

XII JORNADA DE FORMACIÓN CIENTÍFICA Y EMPRESARIAL

Agroindustria, un mundo de oportunidades



Alimentos funcionales: fitoesteroles y nanoemulsiones

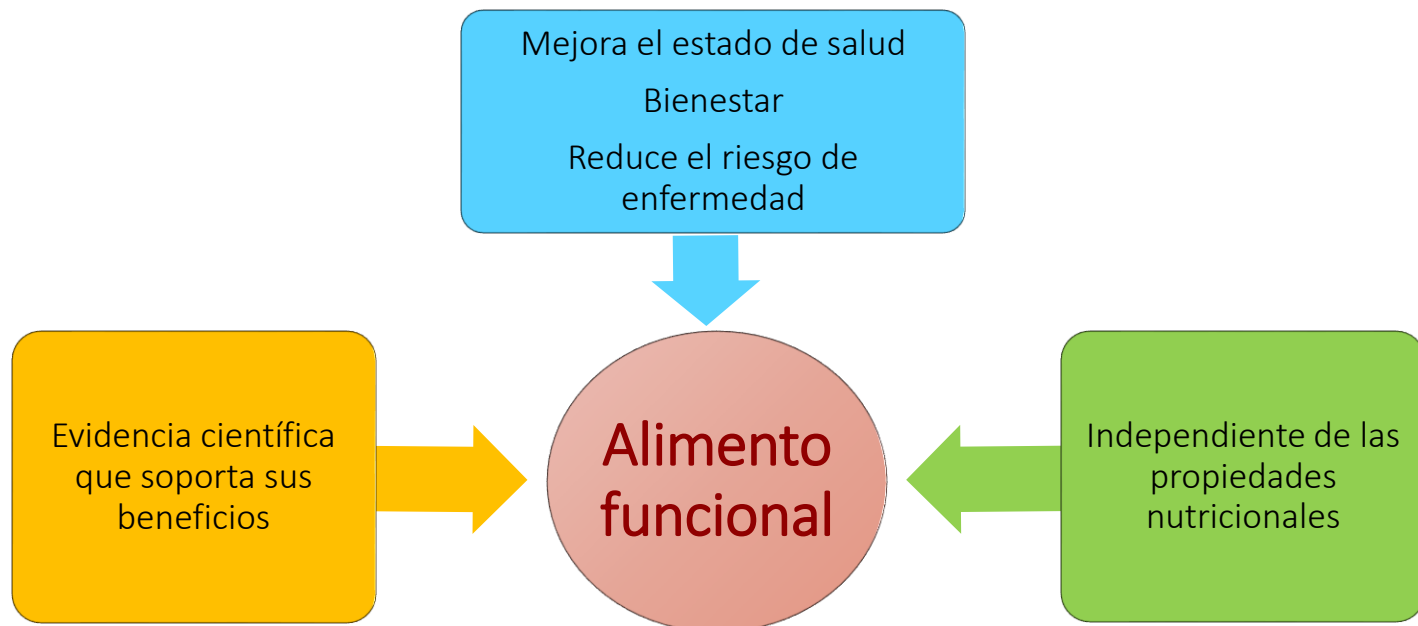
MSc. IBQ, I.Q. Maria Victoria Acevedo Estupiñan



Marzo de 2019

Alimentos funcionales

“Un alimento puede considerarse funcional cuando **se demuestra** adecuadamente que, **además de sus efectos nutritivos**, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de forma que **mejora su estado de salud o bienestar o reduce el riesgo de enfermedad**” Comisión Europea, 1999



Alimentos funcionales

Alimento natural o modificado así

- Mejora de uno de sus componentes con condiciones especiales de cultivo
- Añadir un componente para que produzca beneficios.
- Eliminar un componente para que produzca menos efectos adversos
- Modificar químicamente alguno de sus componentes.
- Aumentar la biodisponibilidad de uno o más componentes
- Combinaciones de las anteriores.



Alimentos funcionales en el mundo

FUNCTIONAL FOOD EXAMPLES - PROBIOTICS



FUNCTIONAL FOOD EXAMPLES - HIGH FIBRE AND WHOLE/MULTIGRAIN



FUNCTIONAL FOOD EXAMPLES - OMEGA -3 - AUSTRALIA



FUNCTIONAL FOOD EXAMPLES - FUNCTIONAL WATERS



FUNCTIONAL FOOD EXAMPLES - SUPERFRUITS, SUPERFOODS, ANTIOXIDANTS



FUNCTIONAL FOOD EXAMPLES - OMEGA-3



FUNCTIONAL FOOD EXAMPLES - CHOLESTEROL ABSORPTION



FUNCTIONAL FOOD EXAMPLES - BEAUTY FOODS - COSMECEUTICALS



...y en Colombia?

Los más comunes son:

- Fortificados: añadir vit y minerales.
- Eliminar colesterol y azúcar



INGREDIENTES Y TENDENCIAS DE COMIDA EN COLOMBIA

Si nosotros
no lo vemos..
Otros si lo
ven...



SE EVITAN:



LAS MÁS SEGUIDAS:



PERO SE INTENTAN INCLUIR:

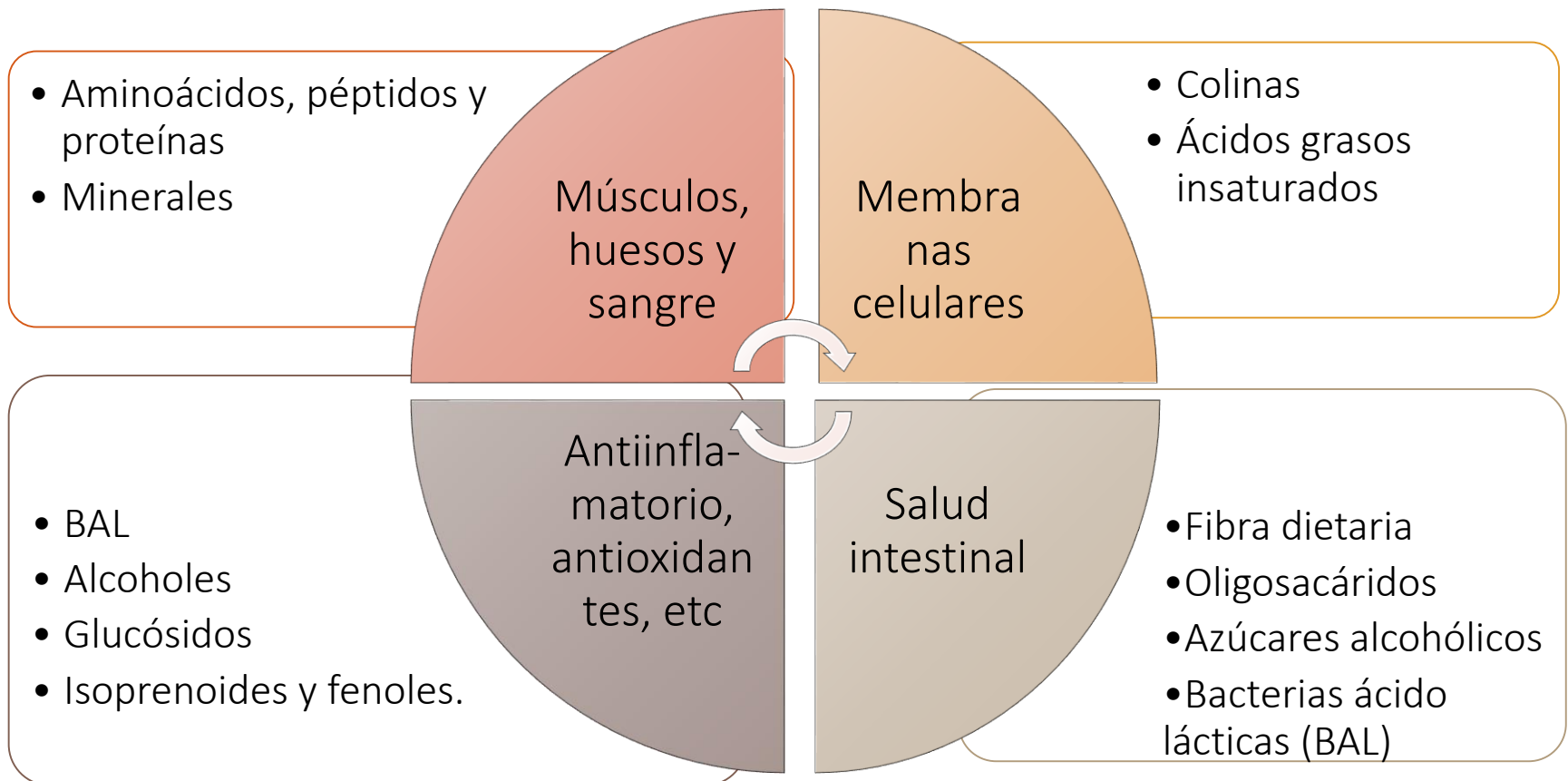


En el **42%** de los hogares colombianos, alguien sufre de **una alergia o intolerancia** a algún alimento

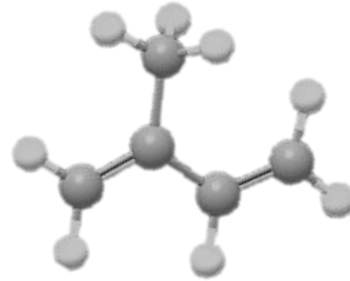
28% Intolerancia a la **LACTOSA**
LA MÁS COMÚN

Alimentos funcionales

Funciones fisiológicas y clasificación de los ingredientes activos (compuestos bioactivos)



Alimentos funcionales: Isoprenoides



Monoterpenos

Pineno, linalol, citral, mirceno, limoneno

Diterpenos

Acción antimicrobiana, antiinflamatoria, vitaminas y precursor (retinol (A), fitol (E)). Taxanos (quimioterapia)

Triterpenos

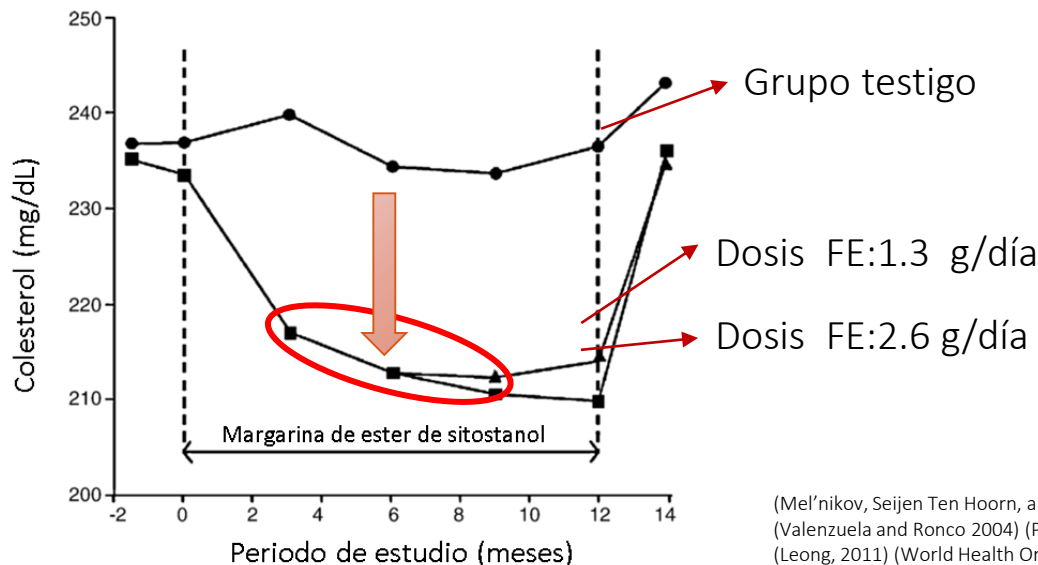
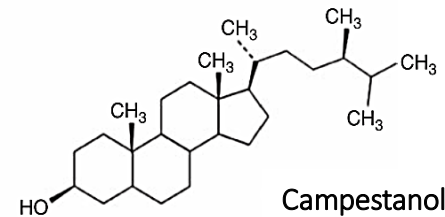
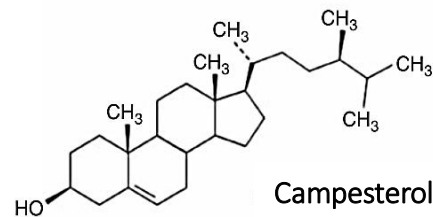
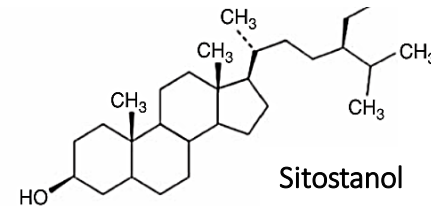
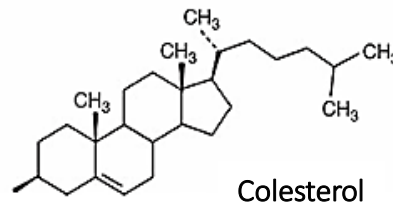
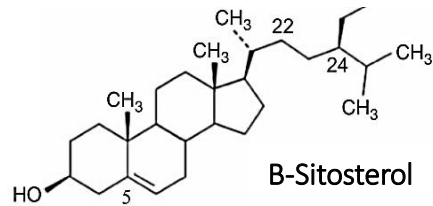
Escualeno (antioxidantes) precursor de esteroides: **fitoesteroides**

Tetraterpenos

Carotenos, licopeno



Fitoesteroles (FE)



Ingerir de 1.5 a 3 g al día de FE, puede reducir de 8-15% los niveles de colesterol en sangre

Al reducir los niveles de colesterol en un 1%, el riesgo de padecer enfermedades coronarias disminuye del 2-2.7%.

Contenido de FE en algunos alimentos


En 100 g de los siguientes productos hay:



Aceite de maíz
952 mg de FE




Almendras
143 mg de FE



Frijoles
76 mg de FE

Ingesta promedio diaria de FE en adultos: **100-300 mg/día**.
En vegetarianos es mayor ≈ 450 mg/día



Lechuga
38 mg de FE

¡3 veces más!!



Fresas
18.2 mg de FE

Productos comerciales con FE

Actualmente hay algunos productos con fitoesteroles en USA, EU, Chile, Argentina, Brasil, Ecuador, Australia, Sur África, Turquía, Emiratos Árabes, Indonesia, entre otros.

La mayoría son productos con FE esterificados con ácidos grasos (AG) para mejorar su solubilidad y obtener productos con actividad hipocolesterolémica.



