. A distintos intervalos de tiempo se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción, se pesaron en un erlenmeyer y se enfrió en un baño de hielo para detener la reacción. Se adicionaron 50 ml de una mezcla etanol/agua 50:50 v/v a 50 °C para disolver el aceite y gotas de indicador fenolftaleína. La mezcla se tituló con una solución de NaOH 0,1 N y el porcentaje de ácidos grasos liberados (expresados como ácido oleico) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Ácidos grasos libres (\%)} = \frac{(V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times 28,2)}{m \times f}$$

donde V_{NaOH} es el volumen (ml) de NaOH requerido durante la titulación; N_{NaOH} es la concentración normal de NaOH; 28,2 es el factor correspondiente al ácido oleico; m es la masa (gramos) de mezcla de reacción y f es la fracción de aceite al inicio de la reacción (0,2). Una vez obtenido un valor constante de ácidos grasos libres en función del tiempo, la mezcla se trasvasó a una ampolla de decantación y se efectuaron 3 extracciones con hexano. Posteriormente se evaporó el solvente a 30 °C bajo vacío utilizando un evaporador rotatorio. La fracción lipídica obtenida (hidrolizado) se almacenó bajo atmósfera de nitrógeno a -20 °C hasta su posterior utilización en la etapa de complejación.

2.3. Formación de los complejos amilosa-ácidos grasos de chíá

La preparación de los complejos se basó en el método alcalino propuesto por Karkalas (1995) con algunas modificaciones. Para ello, se disolvieron 6 g de almidón en 400 ml de KOH 0,1 M a 100 °C. Por otro lado, se disolvieron 0,6 g del hidrolizado en 600 ml de KOH 0,1 M a cada temperatura (50, 70 ó 90 °C). Se mezclaron ambas soluciones y se ajustó el pH de la mezcla a ~4,7 con HCl concentrado. La solución obtenida se colocó en un frasco de vidrio sellado herméticamente con atmósfera de nitrógeno y se mantuvo con agitación magnética (600 rpm) a los distintos tiempos y temperaturas especificados (2 ó 6 h – 50, 70 ó 90 °C). El precipitado obtenido se separó por centrifugación (4000 g – 20 min) y los complejos se secaron por liofilización. El rendimiento porcentual se calculó como la masa de complejos (g) obtenida luego de la liofilización respecto de la cantidad inicial de almidón e hidrolizado utilizados en la etapa de complejación.

2.4. Contenido de ácidos grasos C18:2 y 18:3 por cromatografía gaseosa (CG)

El contenido de ácidos grasos C18:2 y 18:3 en los complejos se determinó de acuerdo al método utilizado por Lalush (2005) con ciertas modificaciones. Para ello, se pesaron 15 mg de muestra, se adicionaron 4 ml de HCl/metanol 10 % (v/v) y se calentó en tubo sellado a 100 °C durante 20 min. Luego se enfrió y se adicionaron 2 ml de agua destilada y 1 ml de hexano calidad HPLC. Los tubos se centrifugaron 15 min a 3000 rpm. Se filtró la fracción de hexano y luego se analizó por cromatografía gaseosa utilizando un equipo Agilent Technologies 7890 A. Columna capilar DB-23 (largo 30 m, diámetro 0,25 mm y espesor 250 µm), temperatura del inyector 250 °C, temperatura del detector 280 °C. Programa de temperatura: 50 °C – 1 min, 25 °C/min hasta 175°C, 4 °C/min desde 175 °C hasta 230 °C, 230 °C – 15 min. Se utilizó un estándar externo marca Supelco 37 Component FAME Mix. La determinación cuantitativa de ácidos grasos C18:2 y 18:3 en los complejos se realizó mediante la comparación de áreas de las muestras con respecto a los patrones de ésteres metílicos de ácido linoleico y linolénico de concentración conocida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.5. Difracción de rayos-X (DRX)

Las determinaciones de difracción de rayos-X se llevaron a cabo con un difractómetro de polvos Phillips PW 3710. Las condiciones de operación fueron: radiación $\text{CuK}\alpha_1$, voltaje 40 kV y una corriente de 40 mA. Las muestras fueron sometidas a un barrido en un rango de 5 – 35° (2 θ) en etapas de 0,02° cada 2 segundos.

