

EXTRACCION DE ACIDO FERULICO A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA CERVECERA: BAGAZO DE CERVEZA

Bucci Paula²; Santos María Victoria^{1,2}; Zaritzky Noemí^{1,2}

1. Depto de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de La Plata

2. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos – Universidad Nacional de la Plata – Facultad de Ciencias Exactas (CIC, CONICET, UNLP), La Plata 47 y 116 /n. CP1900. *buccipaula@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El bagazo de cerveza (en inglés Brewers' Spent Grain BSG) es el subproducto más abundante de la industria cervecera y representa el 85% del total de los residuos generados. El gran volumen que se genera de este subproducto, su bajo costo, y sus componentes lo convierten en un recurso de alto potencial para su reciclado y/o aprovechamiento. Se producen entre 17 y 23 kilos de BSG por hectolitro de cerveza producida. Actualmente, el BSG se destina mayormente a la alimentación de ganado o en algunos casos al abono de tierras de cultivo. Su contenido de humedad está en el rango de 77-81%; su precio en el mercado internacional de BSG para alimentación animales es de aproximadamente 35 Euros/ton. El BSG se produce en grandes cantidades durante todo el año y especialmente en zonas urbanas donde se localizan las cervecerías industriales y artesanales convirtiéndose en un problema a causa de su rápida descomposición.

El BSG es un material lignocelulósico que consiste en el pericarpio de la cáscara y capa de la cubierta que cubre el grano de cebada original. Durante el macerado se extraen los azúcares y sustancias solubles por lo que el contenido de almidón es bajo dependiendo del régimen de elaboración utilizado (Mussatto, Dragone, Roberto, 2006). BSG es una sustancia heterogénea, esto se debe a un número de factores, como la variedad de cereal, el momento de la recolección, el tipo de lúpulo agregado, el régimen de malteado y macerado, y si se emplearon no adjuntos durante la elaboración (Steiner, Procopio, Becker, 2015); sin embargo, el muestreo dentro de la cervecería ha demostrado que BSG es bastante homogéneo (Santos, et al 2003).

Este subproducto es básicamente un material lignocelulósico, donde los principales componentes son la fibra (proveniente de la hemicelulosa y celulosa), proteína y lignina (Xiros y Christakopoulos, 2012). La fibra constituye aproximadamente la mitad de la composición de BSG en peso seco, mientras que las proteínas pueden constituir hasta un 30%. Este alto contenido de fibra y proteína hace que el BSG sea una materia prima sumamente interesante para una gran cantidad de aplicaciones.

La hemicelulosa consiste principalmente en arabinoxilano (el constituyente principal del BSG hasta un nivel del 40% en peso seco) y está unida a la fibrillas de celulosa (Mandalari y col, 2005). Ácidos fenólicos como por ejemplo el ácido ferúlico (AF) funcionan como agente de entrecruzamiento entre la lignina, (polímero polifenólico) y la hemicelulosa a través de enlaces éter (Mendis y Simsek, 2014). Asimismo, el ácido ferúlico se encuentra unido a cadenas arabinoxilano presentes en la hemicelulosa mediante enlaces éster (Mandalari y col. 2005). Los materiales ricos en hemicelulosa pueden hidrolizarse por varios procesos, entre las cuales la hidrólisis alcalina se destaca como una de las más eficientes para liberar ácidos fenólicos, disolviendo la lignina (Fengel y Wegener, 1989) y permitiendo la utilización completa de los materiales lignocelulósicos con un bajo impacto ambiental (Xiao et al.al., 2001).

Los compuestos fenólicos, son de interés considerable para los científicos, fabricantes y consumidores, debido a su influencia en la calidad de los alimentos, y su acción preventiva en enfermedades crónicas (Shahidi y Naczki, 2004). Los ácidos fenólicos, como el ferúlico, están presentes mayoritariamente en la cáscara externa.