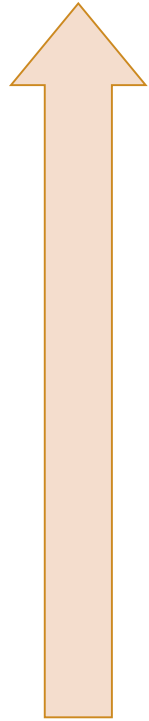
Se les añaden hasta un 20% de AG
No recomendados en personas
con hipercolesterolemia



Son
preferidos
los FE en
productos
acuosos



Alimentos funcionales

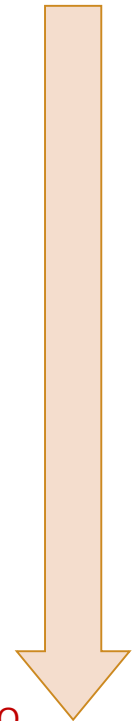


Beneficios

- Naturales
- Sin efectos secundarios a largo plazo
- Administración no invasiva

Retos

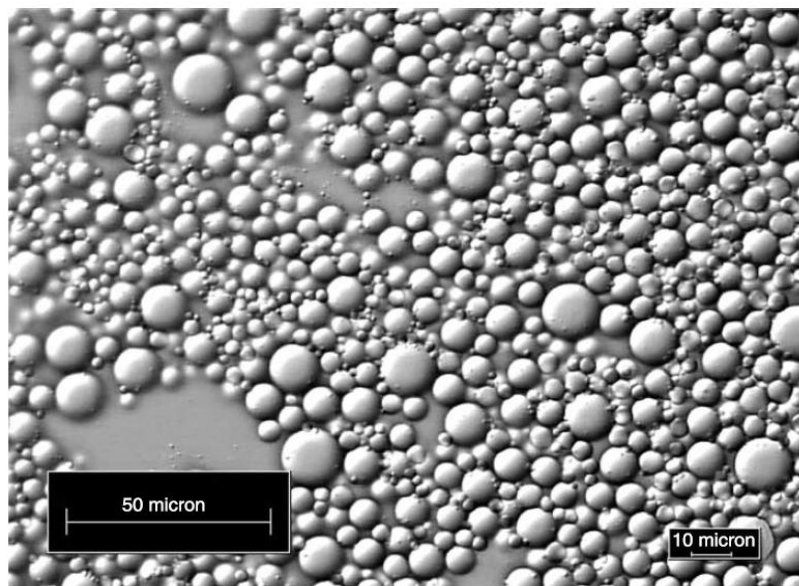
- Se encuentran en bajas concentraciones en los alimentos
- Muchos no son hidrosolubles
- Poco estables: los daña la luz, oxígeno, T°...



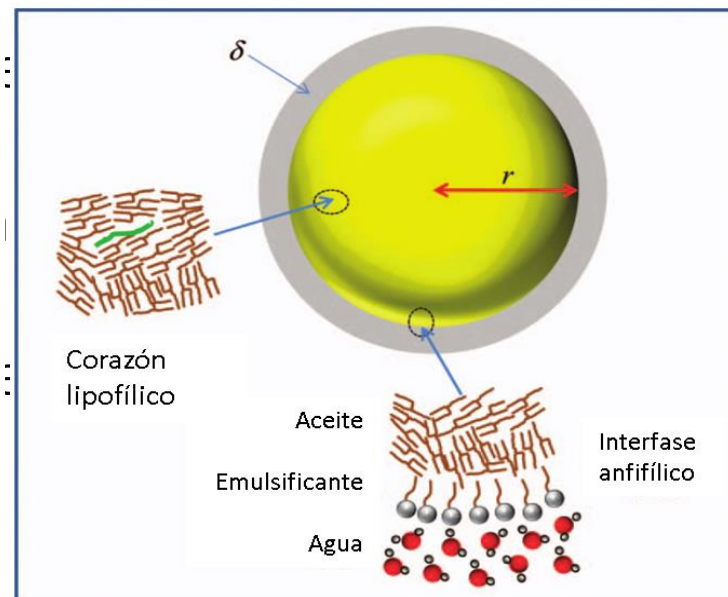
Se necesitan métodos para protegerlos y mejorar su acción en el organismo

Emulsiones y nanoemulsiones

Micrografía de una aderezo para ensalada. Evaluada con Microscopia de contraste interferencial (DIC)



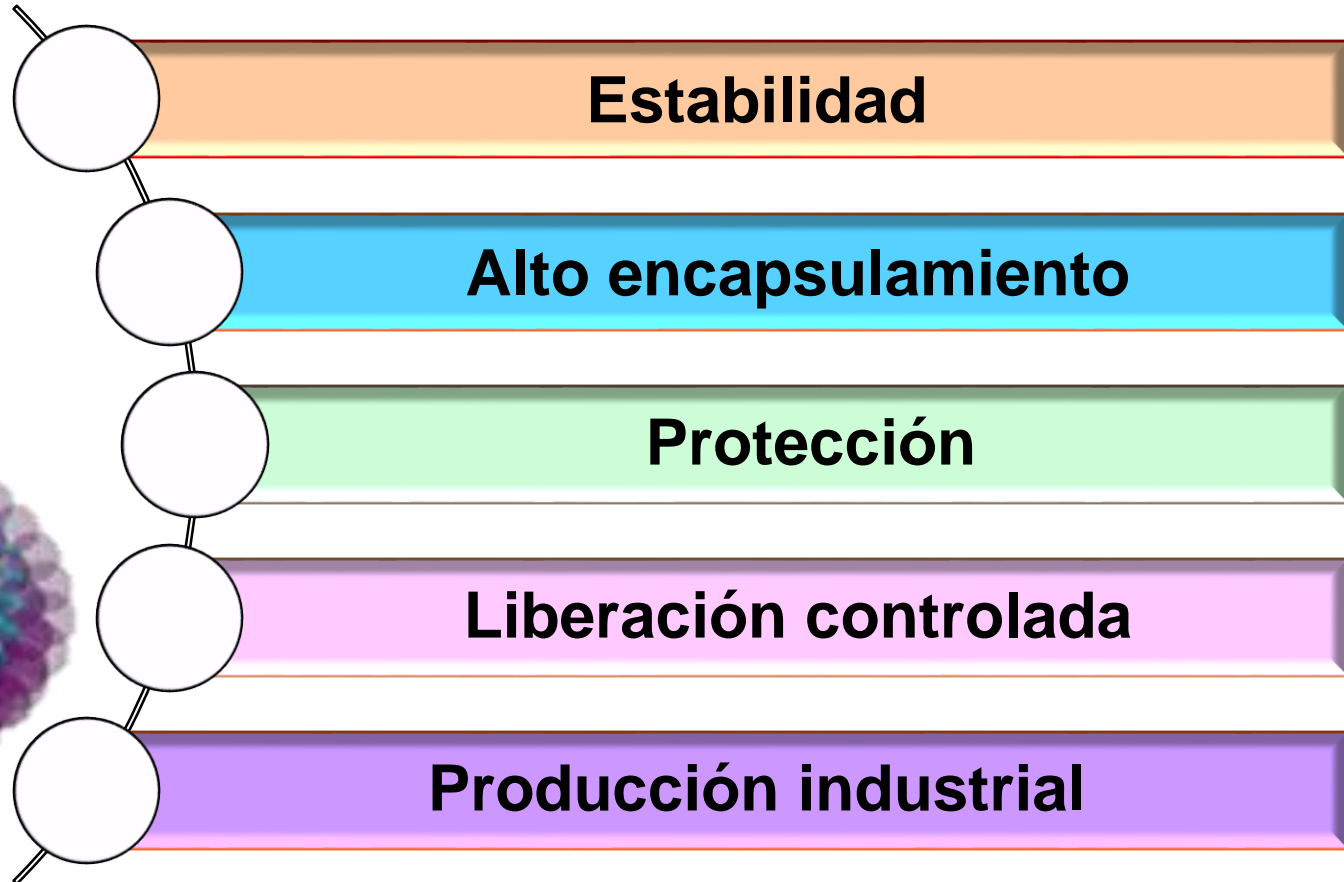
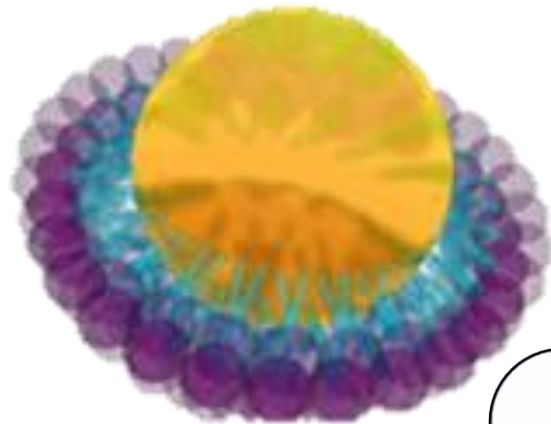
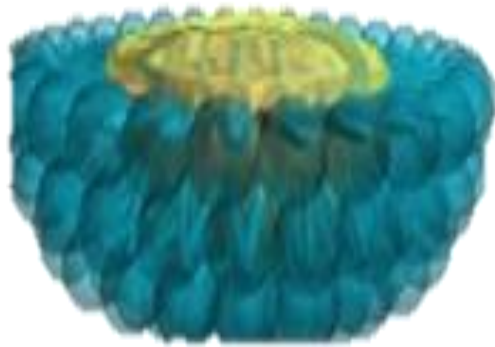
Representación esquemática de la estructura de una nanoemulsión



Sistema	Radio de la Gota	Estabilidad Termdinámica	Relación superficie/masa (m ² /g partícula)	Propiedades ópticas
Emulsión	0.5 -100 μm	Inestable	0.07-70	Turbia/opaca
Nanoemulsión	10-400 nm	Inestable	70-330	Translúcida /turbia

Nanoemulsiones

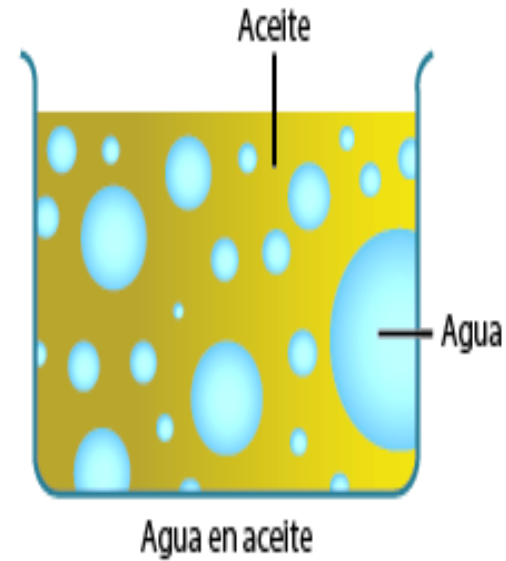
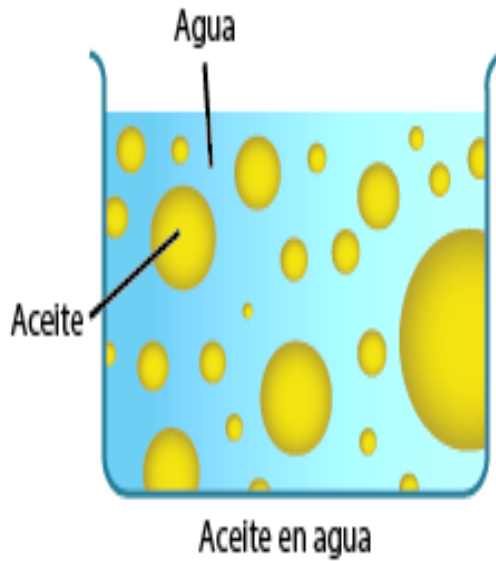
VENTAJAS



Es un sistema que contiene dos fases líquidas inmiscibles, una de las cuales esta dispersa en la otra en forma de glóbulos con tamaño de 20-500 nm que son translúcidas y transparentes.