2.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los ensayos de DSC se llevaron a cabo en un calorímetro MDSC Q-200 (TA Instruments; New Castle, DE, USA). Para ello, se prepararon suspensiones de los polvos en agua destilada (1:4 complejo/agua), se pesaron aproximadamente 10 mg en cápsulas de aluminio usando una balanza analítica Mettler AE 240 ($\pm 0,01$ mg), se cerraron herméticamente y se dejaron reposar durante 24 h. Para obtener los termogramas de DSC, las muestras se equilibraron 1 min a 20 °C y luego se calentaron hasta 150 °C a una velocidad $\beta = 5$ °C/min, empleando una cápsula de aluminio vacía como referencia. El análisis de los resultados se hizo a través del software TA Universal Analysis 2000.

2.7. Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR)

Se colocaron aproximadamente 5 mg de cada muestra en el portamuestras de un espectrómetro FTIR-ATR Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, MA, USA). Los espectros se registraron en un rango comprendido entre 4000 – 500 cm^{-1} , 64 escaneos con una resolución espectral de 4 cm^{-1} , usando el software OMNIC (versión 8.3, Thermo Scientific, MA, USA).

2.8. Análisis estadístico

Los análisis se hicieron por duplicado y los resultados se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) usando el software estadístico Statgraphics. Se aplicó el test de Tukey ($p \leq 0,05$) para la comparación de medias.

3. Resultados y discusión

3.1. Hidrólisis enzimática

El objetivo de la hidrólisis fue obtener moléculas más simples (ácidos grasos libres) a partir de los triacilglicerolos del aceite de chía. Los ácidos grasos, mono y diacilglicerolos se pueden complejar con la amilosa, no siendo así el caso de los triacilglicerolos (Eliasson, 1994).

La reacción de hidrólisis del aceite de chía presentó un comportamiento sigmoideal en función del tiempo: durante la primera hora se observó un rápido incremento del grado de hidrólisis y al cabo de 4 – 5 h se registraron valores constantes en el tenor de ácidos grasos libres. La reacción se detuvo luego de transcurridas 5 h, momento en el que se alcanzó un 78 % de ácidos grasos libres (expresados como ácido oleico). La efectividad hidrolítica de la lipasa de *Candida rugosa* fue previamente informada (Freitas, 2007) y podría atribuirse al hecho de ser una enzima no específica, es decir, dicha enzima cataliza

la hidrólisis de los triacilglicerol de modo aleatorio, sin mostrar especificidad en relación a la posición en la que los ácidos grasos se hallan esterificados en la molécula de glicerol.

La fracción lipídica obtenida luego de la extracción con hexano presentó un contenido relativo de 65 y 18 % en ácidos linolénico (C18:3) y linoleico (C18:2), respectivamente. Este hecho denota que la hidrólisis no modificó el perfil de ácidos grasos respecto del aceite inicial y el hidrolizado obtenido pudo utilizarse como fuente de ácidos grasos omega-3 y omega-6 en la posterior etapa de complejación.

3.2. Rendimiento y contenido de ácidos grasos C18:2 + 18:3

En la Tabla 1 se puede apreciar que el rendimiento másico de los complejos obtenidos bajo las distintas condiciones operativas (T, t) estuvo comprendido entre 62 y 72 %, con un contenido de 18:2 + 18:3 de 2,5 – 3,8 %. Estudios previos obtuvieron rendimientos de ~52 %, con un contenido de ácidos grasos igual a 2 – 3,5 % (complejos preparados bajo el método alcalino con ácido linoleico conjugado como ligando) (Lalush, 2005).

Tabla 1. Rendimiento másico del proceso de complejación amilosa-ácidos grasos poliinsaturados de chí a distintos tiempos y temperaturas de cristalización

Temperatura (°C)	tiempo (h)	Rendimiento másico % (g complejo/g almidón + g ácidos grasos)	C18:2 + 18:3 (g/100 g complejo)
50	2	69,4±0,2 ^{ab}	2,5±0,4 ^a
	6	72,1±1,1 ^b	3,3±0,0 ^{ab}
70	2	66,7±3,5 ^{ab}	2,8±0,0 ^a
	6	67,0±1,6 ^{ab}	3,2±0,1 ^{ab}
90	2	62,5±3,2 ^a	3,1±0,0 ^{ab}
	6	62,9±1,8 ^a	3,8±0,0 ^b

Se observó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) del rendimiento en función del aumento de la temperatura de cristalización, mientras que el factor tiempo no tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p > 0,05$).