El ácido ferúlico (AF), es uno de los ácidos fenólicos con mayor presencia en el BSG (Bartolome et al., 1997, 2003) y tiene funciones fisiológicas, las cuales no sólo incluyen propiedades antioxidantes en respuesta a los radicales libres, sino que también tiene propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antitrombóticas, anticancerígenas, protege contra enfermedades coronarias, reduce el colesterol e incrementa la viabilidad de los espermatozoides (Ou y Kwok, 2004). Debido a todas estas propiedades, actualmente es uno de los compuestos más investigados por sus aplicaciones en los alimentos, la salud, cosméticos e industrias farmacéuticas (Kroon y Williamson, 1999). El AF no se produce en el país por lo que debe importarse y además tiene un costo sumamente elevado el cual ronda alrededor de los US\$700/100gr AF.

La nanotecnología se define como el campo de las ciencias aplicadas dedicado al control y manipulación de la materia a una escala menor que un micrómetro. En este contexto nacen los nanosistemas de liberación de sustancias químicas, como son los liposomas ultradeformables unilamerales que, formados por estructuras nanométricas, logran transportar principios activos a diferentes partes del cuerpo humano gracias a la posibilidad de sufrir deformaciones a temperatura ambiente. Los liposomas son pequeñas vesículas esféricas constituidas por una o varias bicapas fosfolipídicas concéntricas que encierran un igual número de compartimientos acuosos, utilizadas en muchas áreas diferentes de la ciencia y la tecnología (Maierhofer, 1988 y Gregoriadis, 1990). La versatilidad de los liposomas se refleja tanto en su arquitectura, en sus propiedades físicas, en la carga superficial, el tamaño, la permeabilidad/la rigidez de la pared como en la capacidad de su carga (Sessa G, 1968). Los liposomas tienen una tendencia natural a ligarse a determinados tejidos y células, cualidad que puede ser aprovechada para incrementar al máximo la eficacia terapéutica del fármaco administrado, como puede ser el AF y reducir al mínimo los efectos sistémicos no deseados. Además, constituyen un medio útil para proteger productos lábiles biológicamente activos, y asimismo las dosis eficaces de un fármaco se pueden reducir de forma muy marcada cuando se administra en una formulación liposomal (Maierhofer G, 1988).

El objetivo del presente trabajo es obtener un producto de alto valor agregado (ácido ferúlico) aprovechando las grandes cantidades de BSG que se producen anualmente en zonas urbanas. Se estudiará una alternativa de procesamiento de este subproducto cervecero con el fin de evitar los problemas ambientales que provoca su rápida descomposición. Se evaluará el rendimiento y pureza del AF obtenido mediante la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y se demostrará que es posible su encapsulación en un nanosistema, como son los liposomas ultradeformables unilamelares, con el fin de proteger el AF obtenido, para una futura aplicación cosmeceútica.

PARTE EXPERIMENTAL

Extracción del AF: Se siguieron los protocolos descritos en Mussatto et al (2005) y Mussatto et al (2007b) para la extracción del AF. La técnica consiste en un tratamiento de la materia prima a utilizar (BSG) a partir de un secado a 60°C hasta lograr un 10% de humedad como máximo, con el fin de evitar la descomposición del BSG debido a que el alto contenido de humedad y la composición de este subproducto hacen que sea una materia prima muy susceptible de ser degradada por microorganismos. La humedad se determinó por diferencia de peso seco en estufa a 60°C, hasta obtener peso constante < 0.001 g.

Una vez estabilizado el residuo se realizó un tratamiento con tolueno-etanol con el fin de eliminar los materiales cerosos. Luego se evaluaron dos procesos de extracción: uno de ellos consistió en un pretratamiento ácido seguido de un tratamiento básico fuerte, mientras que el otro consistió en una extracción con una base fuerte a elevadas temperaturas.