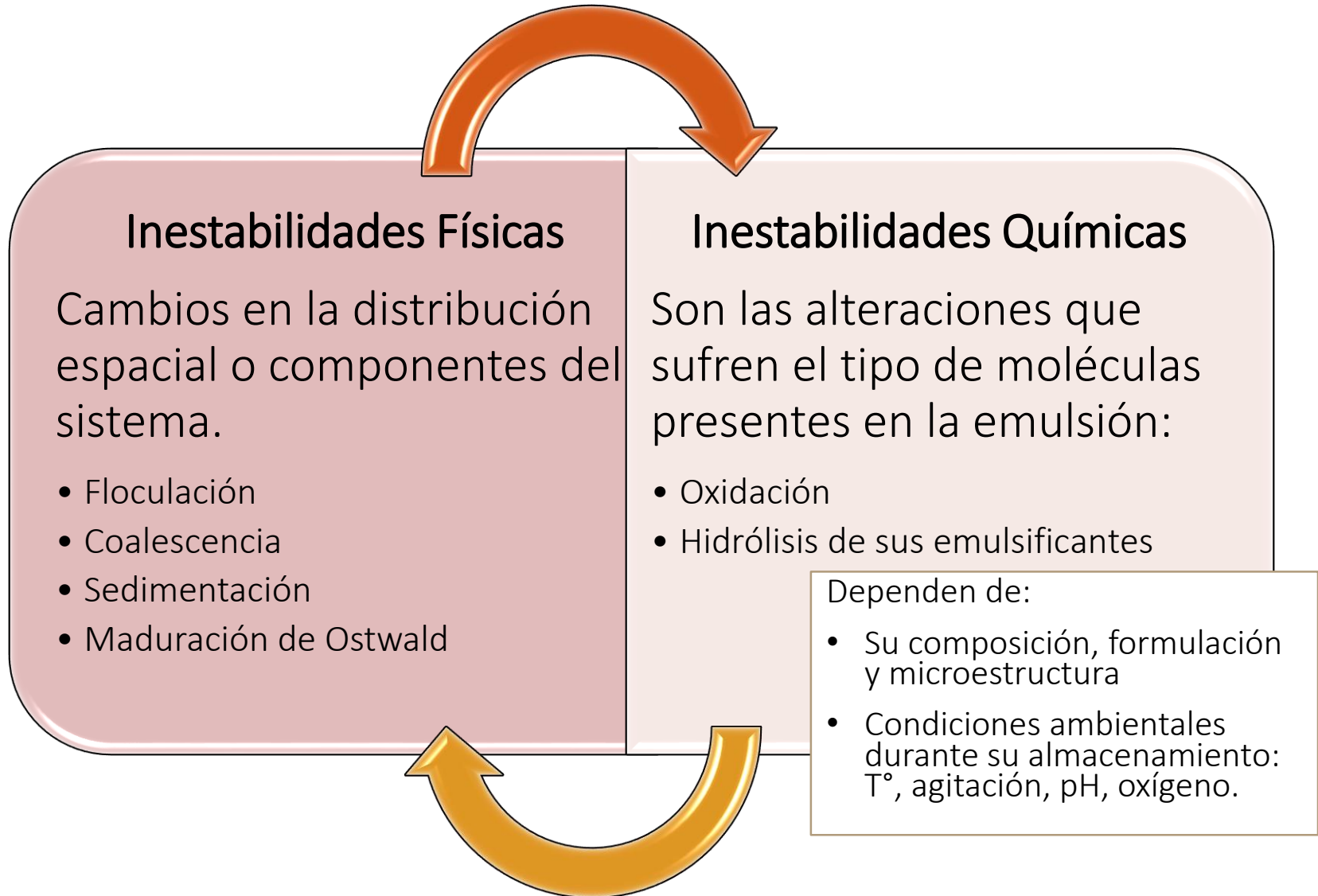
Tipos de Nanoemulsiones

O/W



W/O

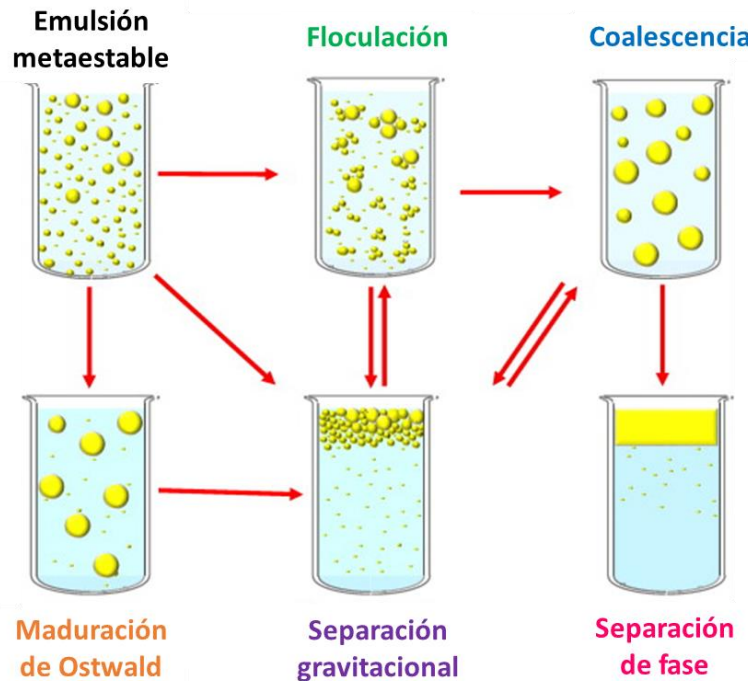
Estabilidad de las nanoemulsiones



Inestabilidades Físicas

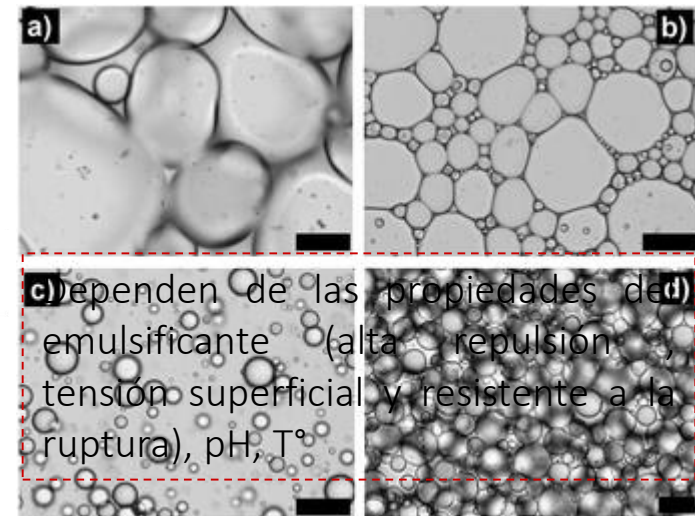
- Se observan con SEM, TEM
- Monitorear Cambio TP, μ y potencial ζ

Maduración de Ostwald
Crecimiento de las gotas grandes a expensas de las más pequeñas



Floculación: Adhesión de una o más gotas sin perder su identidad

- Interacciones entre partículas y el pH
- Se previene $\uparrow \mu$ fase dispersa, usar emulsificantes cargados y evitar agitación.



dependen de las propiedades de emulsificante (alta repulsión, tensión superficial y resistente a la ruptura), pH, T°

Separación Gravitacional: Migración de gotas hacia la superficie o el fondo debido a diferencias de densidad

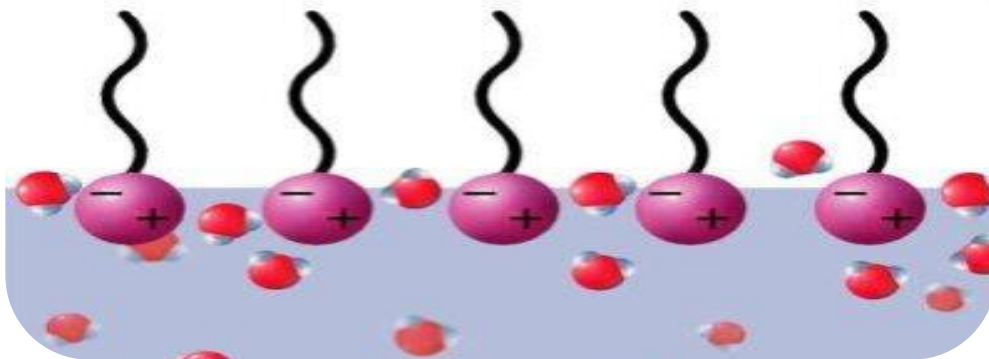
- Se rige por la ley de Stokes
- Se previene: $\downarrow \Delta\rho$, \downarrow TP y $\uparrow \mu$

$$v_{\text{Stokes}} = - \frac{2gr^2(\rho_2 - \rho_1)}{9\eta_1}$$

Emulsificantes

Son compuestos que poseen una doble afinidad, están formados por una parte que es afín a sustancias polares y otra parte que posee mayor semejanza con sustancias apolares.

**Disminuye la
tensión interfacial**



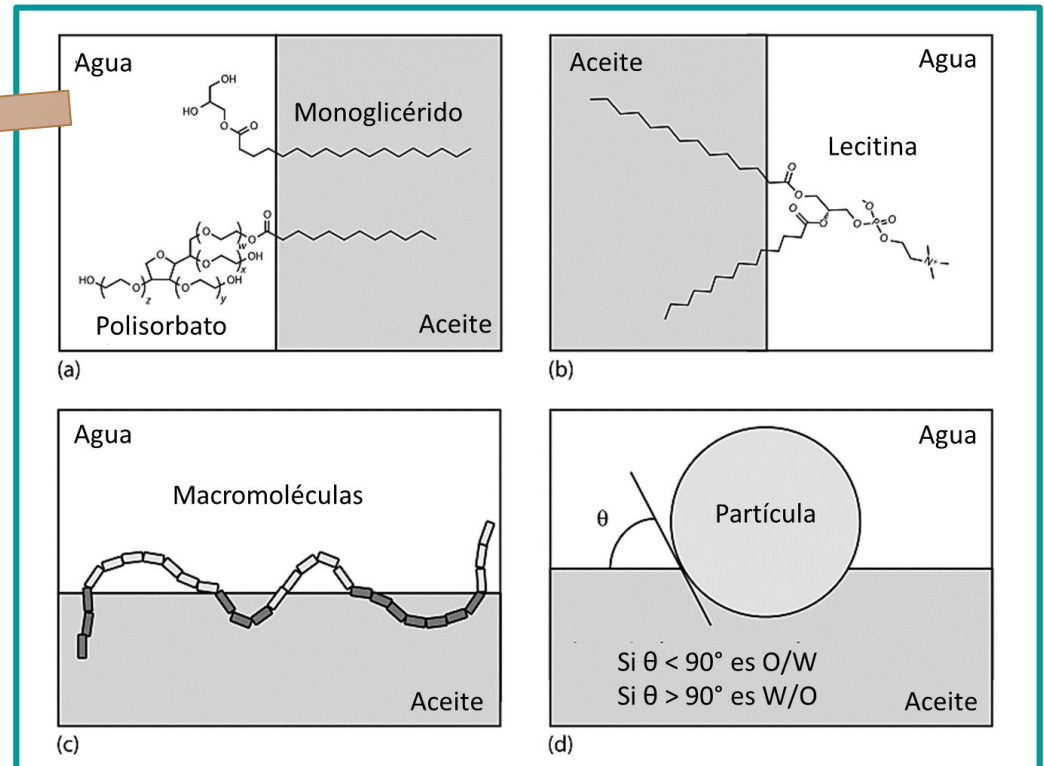
**Uso en pequeñas
cantidades**

Adsorción rápida

Emulsificantes

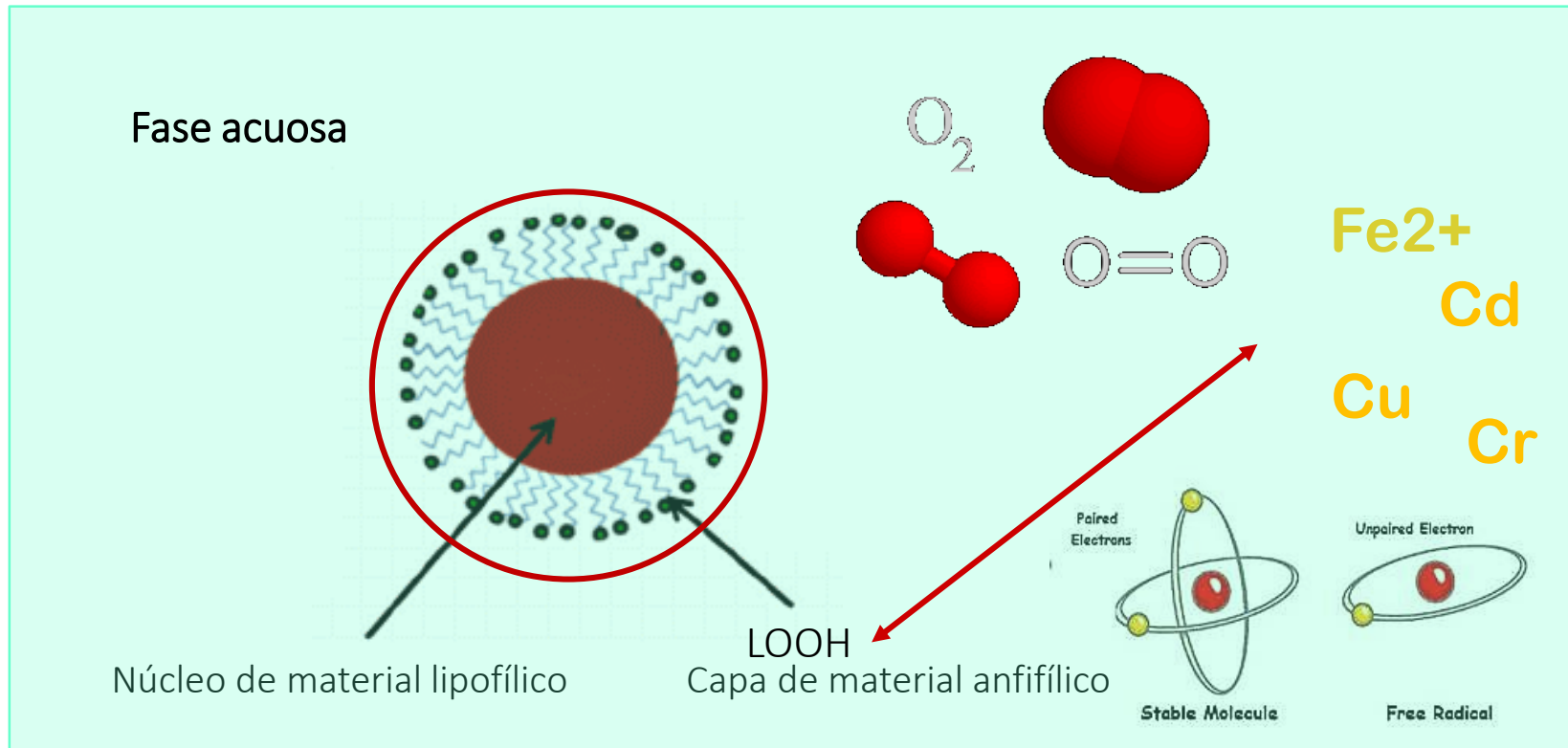
- Energía entre las superficies de dos fases
- Disminuyen el T.P alcanzado

Estructura esquemática de varias clases de emulsificantes en la interfase aceite-agua



- Mejoran la interacción entre partículas
- Crean una barrera contra la coalescencia y floculación

Oxidación de NE



Sabor
 Olor
 Textura
 Contenido nutricional
 Estabilidad de la NE

(Shao & Heinecke, 2009; (Waraho, Mcclements, and Decker 2011) (Cui et al. 2016) (Frankel, Satué-Gracia Meyer, & German, 2002) (Cercaci et al. 2007).