El contenido de C18:2 + 18:3 en el producto final mostró una tendencia creciente a medida que se incrementaron tanto el tiempo como la temperatura de cristalización, principalmente desde 50 a 90 °C. Esta tendencia también fue observada por Seo (2015) para complejos amilosa-ácido linoleico y amilosa-linolénico. Esto puede deberse a que el incremento de la temperatura aumenta la movilidad de las cadenas de almidón favoreciendo su contacto con las moléculas de ácidos grasos, lo que facilita la formación de los complejos de inclusión (Seo, 2015).

3.3. Difracción de rayos-X

En la Figura 1 se pueden visualizar los difractogramas obtenidos para los distintos complejos de inclusión. En el caso del almidón de maíz de alta amilosa Hylon VII en su forma nativa se obtuvo un patrón típico de B-amilosa, con un pico de mayor intensidad situado a $\sim 17^\circ$ (2θ) y otros menores a $\sim 19,7$ y $\sim 22^\circ$ (Fig. 1.a). Este patrón coincide con el publicado por Lesmes (2008).

Los complejos preparados a los distintos tiempos (2 y 6 h) y a las tres temperaturas de cristalización (50, 70 y 90 °C) mostraron patrones de difracción distintos al del almidón nativo, con dos picos principales situados alrededor de ~ 13 y $\sim 20^\circ$ y uno de menor intensidad a $\sim 7,5^\circ$ (2θ), típicos de la forma V-amilosa. Los difractogramas de las muestras preparadas bajo las diferentes condiciones experimentales fueron similares entre sí, por lo que sólo se muestran los correspondientes a 2 h de cristalización a las distintas temperaturas.

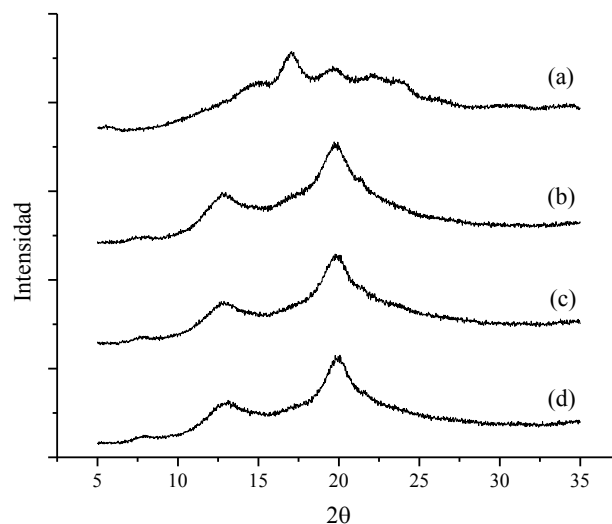


Figura 1. Patrones de difracción de rayos-X de: (a) almidón de maíz de alta amilosa nativo y (b) complejos preparados durante 2 h a 90 °C, (c) 70 °C y (d) 50 °C.

La formación de complejos amilosa-ácidos grasos insaturados fue previamente confirmada por distintos autores (Karkalas, 1995; Lalush, 2005; Seo, 2015), quienes emplearon ácidos grasos puros (comerciales) como ligando. En nuestro caso, el material a encapsular (hidrolizado de aceite de chía) consiste en una mezcla de ácidos grasos compuesta principalmente por ácidos linolénico y linoleico además de otros ácidos grasos minoritarios. Si bien su composición es más compleja, el material hidrolizado confirmó la formación de un patrón de tipo-V con la amilosa.

3.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se evaluó el efecto de las distintas condiciones de tiempo y temperatura de cristalización sobre las propiedades térmicas de los complejos. Los termogramas obtenidos (Figura 2) presentaron una única endoterma, con una temperatura de pico (T_p) comprendida entre 86 y 94 °C y una entalpía promedio de ~ 8 J/g (b. s.). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las entalpías obtenidas bajo las distintas condiciones experimentales. Las T_p de los complejos estuvieron en el rango de temperaturas informadas en la literatura para complejos amilosa-lípidos (Karkalas, 1995; Lalush, 2005) Se encontró un efecto significativo ($p \leq 0,05$) de la temperatura y del tiempo de cristalización así como de la interacción entre ambos factores. Los complejos de inclusión obtenidos a 90 °C – 2 h y 90 °C – 6 h presentaron los mayores valores de T_p .

