



Universidad de la República - CSIC

Formulario de Informe final del Programa de Apoyo  
a la Investigación Estudiantil  
Edición 2014



DATOS DEL PROYECTO	
• Título del Proyecto:	DESARROLLO DE VEHÍCULOS PARA LA ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS PROVENIENTES DE LA MARCELA.
• Número ID del proyecto:	84
• Área de conocimiento:	Tecnológica
• Facultad o Servicio:	Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos -Facultad de Química - UDeLaR
• Nombre completo de los-as Integrantes del equipo:	Valeria Villar - Irina Oten
• Correo electrónico del/de la estudiante referente:	irina.oten@gmail.com
• Nombre completo del/de la docente orientador-a:	Cecilia Abirached
• Correo electrónico del/de la docente orientador-a:	abirached@fq.edu.uy

## INFORME FINAL

(desde ítem 1 a 7 la extensión máxima POR ÍTEM es de una carilla)

### 1) Transcriba los objetivos del proyecto tal cual figuraban en la solicitud financiada

#### Objetivo general

Desarrollar vehículos que permitan proteger y transportar compuestos bioactivos extraídos de la marcela, con el fin de ser utilizados como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales.

#### Objetivos específicos

- a) Extraer, identificar, cuantificar y caracterizar los compuestos bioactivos presentes en extractos acuosos y alcohólicos de marcela.
- b) Desarrollar formulaciones de emulsiones dobles capaces de encapsular extractos de marcela.
- c) A partir de la mejor formulación de emulsiones dobles, comparar su estabilidad y porcentaje de encapsulación con el de liposomas de lecitina y colesterol.

## 2) Enumere y describa las principales actividades desarrolladas en el marco de su proyecto.

### 1- Caracterización de la materia prima:

Se determinó cenizas totales por incineración a 550 °C siguiendo el método AOAC (1999), fibra dietética total por el método enzimático AOAC (1999), humedad por destilación según método Dean-Stark, grasa cruda por extracto etéreo según método AOAC (1999), proteínas totales mediante determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl AOAC (1999) y carbohidratos totales que se estimaron por diferencia, a partir del contenido de los anteriores.

### 2- Obtención de extractos acuosos y alcohólicos de la Marcela.

Los extractos se prepararon en una relación solvente:marcela 10:1, utilizando agua a temperatura de ebullición y etanol 95% a temperatura ambiente.

### 3- Caracterización química de los extractos:

Se determinó el total de compuestos fenólicos de los extractos según el método de Folin Ciocalteu propuesto por Slinkard and Singleton (1977), modificado por Georgé et al. (2005)

### 4- Evaluación de las propiedades bioactivas in vitro de los extractos:

Se evaluó las propiedades bioactivas de los extractos con ensayos de capacidad antioxidante in vitro frente a radicales peroxilo y ABTS.

La capacidad frente a radicales ABTS•+ se determinó mediante el método descrito por Re et al. (1999) y la capacidad frente a radicales peroxilo se realizó por el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), según lo descrito por Ou et al. (2001). La actividad determinada en dichos métodos se comparó con un antioxidante de referencia como es el Trolox normalizando los valores a una escala común.

### 5- Desarrollo y caracterización de formulaciones de liposomas y emulsiones dobles:

Se prepararon liposomas por el método de Hand Shaken utilizando lecitina de soja comercial y colesterol (Sigma Aldrich) en relación 10:4, en medio clorofomo-metanol (2:1 v/v). El tamaño de partícula se determinó por difracción de luz láser y dispersión de luz polarizada mediante el uso de un analizador de partículas Coulter Counter Multisizer (Coulter Electronics Ltd). Las emulsiones dobles se prepararon usando aceite, lecitina, buffer fosfato (pH=7,4), B-lactoglobulina y goma Guar.

### 6- Evaluación de la eficiencia de encapsulación y estabilidad de los liposomas y emulsiones dobles:

La estabilidad global de las emulsiones dobles se evaluaron con un analizador óptico vertical (TurbiScan CLASSIC MA 2000) según lo descrito por Marquez et al. (2007) y mediante el estudio de difusión de NaCl entre las fases acuosas.