Oxidación de FE

Mecanismo:

Formación de radicales libres

Iniciados por

ROS

Especies reactivas de oxígeno

Calor

Luz

Aire

Agua

Metales de Transición



H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	A
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra																

Productos de oxidación de los FE POFs

La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

Oxidación de FE

Secuencia de reacción

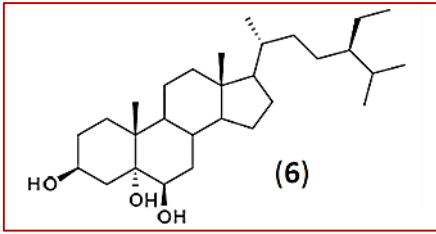
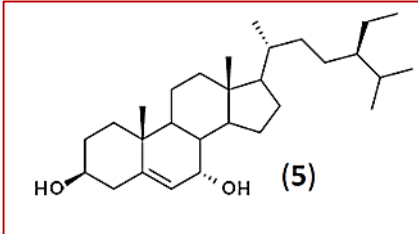
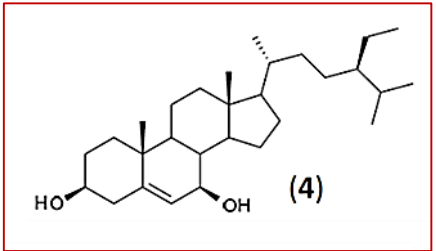
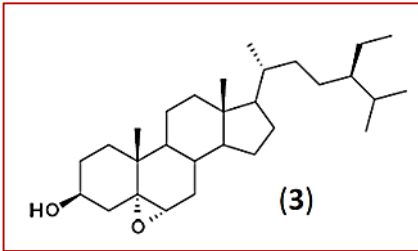
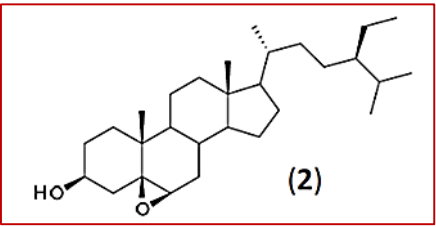
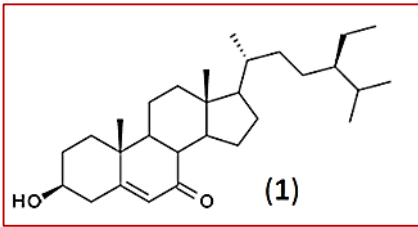
1. Formación de **Hidroperóxidos**



2. Formación de componentes polares:
Cetonas, Alcoholes y Epóxidos.
Apolares: **esteradienos y esteratrienos**



3. Formaciones de: **Dimeros, oligómeros y polímeros**



Óxidos de β -Sitosterol

	Nombre
(1)	7-ceto-Sitosterol
(2)	5,6 β -epoxi-Sitosterol
(3)	5,6 α -epoxi-Sitosterol
(4)	7 β -hidroxi-Sitosterol
(5)	7 α -hidroxi-Sitosterol
(6)	Sitostanetriol

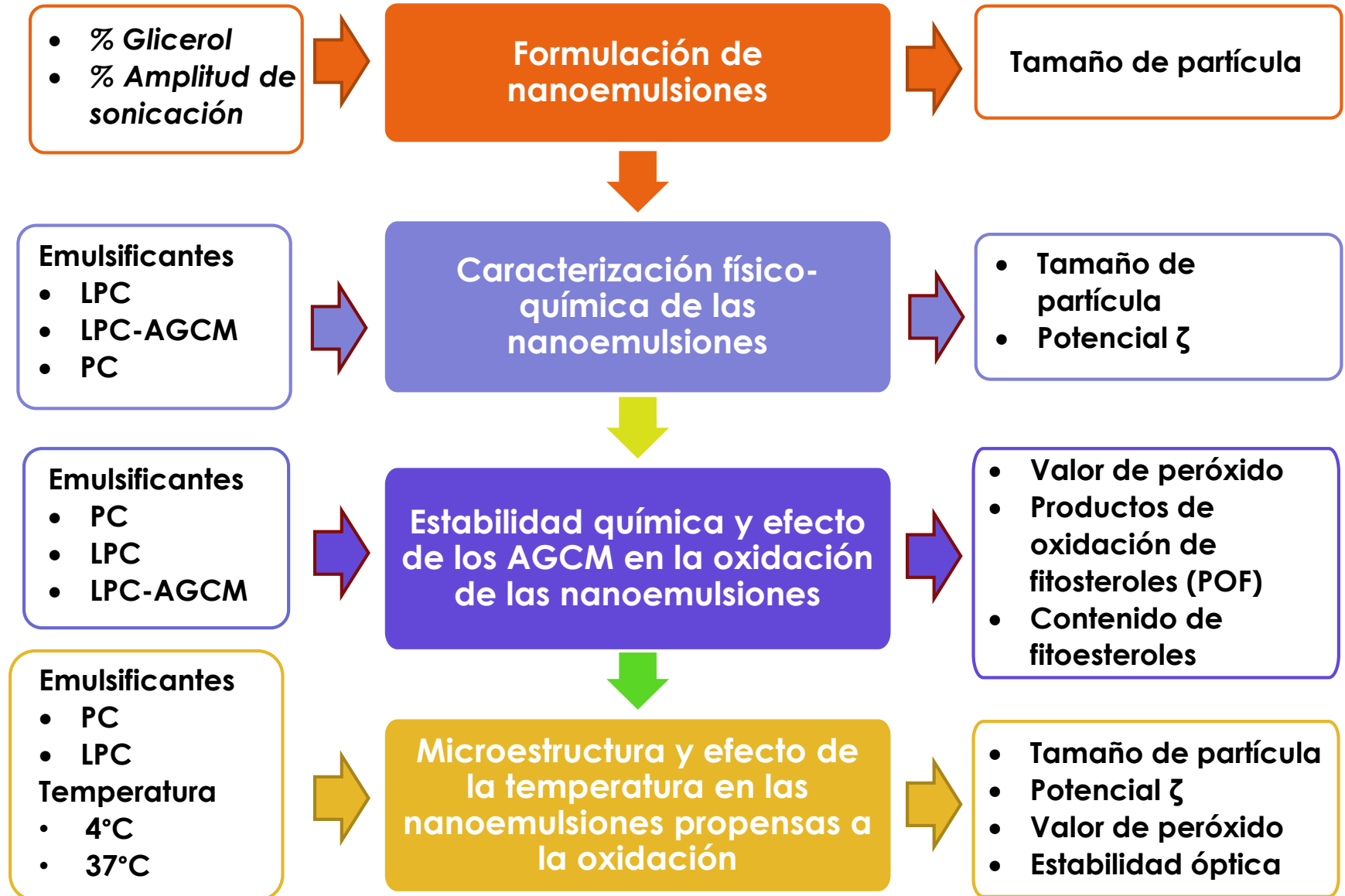
DFG, SKLM, 2014. Zawistosky, 2010

(Belhaj, Arab-Tehrany, and Linder 2010)

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Senate

Commission on Food Safety (SKLM), December 2014

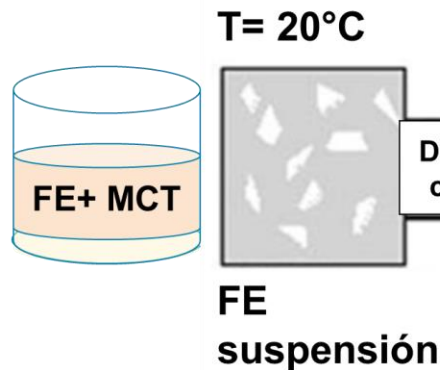
Cuadro metodológico



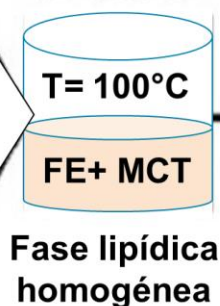
1. Preparación de la emulsión

95% Fase acuosa
5% Fase oleosa

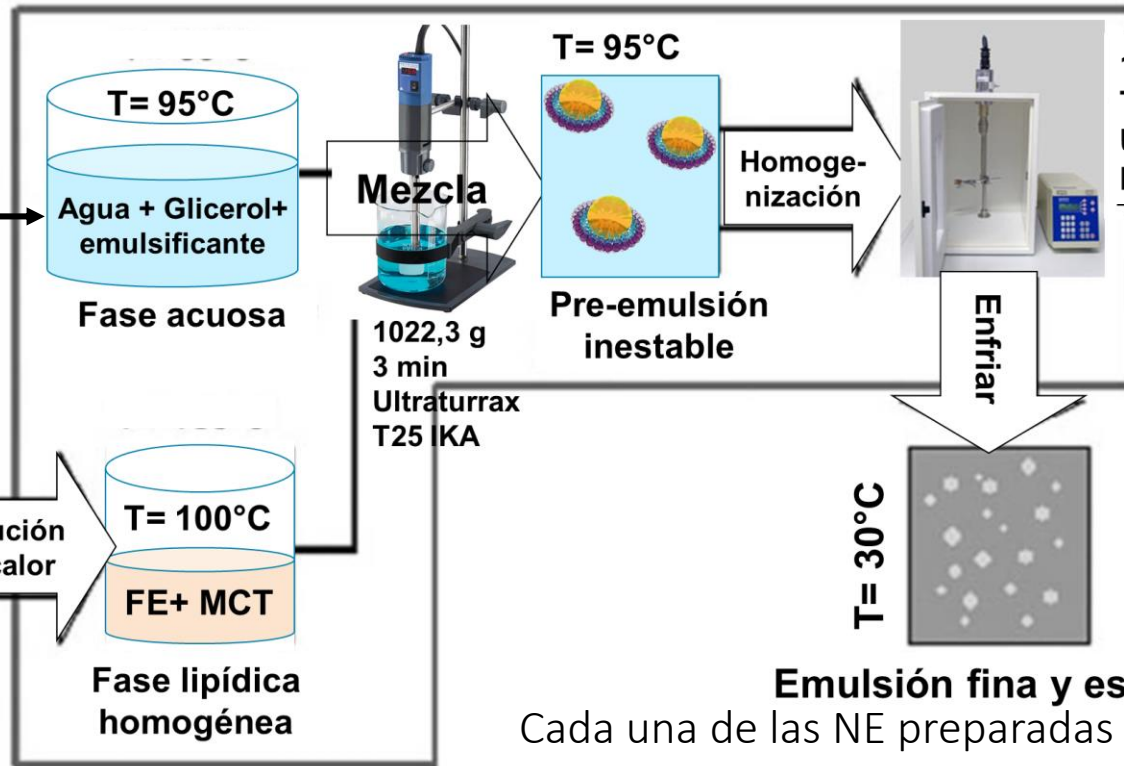
Emulsificante 10%
FE: 1%



Disolución con calor



Emulsificación a alta temperatura



12 min, 120 W,
Tmax: 35.2°C
Ultrasonicator
Brandson 450

Cada una de las NE preparadas fueron divididas en 15 frascos y almacenadas a 37 °C, luego a 37° y 4°C

2.1. Caracterización Física de NE

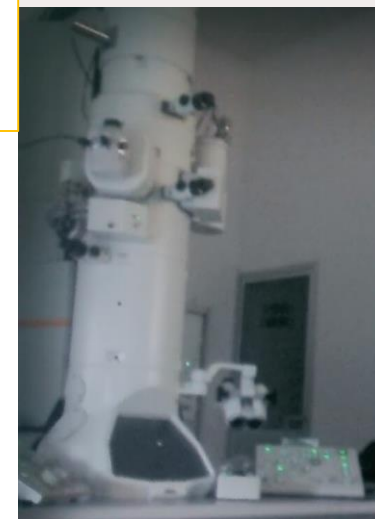
Tamaño de
partícula

Potencial Z

Estabilidad en el
tiempo

Microestructura

La estabilidad de las NE se evaluó a : 4°C y 37°C



Zetasizer ZS90 Malvern, ángulo 90°

- Dilución 1:30, emulsión: agua desionizada
- T: 25°C.

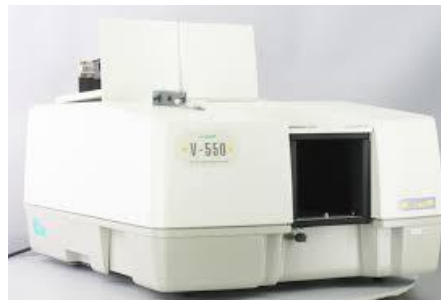
Turbiscan Formulation

Tiempo: 1 mes, cada día 5 min

(Cavazos, 2013; Ochoa, 2013; Chávez, 2015)

2.2 Caracterización química de las NE

- Valor de Peróxidos: Hu *et al*, 2008.



- Contenido de fitoesteros y POFs

Extracción lipídica

200µL de NE +estánd. interno
Cloroformo:metanol (2:1,v/v)
Mezclar bien → cloroformo y
NaCl (0,3% p/v) → mezclar
bien, centrifugar 3000
rpm/20 min.
Separar la fase orgánica

Purificación SPE

- FE: Columnas Strata SI-1 Silica (500 mg/3 mL).
Elución: *n*-hexano: dietil eter (8:2, v/v). Recobrar los FE con metanol, y hexano:dietil eter (1:1, v/v).
- POFs: Columnas Supelclean LC-Si 3 mL. Elución: *n*-hexano, *n*-hexano: dietil eter (95:5; 90:10 and 80:20, v/v). Recobro de POFs con acetona.

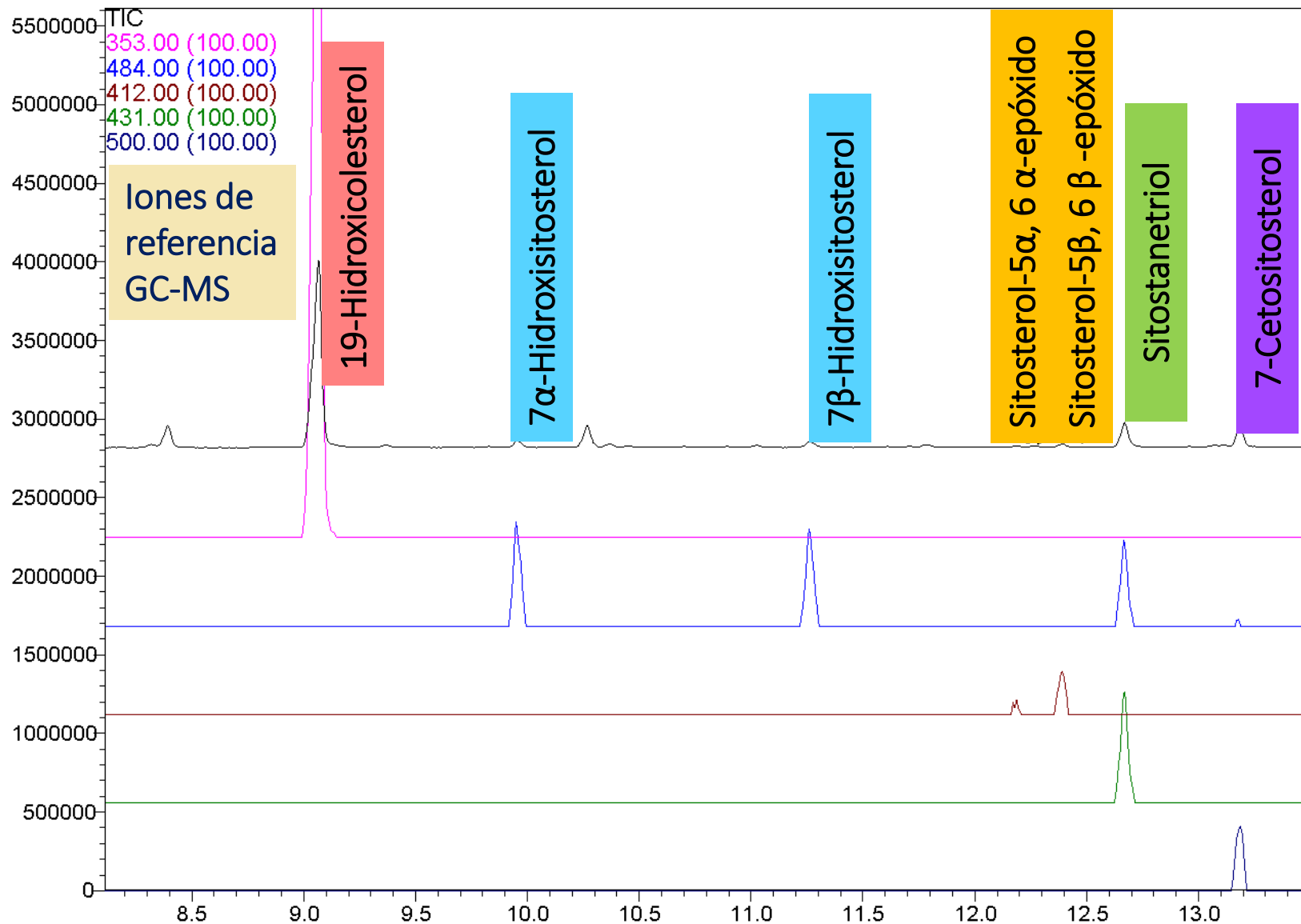
Identificación GC-MS

- GC-MS Shimadzu QP 2010 Plus
- Columna capilar Restek RTX-5 (10 m x 0,1 mm i.d.x 0,1 µm espesor).
- T ° horno: 220°C a 325°C (5°C/min), luego 325°C, 6 min.
- T° inyección: 325°C.
- T° fuente de iones: 220°C.
- Gas de acarreo: Helio
- Split: 1:50.