Respecto al primero de estos procedimientos (experimento 1) se utilizó ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 72% p/p con el objetivo de aumentar la porosidad del material para que difunda y se impregne en el siguiente paso el hidróxido de sodio (NaOH) que solubiliza la lignina y los restos de hemicelulosa. El segundo método de extracción (experimento 2) consistió en tratar el BSG directo con una base fuerte (NaOH , 1M) durante un tiempo de 30 minutos a elevada temperatura, luego se procedió a concentrar la solución y adicionar etanol para con el fin de precipitar la hemicelulosa, posteriormente se filtró la solución y se evaporó en rotavapor el etanol. El siguiente paso consistió en precipitar la lignina con ácido sulfúrico 0,1 M y finalmente el filtrado se trató con cloroformo/metanol (3:1) evaporándose el metanol nuevamente en rotavapor.

Cuantificación del AF: Se llevó a cabo una cuantificación por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un detector UV (a 276 nm) y una columna C18 (3,9 mm x 300 mm). Las muestras fueron filtradas por una membrana 0,45 μm e inyectadas en el cromatógrafo (Detector: Waters 2998 y Bomba: Waters 1525) bajo las siguientes condiciones operativas: temperatura ambiente, como solvente se utilizó acetonitrilo/agua (1/8 con 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido acético, ajustándose el pH a 2,5 con la adición de H_3PO_4), el volumen de inyección fue de 20 μL y la velocidad de flujo utilizada fue de 0,9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

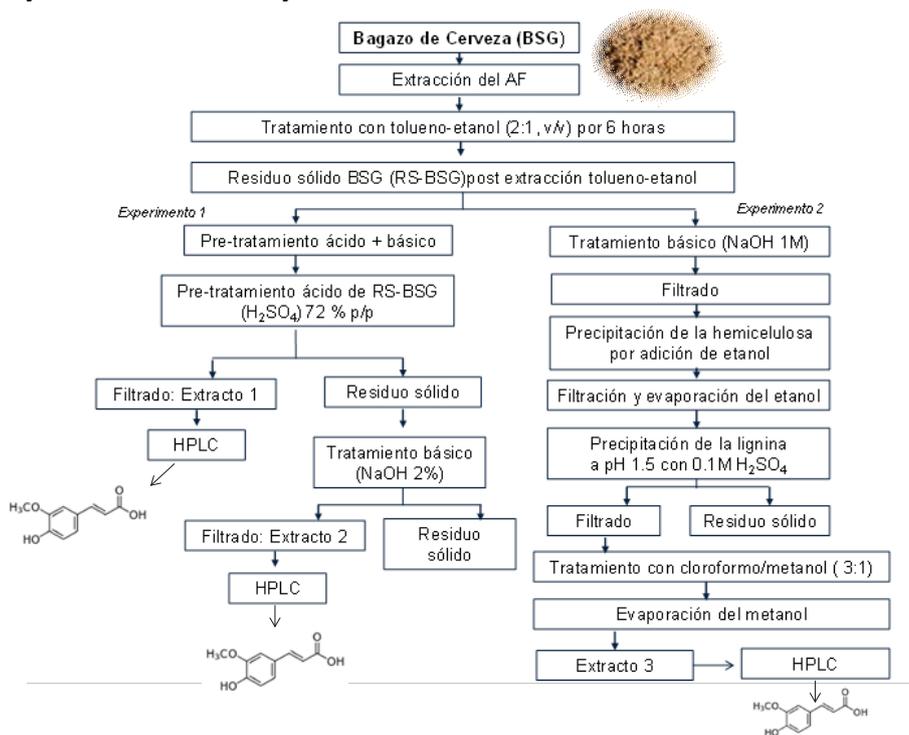


Figura 1: Esquema sobre los métodos de extracciones del AF

Desarrollo y caracterización de la formulación liposomal ultradeformable (UL)