La eficiencia de la encapsulación se determinó por la medida del total de los compuestos fenólicos en la fase acuosa de la emulsión según el método de Folin Ciocalteu propuesto por Slinkard and Singleton (1977), modificado por Georgé et al. (2005).

Para los liposomas la eficiencia de encapsulación se evaluó por medida directa de la quercitina. La determinación se realizó a través de la separación de la quercitina encapsulada de la libre, mediante centrifugación a 400 rpm durante 40 min.

3) Indique si se han efectuado todas las etapas planteadas en el cronograma de ejecución del proyecto. En caso de que su cronograma haya sufrido alteraciones o no se haya podido cumplir con todas las etapas definidas en el cronograma, aclare los motivos de tal situación.

Las etapas fueron cumplidas a tiempo como fue especificado en el cronograma de ejecución.

4) Indique los principales resultados obtenidos. Aclare hasta qué punto coinciden - o no - con los resultados esperados por parte del equipo.

#### Caracterización de la Marcela

<u>Componentes</u>	<u>Resultados</u>
Fibra dietética total	(0,142 ± 0,046)%
Lípidos	(3,29±0,14)x10 <sup>-2</sup> g lípidos/g Marcela
Cenizas	(4,8584 ± 0,0023)%
Proteínas	(5,0718± 0,0077)%
Humedad	(0,0665±0,0047)ml/g

#### Obtención de extractos acuosos y alcohólicos

Los extractos se prepararon en una relación solvente:marcela 10:1, utilizando agua a temperatura de ebullición y etanol 95% a temperatura ambiente. Se determinó el rendimiento de ambas extracciones, siendo 4,59% para la acuosa y 23% para la alcohólica.

#### Caracterización química de los extractos y evaluación de las propiedades bioactivas in vitro de los extractos

Se cuantificaron los compuestos fenólicos en ambos extractos mediante el método de Folin, obteniéndose 0,0739 ± 0,0018 mg Ac. Gálico/mg de extracto acuoso, y 0,1522 ± 0,0069 mg de Ac. Gálico/mg de extracto alcohólico, presentando mayor valor significativo ( $\alpha \leq 0,05$ ) en el caso del extracto alcohólico. Se cuantificó la quercitina (Q) en los extractos de marcela mediante HPLC, siendo 0,00198±0,00013 mg Q/mg de extracto acuoso y 0,0889±0,0064 mg Q/mg de extracto alcohólico. Los resultados obtenidos coinciden con lo esperado ya que con la extracción alcohólica se extrae mayor cantidad significativa ( $\alpha \leq 0,05$ ) de Q.

Se midió la capacidad antioxidante global de los extractos de marcela a través de la determinación del IC50. Los resultados obtenidos frente a radicales ABTS según el método descrito Re et al. (1999) fue IC50 de 0,0521±0,0049 mg/ml para el extracto acuoso y, 0,2380±0,0045 mg/ml de extracto alcohólico. Por otro lado, a través de la capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno por el método ORAC descrito por Ou et al., (2001), el IC50 fue de 0,490±0,023 µg Trolox/µg extracto acuoso, y de 1,97±0,20 µg Trolox/µg extracto alcohólico. Por ambos métodos el IC50 fue significativamente mayor para el extracto alcohólico ( $\alpha \leq 0,05$ )

#### Evaluación de la eficiencia de encapsulación y estabilidad de los liposomas

Se separó la quercitina encapsulada en el liposoma de la libre, mediante centrifugación a 4000 rpm durante 40 minutos.

Por diferencia se determinó el porcentaje de encapsulación, siendo este de 99,899 ±0,028 % para el acuoso y, 97,72±0,27 % para el extracto alcohólico. Se obtuvo una mayor encapsulación significativa para el extracto acuoso.