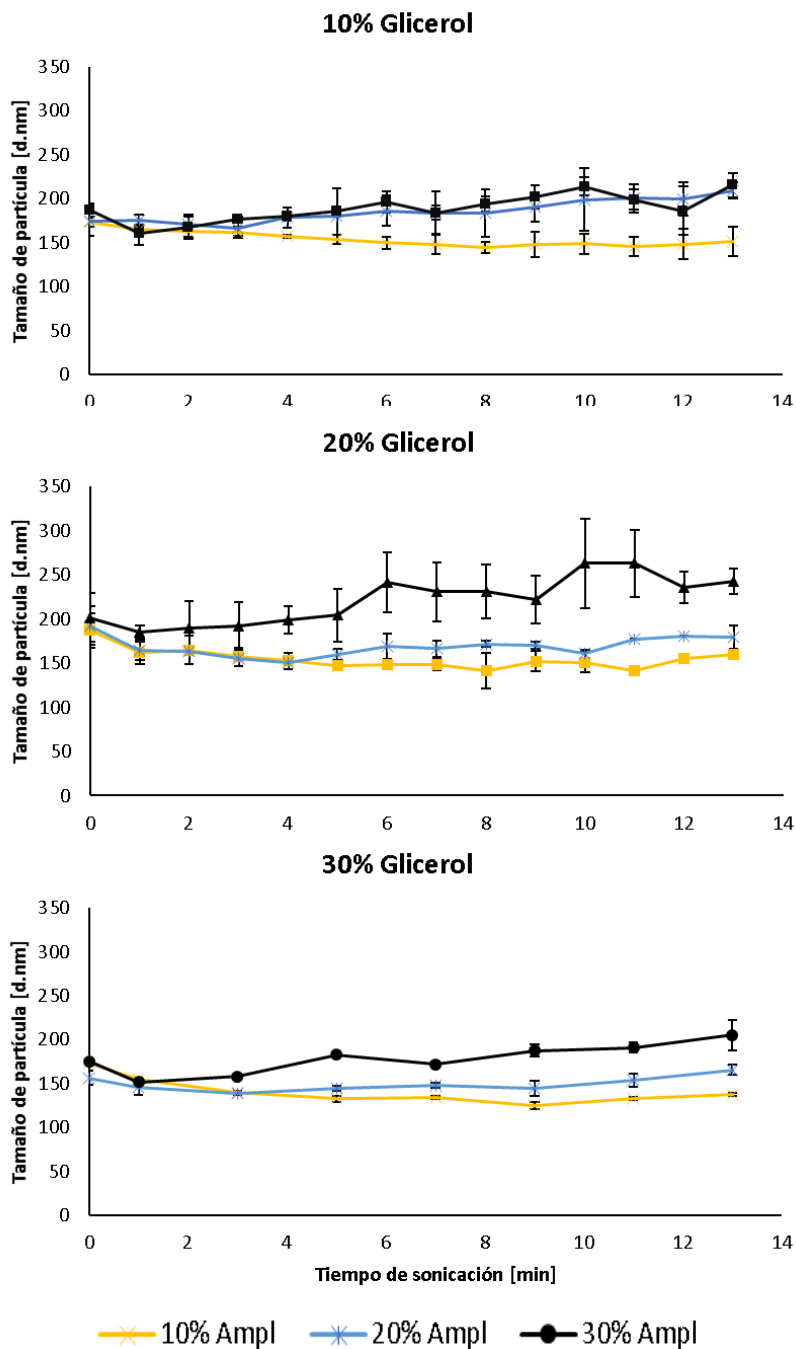


RESULTADOS

Óxidos de β -Sitosterol identificados



Evaluación del efecto del glicerol en el tamaño de las NE



Con 30% de glicerol se obtuvo menor dispersión en los datos y menores tamaños de partícula.

Características de los emulsificantes utilizados

Composición de ácidos grasos (%mol) de los emulsificantes utilizados

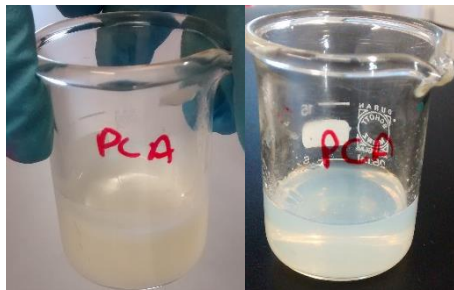
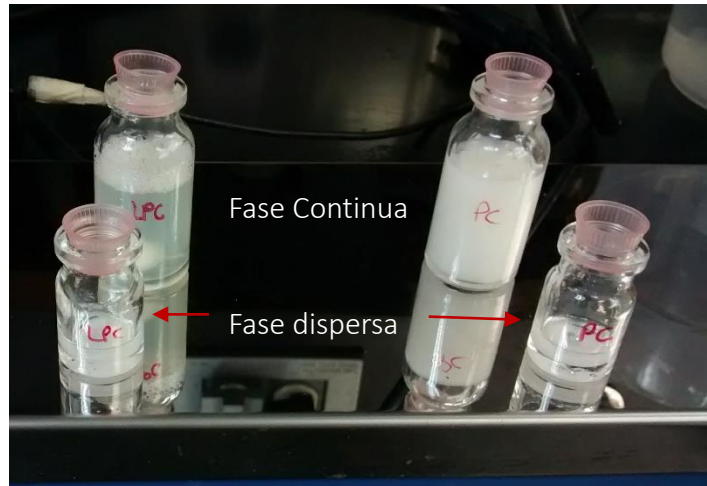
Ác. graso	PC- ω 3 (Cavazos et al., 2015)	LPC-AGCM (Chávez et al., 2016)	LPC (Este trabajo)	PC (Avanti)
C8:0		15.34 \pm 0.32		
C10:0		7.95 \pm 0.05		
C14:0		2.92 \pm 0.00		
C16:0	3.09 \pm 0.06	3.82 \pm 0.21	3.70 \pm 0.10	14.90 \pm 0.05
C:18:0	1.66 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01		3.70 \pm 0.03
C18:1	9.25 \pm 0.10	11.81 \pm 0.3	9.60 \pm 0.12	11.40 \pm 0.02
C18:2	40.22 \pm 0.61	56.23 \pm 0.00	78.13 \pm 0.07	63.00 \pm 0.02
C18:3	3.70 \pm 0.02	4.58 \pm 0.24	7.30 \pm 0.07	5.70 \pm 0.08
Otros	7.12 \pm 0.78			
C20:5 EPA	19.07 \pm 0.12			
C22:6 DHA	1.53 \pm 0.01			
C22:5 DPA	14.36 \pm 0.09			

Contenido de ácidos grasos saturados:
LPC-AGCM > PC > PC- ω 3 > LPC
30.27, 18.6, 4.66 y 3.7%

Tabla 1. Composición de ácidos grasos de los emulsificantes evaluados

Formulación y preparación de NE

10:1 emulsificante:
 FE
 4% TCM
 30% Glicerol
 55% Agua
 30% Amplitud



Pre-emulsión

Nanoemulsión



Pre-emulsión

Nanoemulsión

Emulsión de PC- ω 3

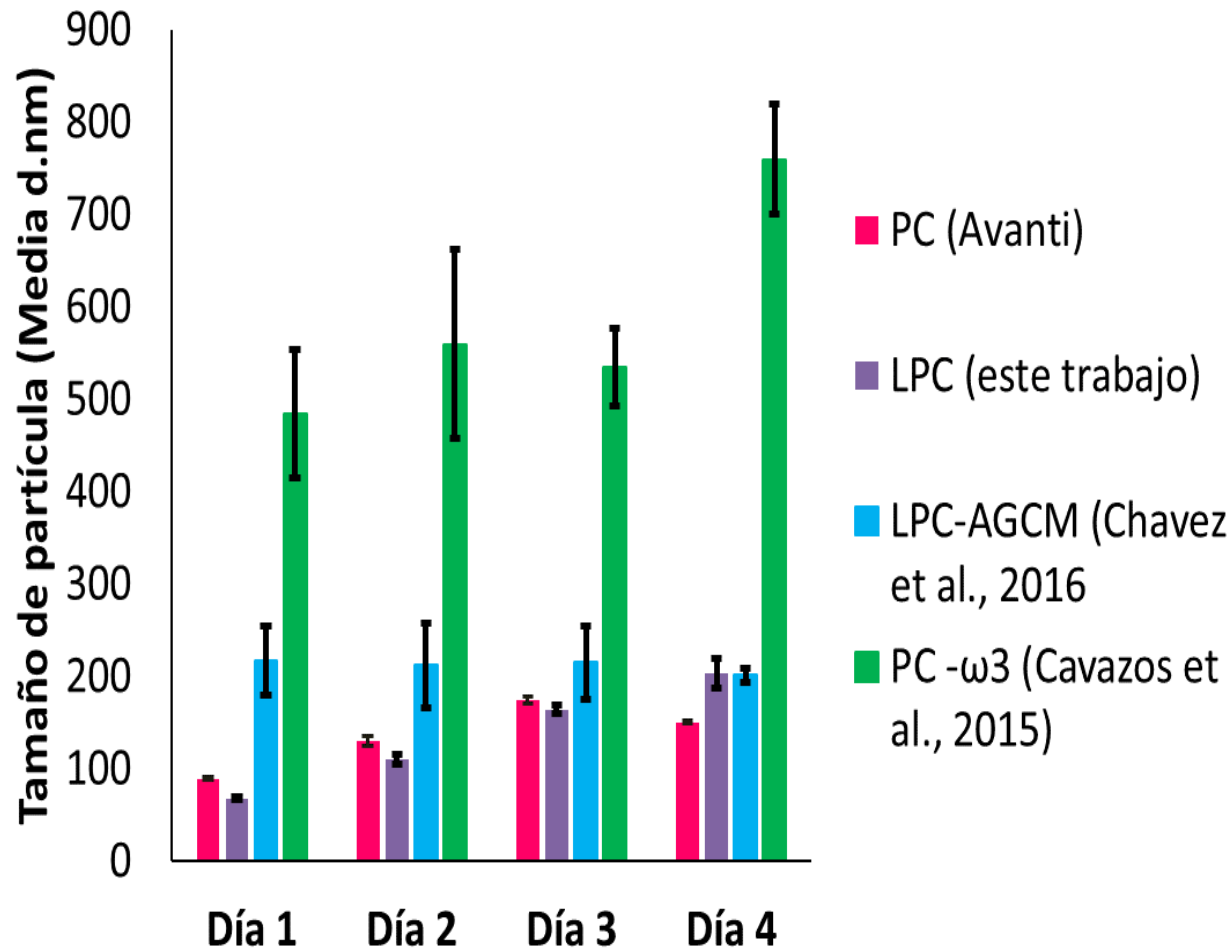


Fig. 1. Evaluación preliminar de tamaños de partícula de las emulsiones formuladas con PC, LPC, LPC-AGCM y PC- ω 3 durante 4 días a 37°C

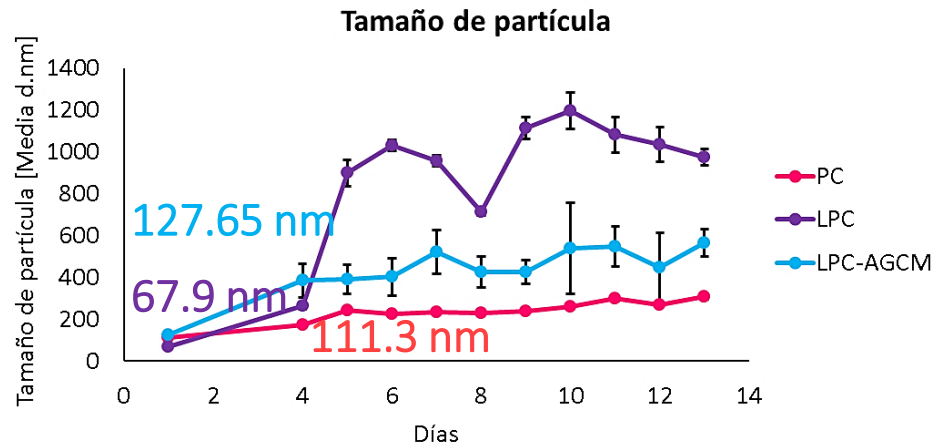
Alta inestabilidad debido a sus cadenas insaturadas y a su configuración doblada

Resultados diferentes a los hallados por Cavazos *et al.* (2015) debido a la interacción con el compuesto bioactivo

Se escogieron los emulsificantes PC, LPC-AGCM y LPC para continuar con los análisis