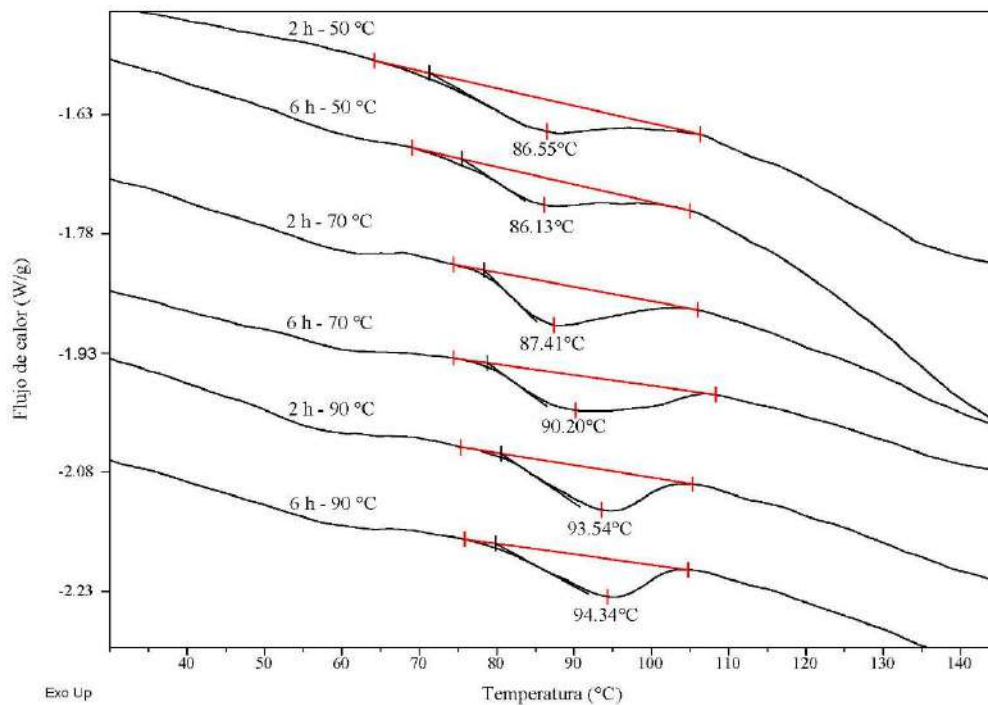


Figura 2. Termogramas de DSC de los complejos de inclusión amilosa-lípidos obtenidos a distintas condiciones operativas (t, T).

El efecto de la temperatura de reacción en la T_p de complejos amilosa-lípidos ha sido informado por varios autores (Karkalas, 1995; Seo, 2015; Marinopoulou, 2016). A bajas T hay una rápida velocidad de nucleación dando origen a un acomodamiento aleatorio de las cadenas helicoidales favoreciendo la formación de polimorfos tipo I (de menor T_p), mientras que a altas T la velocidad de nucleación es lenta promoviendo la formación de estructuras más ordenadas (tipo II, con mayor T_p) (Biliaderis, 1989). En la Figura 2 se puede observar que los termogramas están compuestos por una única endoterma amplia

no pudiéndose realizar una distinción entre polimorfos I y II. Dado que el material hidrolizado está compuesto por una mezcla de ácidos grasos y teniendo en cuenta que la T_p de los complejos amilosa-lípido varía con el grado de insaturación (Karkalas, 1995), la amplitud de las endotermas observada en la Fig. 2 podría atribuirse a una superposición de picos cuyas T_p son muy cercanas entre sí.

3.5. Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR)

El aceite de chía, el material hidrolizado, el almidón con alto tenor de amilosa y los complejos de inclusión obtenidos fueron analizados por FTIR-ATR. En la Figura 3.a (espectro del aceite de chía) se puede apreciar un pico principal situado a 1742 cm^{-1} asociado al enlace éster. Cuando se lo compara con el hidrolizado, se verifica la desaparición de este pico y la aparición de uno a 1707 cm^{-1} , originado por el grupo carboxilo de los ácidos grasos liberados en la reacción enzimática. Los complejos obtenidos bajo las distintas condiciones experimentales arrojaron espectros similares entre sí, por lo que sólo se muestra el correspondiente a 2 h - $90\text{ }^\circ\text{C}$. En el mismo puede observarse aún presente el pico de 1707 cm^{-1} , aunque con una intensidad mucho menor, indicando la presencia del grupo carboxilo de los ácidos grasos en los complejos (Figura 3.c).