Preparación de los liposomas: Los liposomas ultradeformables unilamelares fueron preparados a partir de una mezcla de Fosfatidilcolina de Soja (SPC, "soyphosphatidylcholine") y Colato de sodio (ColNa) en una proporción 6:1 p/p suspendida en Cloroformo:Metanol (1:1, v/v). Luego, los solventes orgánicos fueron evaporados en rotavapor a 40°C y 190 rpm obteniéndose una película delgada lipídica en la

pared del balón. El film lipídico se hidrató con una solución de 12,85 ppm de AF (40 mg de SPC por ml de solución de rehidratación). Finalmente, la suspensión liposomal obtenida fue sometida a agitación ultrasónica, donde se realizaron 3 ciclos de 30 segundos a 10.000 W con sonicador de punta (Chiaramoni, Ns y otros, 2009) (entre cada ciclo se descansó un tiempo de 30 segundos) con el fin de reducir el tamaño y la lamelaridad (bicapas lipídicas).

Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z: El tamaño promedio de los liposomas fue medido por dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering) en un equipo Nanopartica SZ-100 series, Horiba, Japón; las medidas se realizaron por triplicado. Las mediciones de potencial ζ se realizaron en el mismo equipo una temperatura de 25°C (por triplicado).

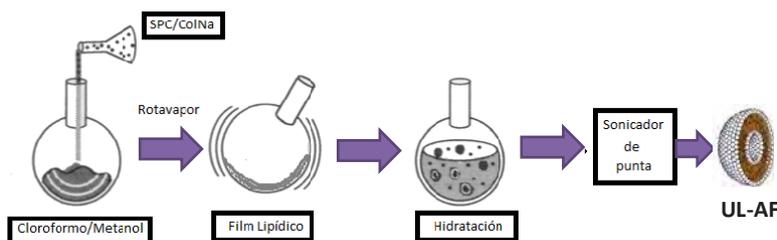


Figura 2: Proceso de elaboración de liposomas ultradeformables unilamelares encapsulados con AF (UL-AF)

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Cuantificación del AF: Los resultados obtenidos siguiendo el método del experimento 1 revelaron la presencia del AF a partir del uso de la técnica cromatográfica HPLC, en los dos extractos obtenidos del residuo de BSG sólido (figura 1). En la Fig. 3a se muestra el espectro del patrón de ácido ferúlico. En la figura 3b se demuestra la presencia del AF de extracto 1 correspondiente al filtrado obtenido luego del pre-tratamiento ácido del BSG, visualizándose un pico a $R_t = 22,030$ min. Asimismo, en la figura 3c se observa nuevamente la presencia del AF en el extracto 2 obtenido luego de la extracción alcalina, representado con un pico más intenso en el cromatograma a $R_t 21,877$.

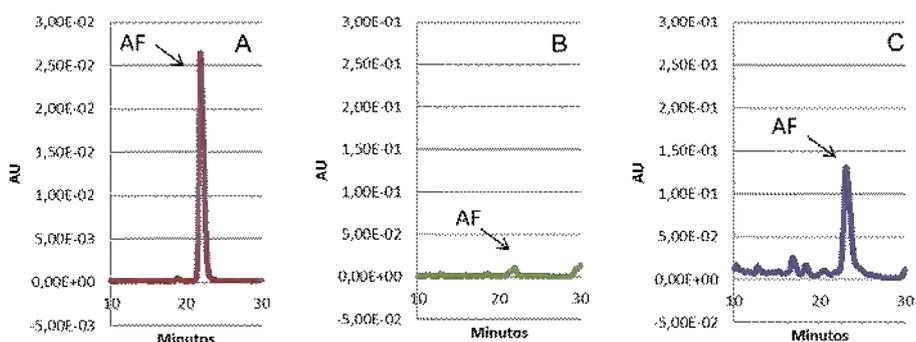


Figura 3: Cromatograma HPLC del ácido ferúlico utilizando un detector UV a 276 nm y una columna C18. a) estándar de AF b) extracto 1 ácido BSG c) extracto 2 de alcalino de BSG.