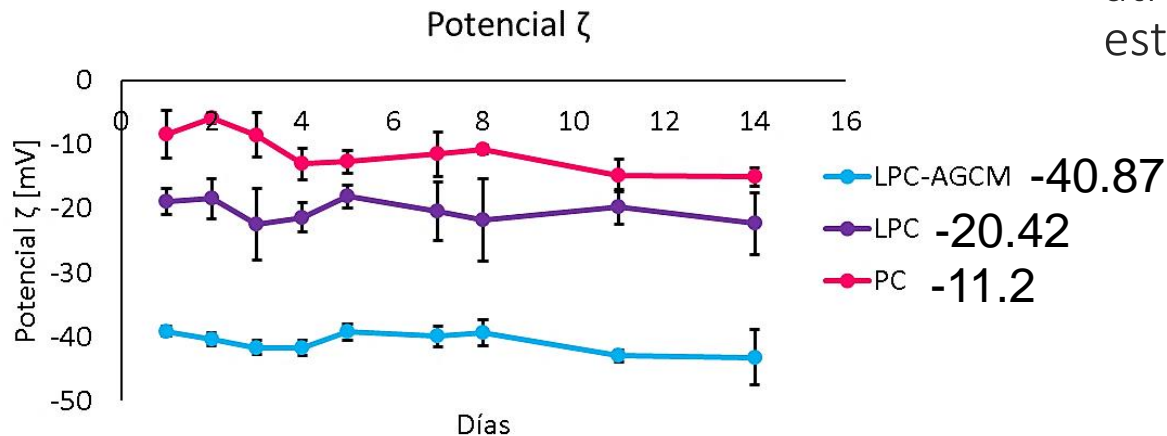
Caracterización Física

Tamaño de partícula y potencial ζ



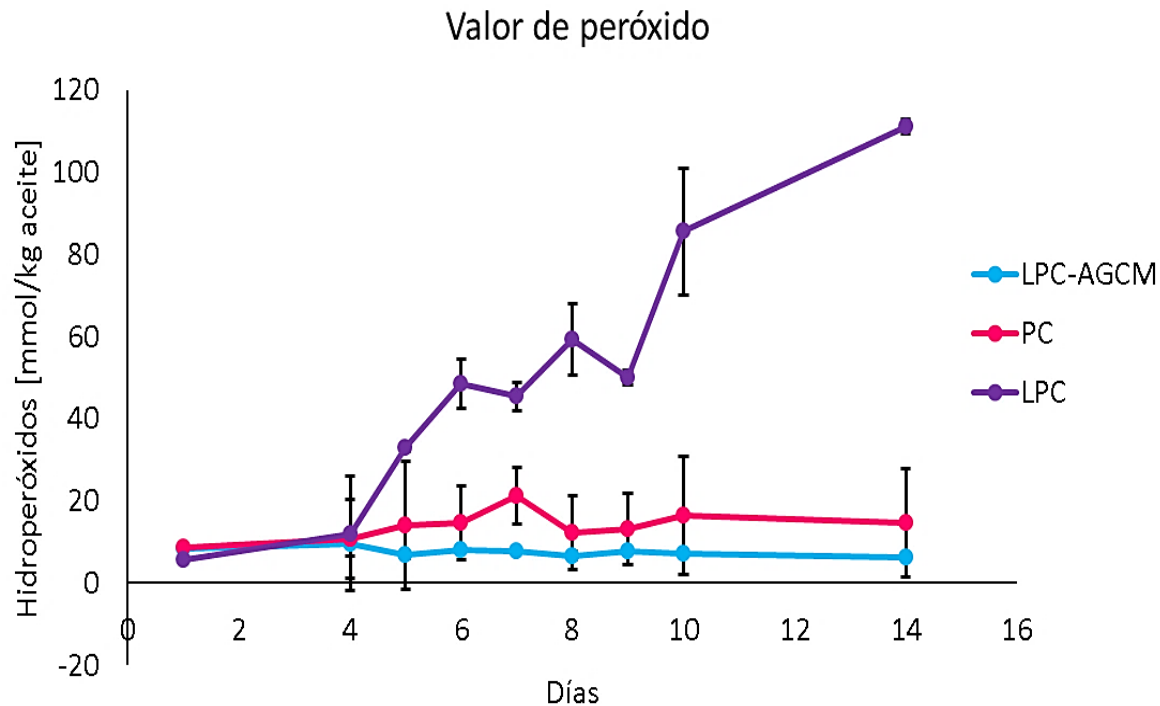
Durante el almacenamiento a 37°C el TP aumenta 1.78, 2.49 y 13.34 veces para PC, LPC-AGCM y LPC, respectivamente

El potencial- ζ no muestra cambios significativos durante el tiempo de estudio. La diferencia en sus valores se atribuye a su composición estructural



Caracterización Química

Formación de hidroperóxidos

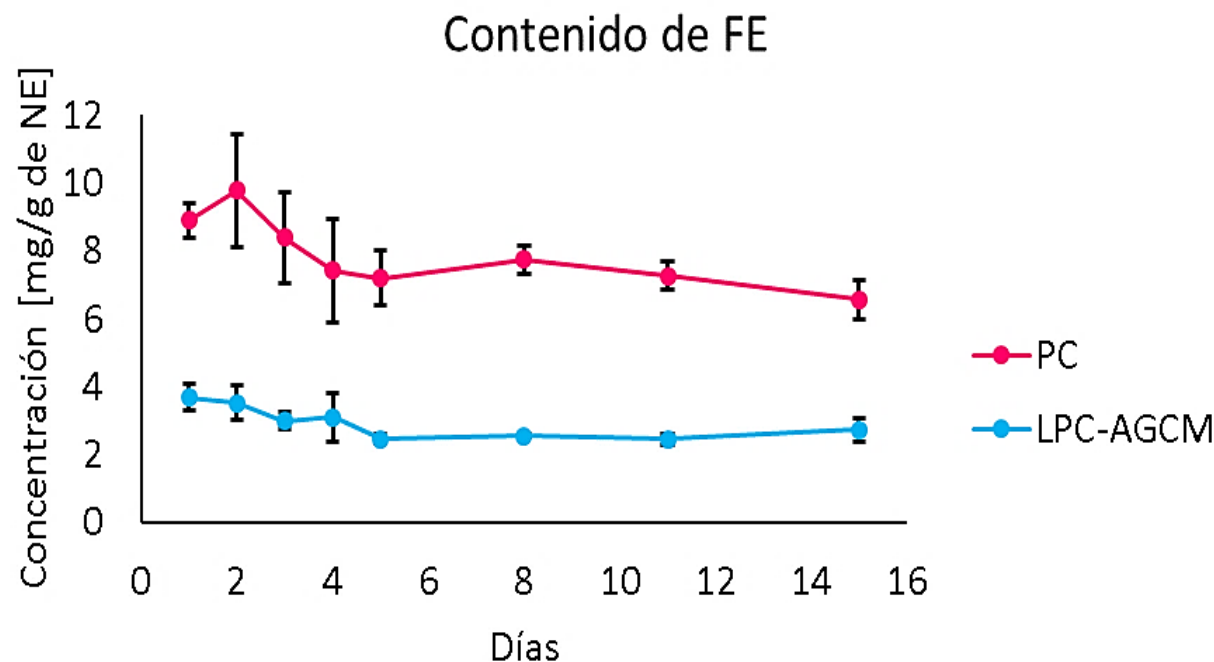


- Los valores de PV de las emulsiones realizadas con PC y LPC-AGCM no muestran diferencias significativas.
- Confirmando así, la estabilidad oxidativa del emulsificante y los TCM.
- Para las emulsiones de LPC, se observa un aumento de 19 veces su valor inicial.

Fig. 2. Evaluación de la formación de Hidroperóxidos durante el tiempo de almacenamiento a 37°C para las NE formuladas con PC y LPC-AGCM como emulsificantes

Estabilidad oxidativa de PC y LPC-AGCM

Contenido de fitoesteroles



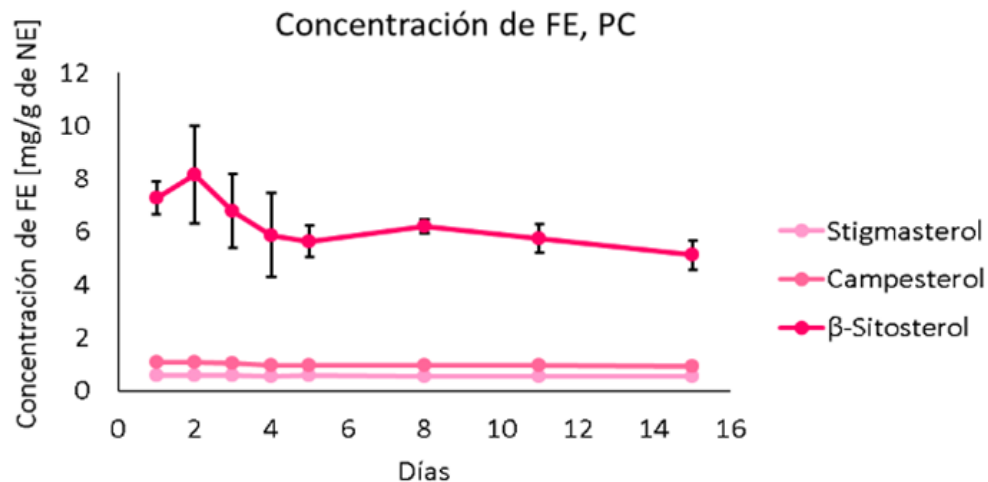
Se encapsulo el **89%** y **74%** de los FE añadidos para las emulsiones de PC y LPC-AGCM respectivamente.

Emulsificante	Contenido inicial de FE
PC	10 mg/g NE
LPC-AGCM	5 mg/g NE

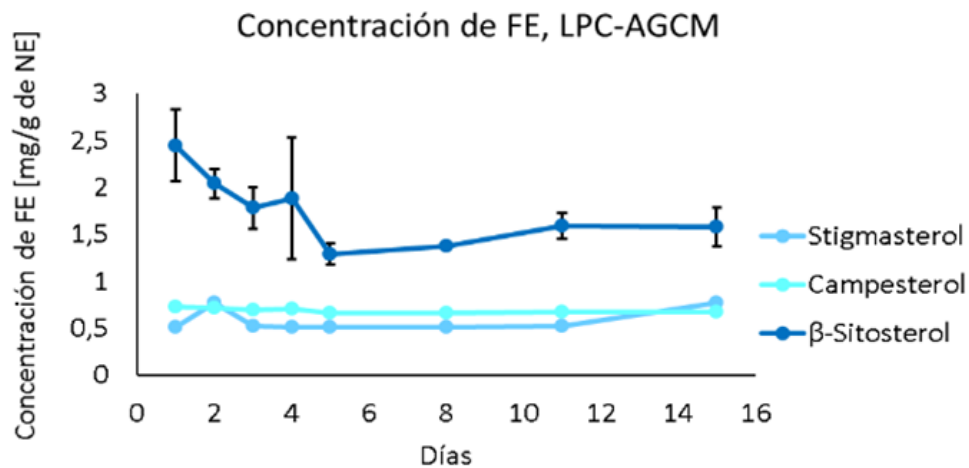
El contenido de fitoesteroles tiende a disminuir a través del tiempo entre el 12-25 %

Estabilidad oxidativa de PC y LPC-AGCM

Contenido de fitoesteroles

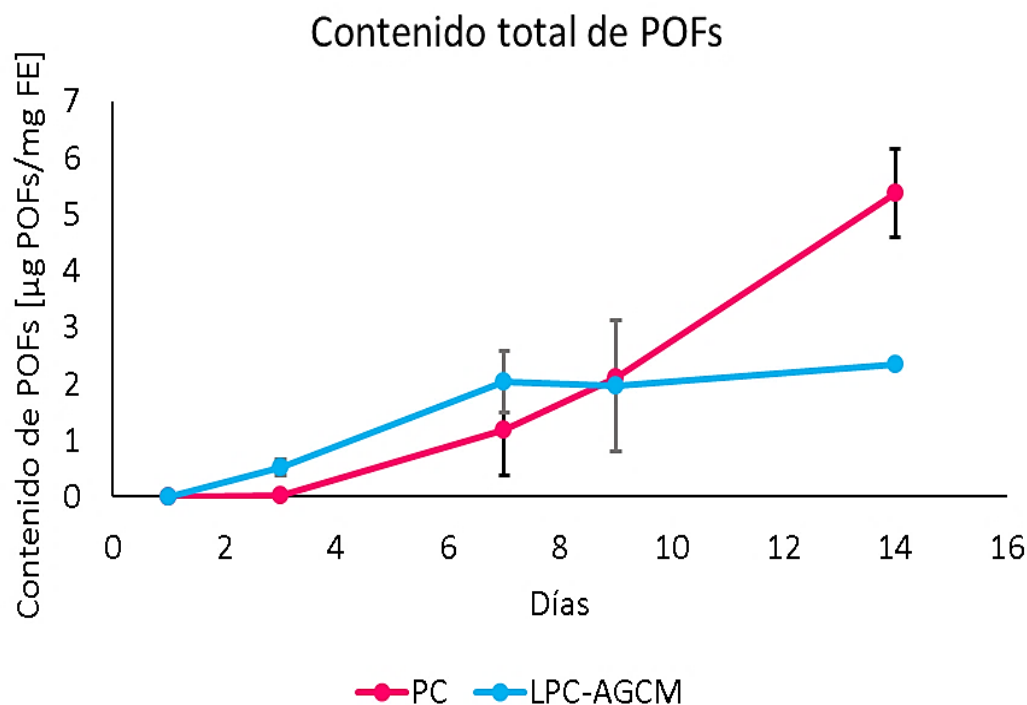


El fitoesterol que se encuentra en mayor proporción en las muestras es el β -sitosterol



Estabilidad oxidativa de PC y LPC-AGCM

Contenido de fitoesteroles



A partir del día 4 se incrementa la formación de POFs

LPC-AGCM muestra una menor propensión hacia la oxidación

Estabilidad oxidativa de PC y LPC-AGCM

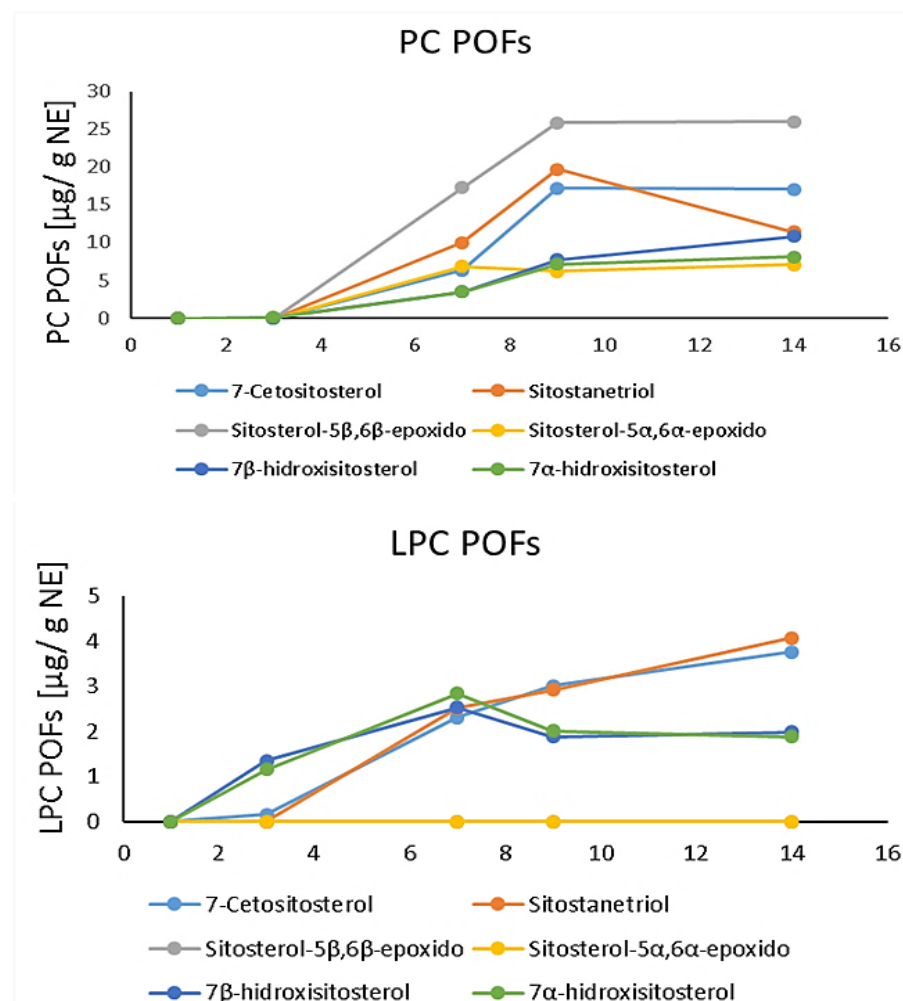
Contenido de fitoesteroles

A 37°C hay una formación de POFs de tipo exponencial.