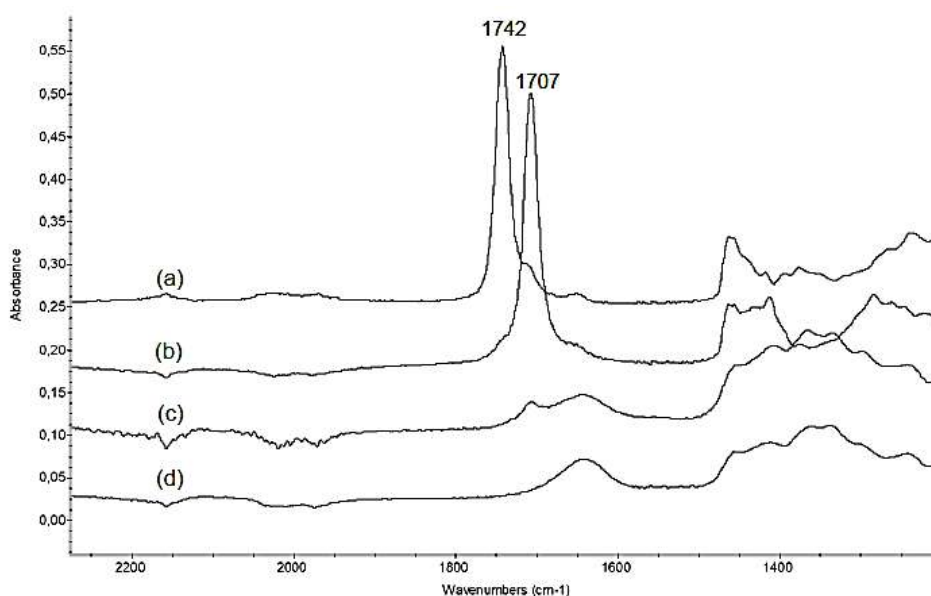


Figura 3. Espectros de FTIR-ATR de: (a) aceite de chía, (b) hidrolizado, (c) complejo amilosa-lípido preparado 2 h a $90\text{ }^\circ\text{C}$ y (d) almidón de maíz con alto contenido de amilosa.

4. Conclusiones

A partir del presente trabajo se han obtenido complejos de inclusión de amilosa-lípidos, con un importante contenido de ácidos grasos omega-3 y 6 provenientes del aceite de

chía. La temperatura de cristalización fue el parámetro que presentó una mayor influencia en las características finales de los complejos de inclusión obtenidos. Las propiedades térmicas de dichos complejos evidenciaron T_p superiores a 86 °C lo que sugiere que los mismos podrían constituir un sistema de provisión de ácidos grasos omega-3 y omega-6 para su incorporación en alimentos sometidos a tratamiento térmico.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a Andrés Márquez (UNQ) y Mariela Fernández (CETMIC) por su asistencia técnica, a Solazteca SDA S.A. e Ingredion Inc. por el aceite de chía y el almidón de maíz, respectivamente. Asimismo este trabajo fue realizado mediante el financiamiento de los Proyectos PICT 2016 0323 (ANPCyT) y UNLP X-756.

6. Referencias

- Biliaderis, C. G.; Galloway, G. (1989). Crystallization behavior of amylose-v complexes: Structure-property relationships. *Carbohydrate Research*, (189), 31 – 48.
- Eliasson, A. (1994). Interactions between starch and lipids studied by DSC. *Thermochimica Acta*, (246), 343 – 356.
- Freitas, L.; Bueno, T.; Perez, V. H.; Santos, J. C.; Ferreira de Castro, H. (2007). Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. *World J Microbiol Biotechnol*, (23), 1725 – 1731.
- Karkalas, J.; Ma, Sx.; Morrison, W.; Pethrick, R. (1995). Some factors determining the thermal properties of amylose inclusion complexes with fatty acids. *Carbohydrate Research*, (268), 233 – 247.
- Lalush, I.; Bar, H.; Zakaria, I.; Eichler, S.; Shimoni, E. (2005). Utilization of Amylose-Lipid Complexes as Molecular Nanocapsules for Conjugated Linoleic Acid. *Biomacromolecules*, (6), 121 – 130.
- Lesmes, U.; Barcheath, J.; Shimoni, E. (2008). Continuous dual feed homogenization for the production of starch inclusion complexes for controlled release of nutrients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, (9), 507 – 515.
- Marinopoulou, A.; Papastergiadis, E.; Raphaelides, S.; Kontominas, M. (2016). Structural characterization and thermal properties of amylose-fatty acid complexes prepared at different temperatures. *Food Hydrocolloids*, (58), 224 – 234.
- Seo, T.; Kim, J.; Lim, S. (2015). Preparation and characterization of crystalline complexes between amylose and C18 fatty acids. *LWT – Food Science and Technology*, (64), 889 – 897.