### Evaluación de la eficiencia de encapsulación y estabilidad de emulsiones dobles

Se realizaron emulsiones con aceite y lecitina (3,5 mg/ml), solución 2% de NaCl, solución de  $\beta$ -lactoglobulina (2 mg/ml y buffer utilizado a pH=7,4) y para mejorar su estabilidad se agregó goma Guar en concentraciones de 5 mg/ml y 10 mg/ml. Del análisis de su estabilidad, resultó que las emulsiones sin goma se desestabilizan rápidamente, mientras que para concentraciones de goma de 5 mg/ml y de 10 mg/ml la estabilidad presentada fue mayor. La estabilidad estudiada por difusión de NaCl presentó altos porcentajes de encapsulación, para 5 mg/ml de goma fue de 99,86% y para 10 mg/ml fue de 99,87%. Se observaron las emulsiones dobles mediante un microscopio Nikon Eclipse 80, cámara DS-fi1.

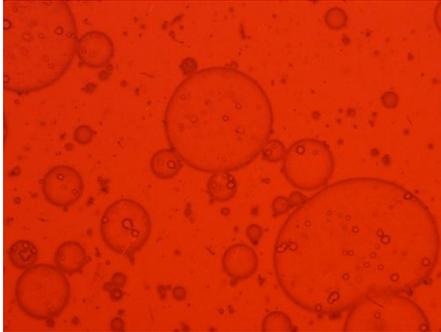


Foto 1, emulsión con marcela, aumento x20

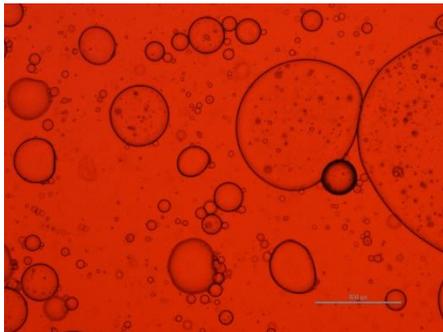


Foto 2, emulsión con marcela, aumento x20

Para la determinación de la eficiencia de encapsulación se cuantificaron los compuestos fenólicos en la fase acuosa de las emulsiones mediante el método de Folin luego de centrifugarlas por 10 minutos. En dicha fase, se obtuvo la presencia total de los polifenoles presentes en la emulsión, de lo que resulta una eficiencia de encapsulación nula. De lo anterior, se puede concluir que las emulsiones dobles como vehículos para la encapsulación de compuestos bioactivos no funcionarían.

**5) Indique si los resultados parciales o finales del proyecto fueron difundidos a través de alguna actividad (charlas, seminarios, talleres, prensa, edición de materiales impresos, etc.).**

Este trabajo será difundido en la presentación del PAIE.

**6) En caso de haber enfrentado dificultades en el desarrollo del proyecto de investigación, realice una breve descripción de las mismas.**

No se presentaron dificultades desde el punto de vista del trabajo de laboratorio o del tratamiento de datos.

7) En base a su experiencia de trabajo en equipo en el marco de este Programa, le solicitamos que realice sugerencias o comentarios para ser tomados en cuenta en futuras ediciones del mismo.

A criterio de este grupo de trabajo las pautas estuvieron bien especificadas desde el comienzo por el equipo de CSIC.

8) **Resumen publicable de no más de 250 palabras** que sea accesible para un público amplio, y en un lenguaje dirigido a no especialistas en la temática de la investigación. En este resumen se debe dar cuenta de los objetivos del proyecto, los pasos seguidos para cumplirlos y los principales resultados alcanzados.

**El resumen debe contener la siguiente información:**

Título del proyecto

Servicio

Nombre de los integrantes del equipo

Nombre del docente orientador

**Resumen publicable:**

## **Desarrollo de vehículos para la encapsulación de compuestos bioactivos provenientes de la Marcela.**

Valeria Villar, Irina Oten, Alejandra Medrano, Cecilia Abirached.

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay.  
2015

### **Resumen**

Se desarrollaron emulsiones dobles y liposomas, para proteger y transportar compuestos bioactivos extraídos de la Marcela, y utilizarlos como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales. En la Marcela se han identificado diversos compuestos bioactivos, como la quercitina, pero al encontrarse en bajas proporciones y ser susceptibles a degradarse, dejan de brindar sus beneficios. De aquí la importancia de encapsularlos para protegerlos y para poder ser absorbidos por el organismo donde cumplirán su acción fisiológica.