La concentración de AF fue determinada en base a la curva de calibración de las áreas bajo la curva obtenidas por HPLC usando diferentes concentraciones del patrón de AF.

El rendimiento del proceso de extracción siguiendo el Experimento 1 fue de 21,85 mg AF/100 gr BSG en base seca (teniendo en cuenta los rendimientos individuales de los extractos 1 y 2).

Respecto a la metodología utilizada en el experimento 2 (Figura 1), en los cromatogramas obtenidos para el extracto 3 no se observó ningún pico (cromatogramas no mostrados) que haga referencia a la presencia de AF en este extracto. Por ende, este segundo método estudiado no fue considerado adecuado para la extracción de AF a partir del BSG. Se han planteado dos posibles alternativas por las cuales la metodología seguida en el Experimento 2 podría no ser adecuada. Una de ellas está relacionada con que probablemente el tratamiento básico (sin un previo tratamiento ácido) no permita la solubilización de la hemicelulosa evitando que el ácido ferúlico unido a esta estructura quede disponible para ser extraído por hidrólisis alcalina. La otra hipótesis sugiere que el tratamiento con una base fuerte a elevadas temperaturas sea destructivo para la muestra a analizar.

Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z: El AF obtenido por el experimento 1, fue encapsulado en un transportador liposomal ultradeformable unilamelar (UL), al cual se le realizaron análisis de dispersión de luz dinámica (Figura 4) y potencial ζ , con el fin de evaluar el tamaño y la carga superficial del mismo. Las medidas se realizaron por quintuplicado. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 1. Para las moléculas y partículas que son suficientemente pequeñas como los UL que tienen un tamaño nanométrico de 180,2 nm un potencial zeta alto predice estabilidad, es decir indica que la solución o dispersión se resiste a la agregación (está estabilizado por repulsión electrostática).

Tabla 1: DLS y potencia Z de los UL con AF encapsulado

Formulaciones liposomales	UL-AF
Diámetro promedio (nm)	180,2
Desvío Estándar (nm)	$\pm 15,7$
Polidispersión	2,13
Potencial ζ (mV)	-12,5

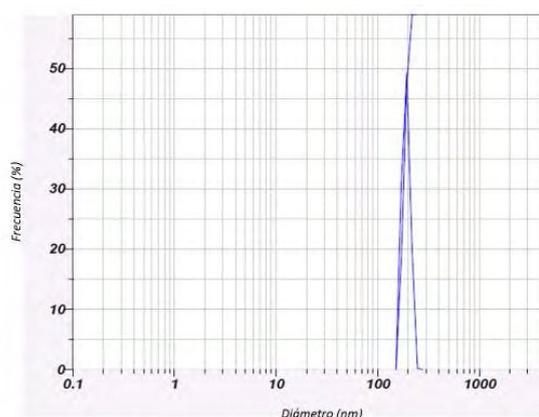


Figura 4: DLS de los UL-AF

CONCLUSIONES

El Experimento 1 fue el que mejor resultados arrojó para la extracción del AF, en comparación con el experimento 2, no detectando AF en el extracto por HPLC.

La mejor efectividad en la extracción de AF observada en el experimento 1 puede atribuirse a que la utilización del ácido sulfúrico en una primera etapa permite disponibilizar en gran proporción la lignina presente en el BSG, produciendo un aumento en la porosidad del material (BSG) para que posteriormente pueda impregnarse el hidróxido de sodio (NaOH) con el fin de solubilizar la lignina junto los restos de hemicelulosa, donde se encuentra unido el AF a extraer, y así permitir la liberación de este ácido.

Se observó una importante concordancia entre el pico obtenido en el cromatograma de HPLC del patrón de AF y los extractos de AF obtenidos (extracto 1 y 2) lo cual indica que efectivamente el producto extraído es AF.