Al 9° día se observa en PC una amplia formación de β -epóxido, mientras que en LPC no hay formación de epóxidos.

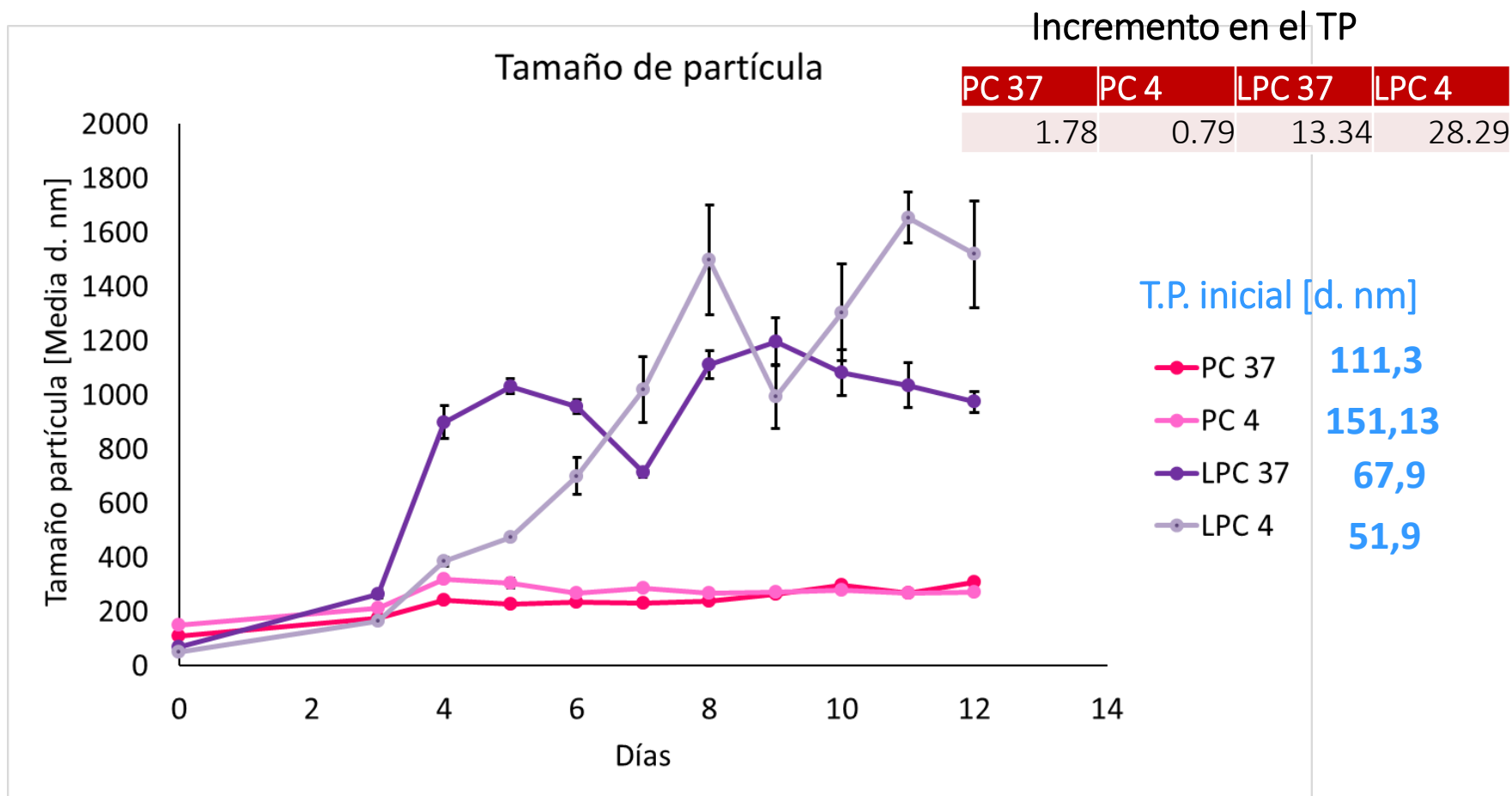
LPC-AGCM muestra una cinética representativa de oxidación lipídica con formación primero de hidroperóxidos que se transforman en compuestos cetónicos y trioles (favorecida en medio ácido).

Las emulsiones de PC presentan un estado más avanzado y con mayor cantidad de óxidos



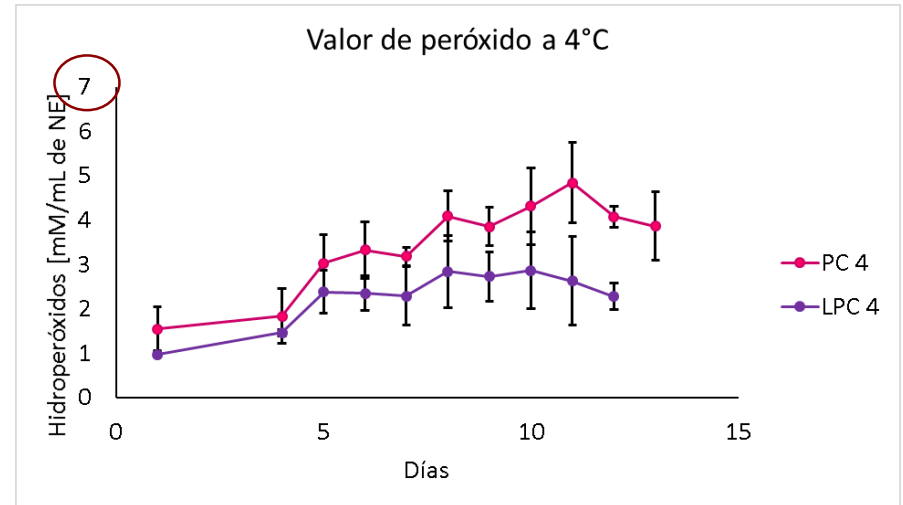
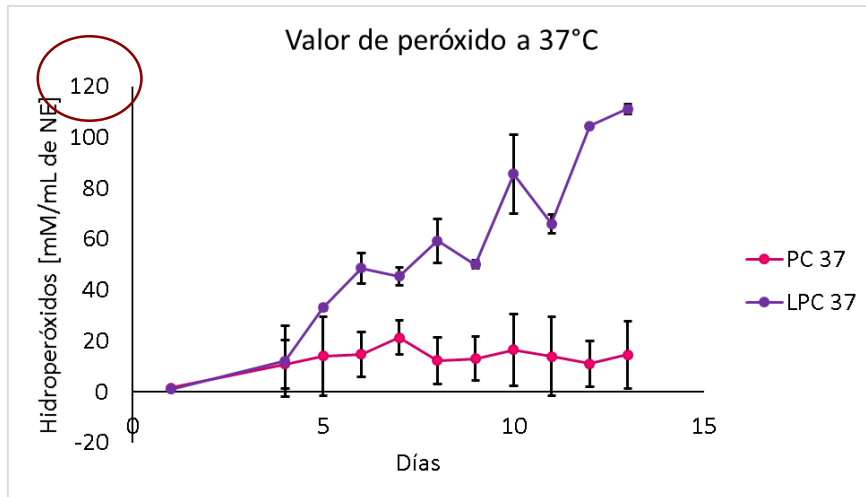
Efecto de la temperatura

Tamaño de partícula: evaluación de estabilidad con respecto al tiempo y la T°

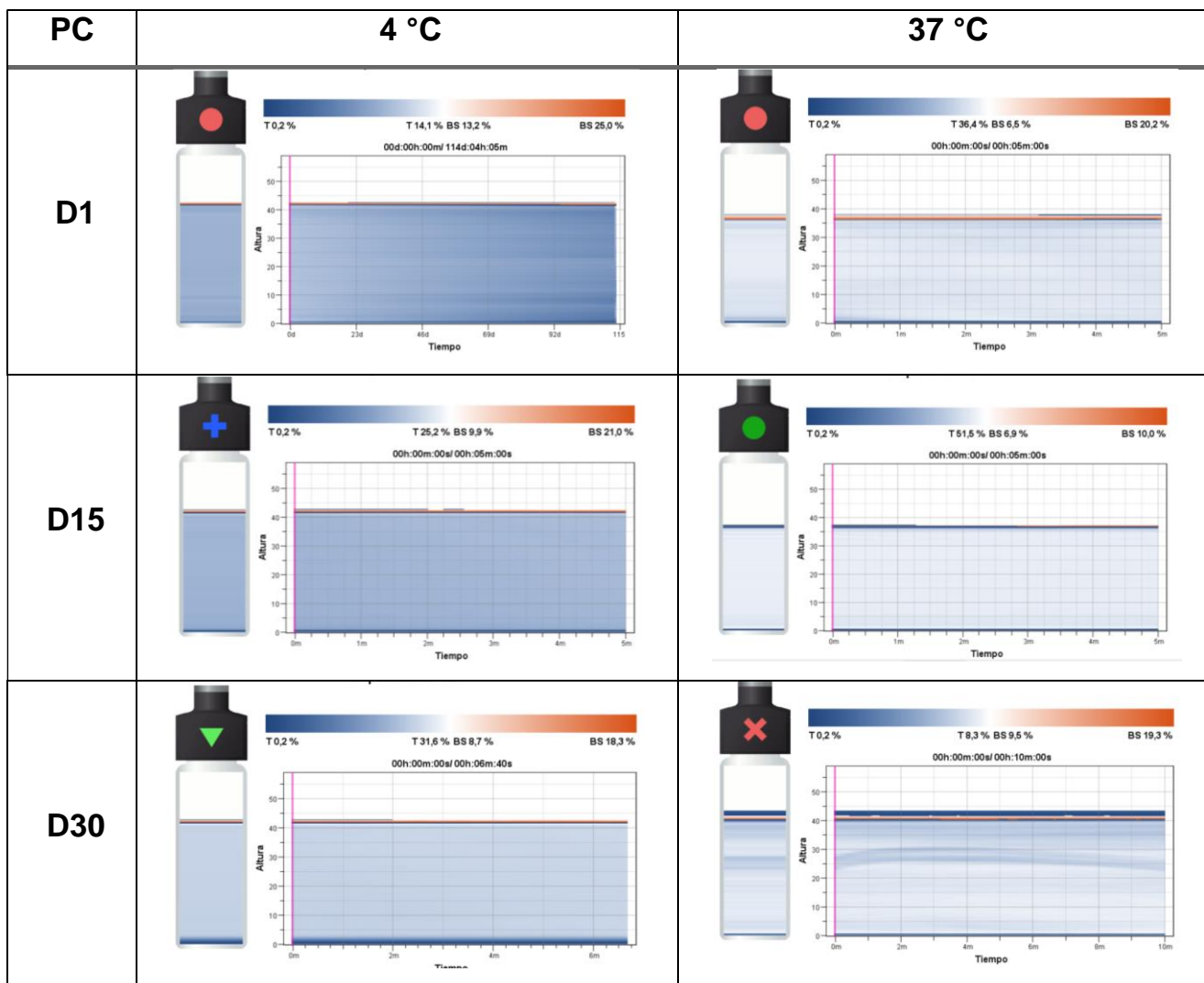


Efecto de la temperatura

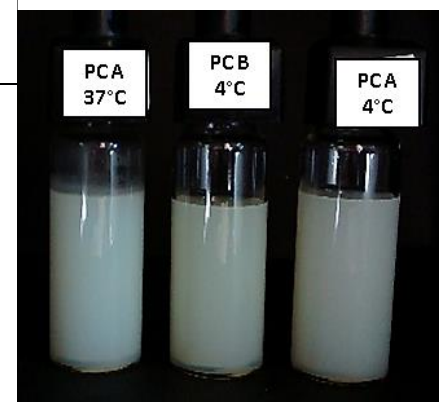
Valor de Peróxidos: evaluación de estabilidad con respecto al tiempo y la T°