Así, se determinó la capacidad antioxidante de la quercitina midiendo la actividad antirradicalaria frente a radicales estables como ABTS (Re et. al. 1999), obteniendo resultados de IC50 de  $0,0521 \pm 0,0049$  mg/ml de extracto acuoso y  $0,2380 \pm 0,0045$  mg/ml de extracto alcohólico; y frente a radicales peroxilo (ORAC) (Ou et. al.2001), siendo el IC50 de  $0,490 \pm 0,023$   $\mu\text{g}$  Trolox/ $\mu\text{g}$  de extracto acuoso y  $1,97 \pm 0,20$   $\mu\text{g}$  Trolox/ $\mu\text{g}$  de extracto alcohólico, lo que demuestra el alto poder antioxidante de la quercitina. Se prepararon liposomas por el método de evaporación de solvente utilizando lecitina de soja y colesterol, y se separó la quercitina encapsulada en ellos mediante centrifugación. Por diferencia, se determinó el porcentaje de encapsulación dando  $99,899 \pm 0,028$  para el extracto acuoso y  $97,72 \pm 0,27\%$  para el alcohólico. También se desarrollaron emulsiones dobles con una alta estabilidad determinada con un analizador óptico vertical según lo descrito por Marquez et al. (2007), y mediante la difusión de NaCl entre las fases acuosas logrando un 98,86% de encapsulación. Se analizaron los polifenoles en la fase acuosa de las emulsiones dobles obteniéndose una encapsulación ineficiente. Por lo tanto, son solo los liposomas buenos vehículos para la protección de compuestos bioactivos.

## **Bibliografía**

AOAC International (1999). Official Method of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington.

Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 1370-1373.

Márquez, A.; Palazolo, G.; Wagner, J. (2007). Water in oil (W/O) and double (W/O/W) emulsions prepared with spans: microstructure, stability and rheology. En: Colloid Polym Sci. 285:1119-1128.

Ou, B., Hampsch-woodill, M., & Prior, R. (2001). Development and Validation of an Improved Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent. En: Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49: 4619-4626.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: Free Radical Biology & Medicine, 26: 1231-1237.

Slinkard K., Singleton V. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. En: Journal Enol, Vitic, 28: 49-55.

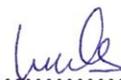
9) En la siguiente tabla ingrese la información solicitada en relación a los **equipos y la bibliografía adquiridos con fondos del PAIE**. Recuerde que debe entregar todos los ítems adquiridos en los dos rubros antes mencionados, para que éstos formen parte del acervo de su institución y puedan ser utilizados por equipos financiados en posteriores ediciones de este programa.

EQUIPOS	
cantidad	Ítem - descripción

BIBLIOGRAFÍA	
cantidad	autor(es), título, editorial, año

Desde el 1/12/2015 y hasta el 15/12/2015 se deberá entregar a los Ayudantes I+D de los Servicios lo siguiente:

- Un CD con el **informe final** en formato .odt o .pdf. Y con el **póster** en su versión digital en formato .jpg o .pdf
- Equipos y bibliografía adquiridos con fondos del PAIE (declarados en la lista conformada en el ítem 8 de este documento)



.....  
FIRMA DEL ESTUDIANTE RESPONSABLE

Se solicita al **docente orientador** que brinde una **opinión general acerca del desempeño de su equipo de estudiantes** durante el transcurso de la investigación y que evalúe en forma breve los **resultados** expuestos a través de este informe y el contenido de su **resumen publicable**. (máx 200 palabras)

**Comentarios del docente orientador:**

El grupo se desempeñó de forma ampliamente satisfactoria durante el transcurso de la investigación tanto en la parte experimental como de interpretación de los resultados. Los resultados obtenidos son correctos de acuerdo al tiempo y a los materiales y equipos disponibles y el resumen publicable refleja correctamente el trabajo realizado.



.....  
FIRMA DEL DOCENTE ORIENTADOR