Asimismo, se demuestra que es posible encapsular la droga obtenida en un transportador liposomal ultra deformable, con un tamaño nanométrico y una carga superficial adecuada, indicando una correcta estabilidad de la suspensión liposomal. Esta propiedad es

sumamente importante al momento de almacenar las suspensiones por distintos períodos de tiempo, impidiendo agregaciones de mayor tamaño.

Por lo tanto, se logró obtener un producto de alto valor agregado a partir de BSG, como el AF, el cual no se produce en el país. Asimismo se demostró que es posible su encapsulación en liposomas ultradeformables unilamelares, con potencial aplicación en la industria cosmecéutica.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Bartolomé, B., Faulds, C.B., Williamson, G., 1997. Enzymic release of ferulic acid from barley spent grain. *J. Cereal Sci.* 25, 285–288.
- Bucci, P.; Prieto, M.J; Milla, L; Calienni, N; Martinez, L; Rivarola, V; Alonso, S; Montanari, J., 2017. Skin penetration and UV-damage prevention by nanoberries *Cosmetic Dermatology*. DOI: 10.1111/jocd.12436.
- Cevc, G.; Blume, G. 1992. Lipid vesicles penetrate into intact skin to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta*-1104, pp 226-232
- Chiarmoni, N.S.; Gasparri, J.; Speroni, L.; Taira, M.C; Alonso, D.V.S. 2009. Biodistribution of liposome/DNA systems after subcutaneous and intraperitoneal inoculation. *Journal of liposome research*. Londres. pp 1-11.
- Copa-Patiño, J.L., 2003. Growth and release of hydroxycinnamic acids from brewer's spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339. *Enzyme Microb. Technol.* 32, 140–144.
- Cruz, J.M., Domínguez, J.M., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2001. Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2459–2464.
- Fengel, D., Wegener, G., 1989. *Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlín.
- G. Cevc, and G. Blume., 1992 Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1104, 1, 226-232,.
- Gregoriadis, G. 1990. Immunological Adjuvants, a role of Liposomes. *Inmunol.* Vol- 11, pp 89-97
- J. Montanari, C. Maidana, M. I. Esteva, C. Salomon, M. J. Morilla, and E. L. Romero., 2010. Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *leishmanibraziliensis* are also leishmanicidal in the dark, *Journal of Controlled Release*, 147, 3, 368-376.
- Lin Sijie, Zhao Yan, Nel André. and Lin Shuo., 2013. Zebrafish: An in vivo Model for nano EHS Studies. *SmallNano Micro*,9, No. 9-10,1608-1618
- Maierhofer, G. 1988. Introducción a una nueva tecnología y descripción de técnicas preparativas. Vol-5, pp 658-680.
- Montanari, J., 2013. *Liposomes Ultradeformables Fotodinámicos contra leishmaniasis Cutánea. Hacia una terapia de aplicación tópica*. Editorial Académica Española, Saarbrücken, Alemania, ISBN-13:978-3-659-07787-6
- Mussatto, S.I., Dragone, G. y Roberto, I.C., 2006. Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, vol. 43, no. 1, pp. 1-14. ISSN 07335210. DOI 10.1016/j.jcs.2005.06.001.
- Ogawa, H.; Yoshiike, T.J. 1993. A speculative view of atopic dermatitis: barrier dysfunction in pathogenesis. *Dermatol Sci.* Vol-5, pp 197-204.
- Ou, S., Kwok, K.-C., 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1261–1269
- Robbins, R.J., 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866–2887.
- Schwarz, T. 2003. Skin immunity. *Br J Dermatol.* Vol 149 (Suppl66), pp 2-4, 2.
- Sessa, G.. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. 1968
- Shahidi, F y Naczki, M., 2004. *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press. Londres. Pp 1-16
- Soares, S.E., 2002. Phenolic acids as antioxidants. *Rev. Nutr.* 15, 71–81.
- Xiao, B., Sun, X.F., Sun, R., 2001. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polym. Degrad. Stab.* 74, 307–319.