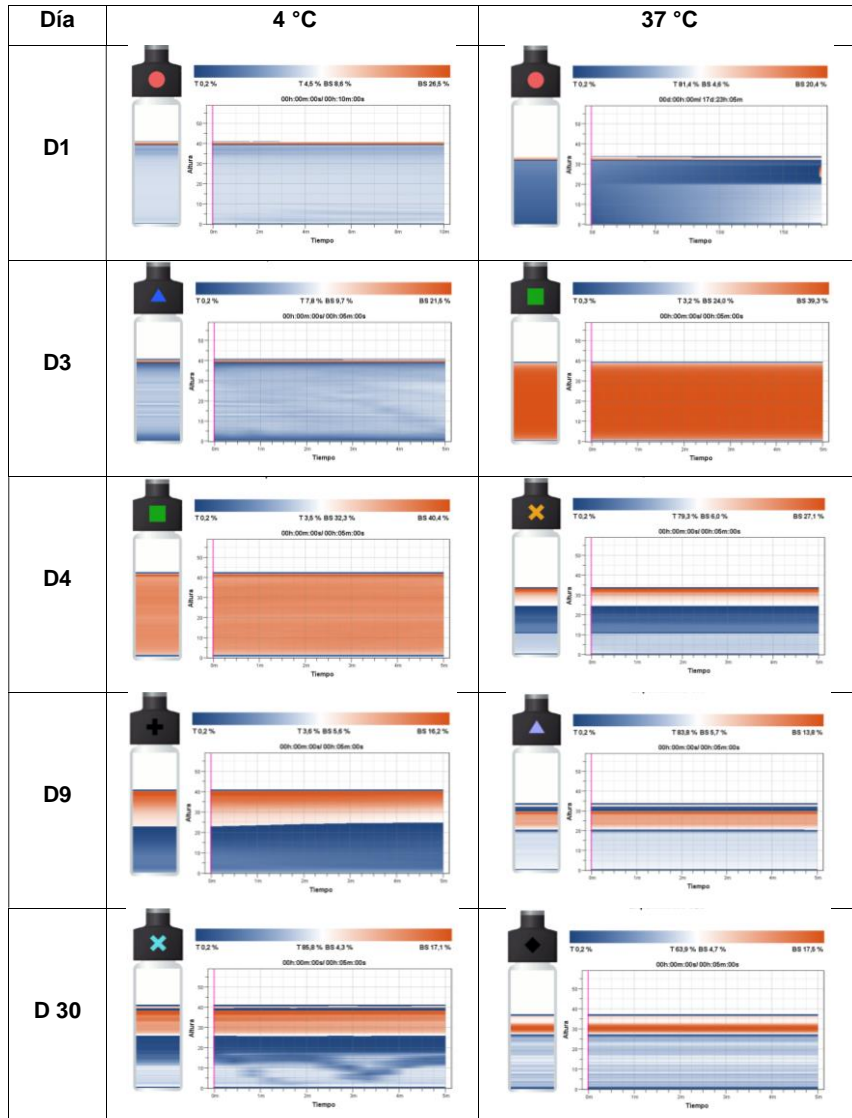
Evaluación de estabilidad (1 mes)



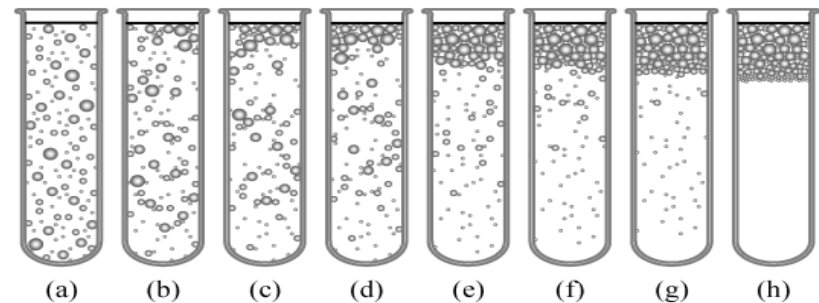
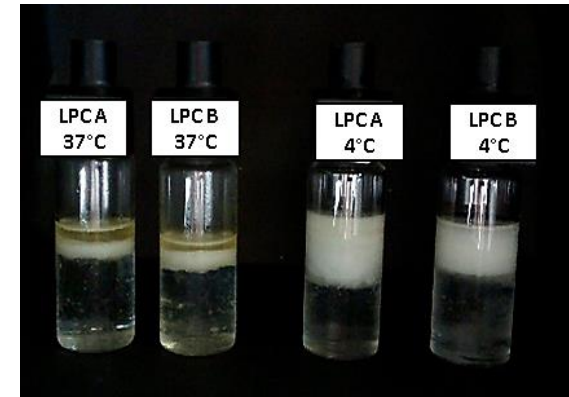
Presencia de una única fase homogénea sin sedimentos ni flóculos.



Evaluación de la estabilidad (1 mes)



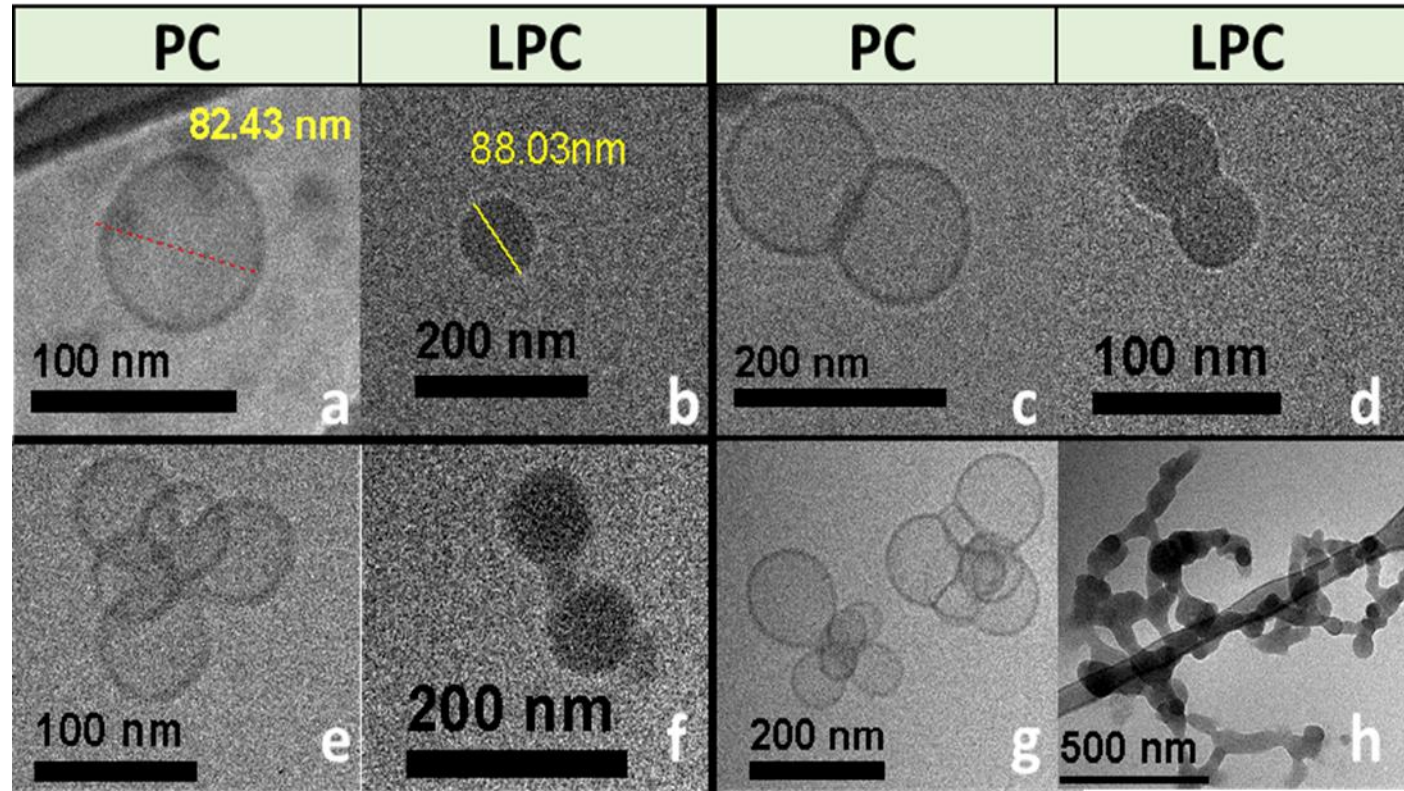
- El sist. No permite la transmisión de la luz,
- TP > 600 nm.
- No se observan precipitados



McClements, 2007

Morfología de las NE

Microestructura



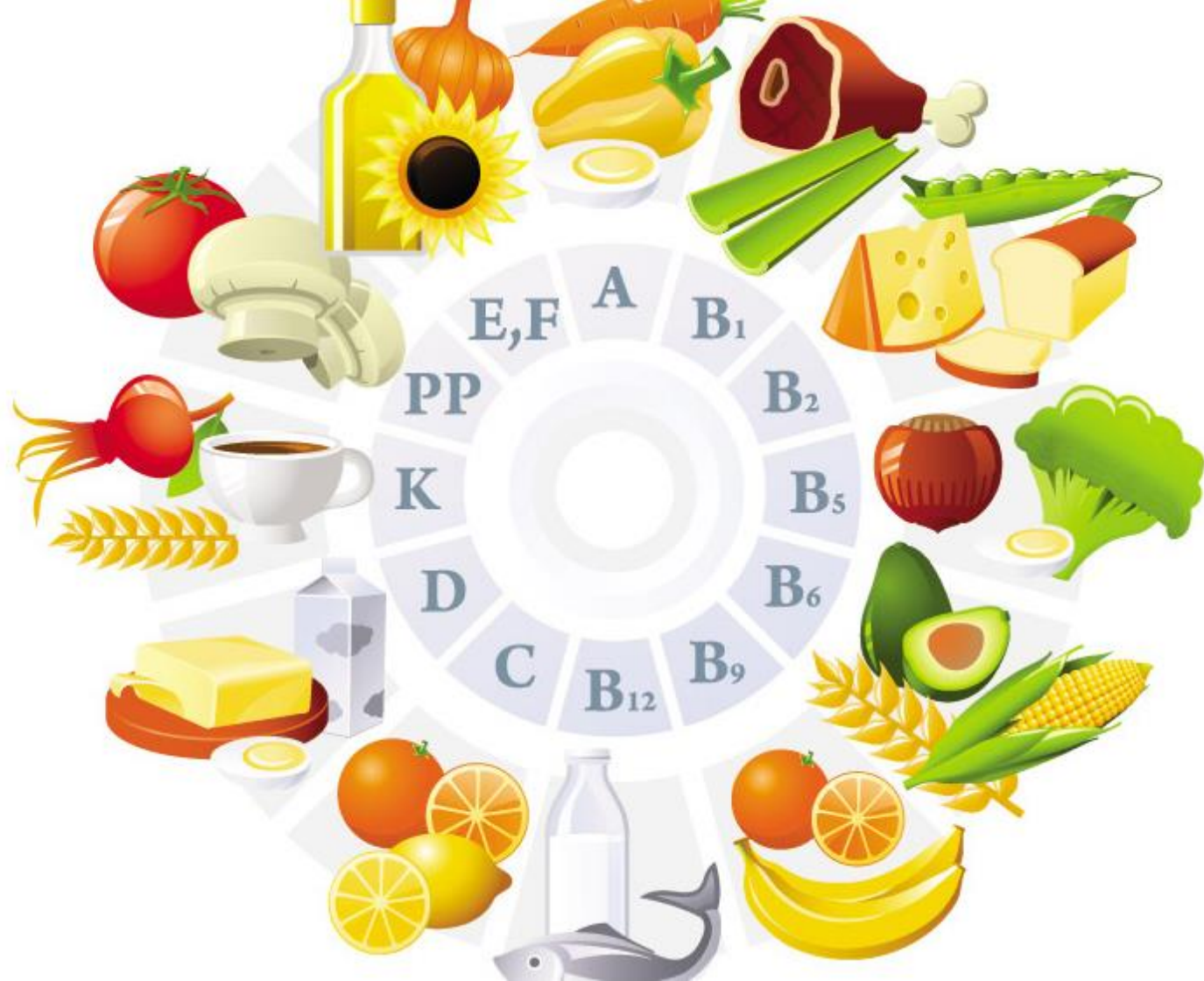
Micrografías Cryo-TEM de nanoemulsiones de fitoesteroles formuladas con fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina.

Conclusiones

- ✓ Se lograron formular NE O/W de FE con los emulsificantes especificados, superando la dificultad de solubilizar los FE al aumentar la temperatura, tanto en la fase dispersa (105°C) como en la continua (90°C), sin mayores alteraciones en los componentes.
- ✓ Se evaluaron las características físicas y químicas de las emulsiones. En cuanto a las características físicas, se lograron obtener emulsiones con tamaños de partícula de 67.9, 111.3 y 127.65 nm (diámetro promedio) iniciales para las emulsiones formuladas con LPC, PC y LPC-AGCM, respectivamente.
En cuanto a la estabilidad oxidativa, se encontró que el orden en el que los emulsificantes evaluados brindaron mayor protección fue LPC-AGCM > PC > LPC, evidenciado en los valores de peróxido, contenido de POFs encontrado y conservación de la concentración de FE a 37°C. Al tener más ácidos grasos saturados o de cadena media, las emulsiones fueron menos susceptibles a la oxidación y desestabilización.

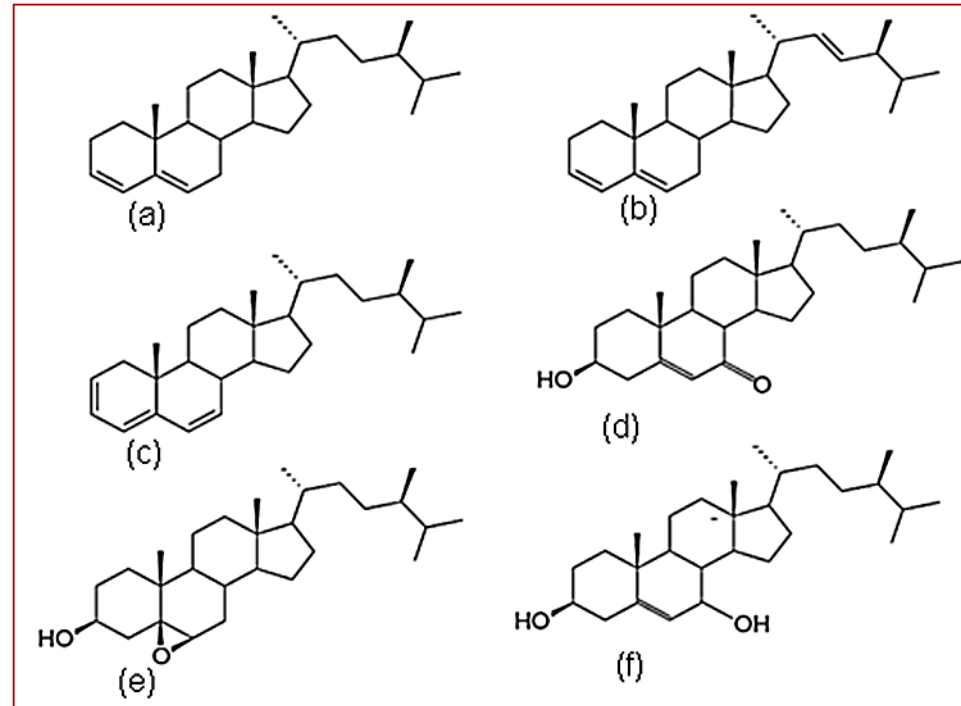
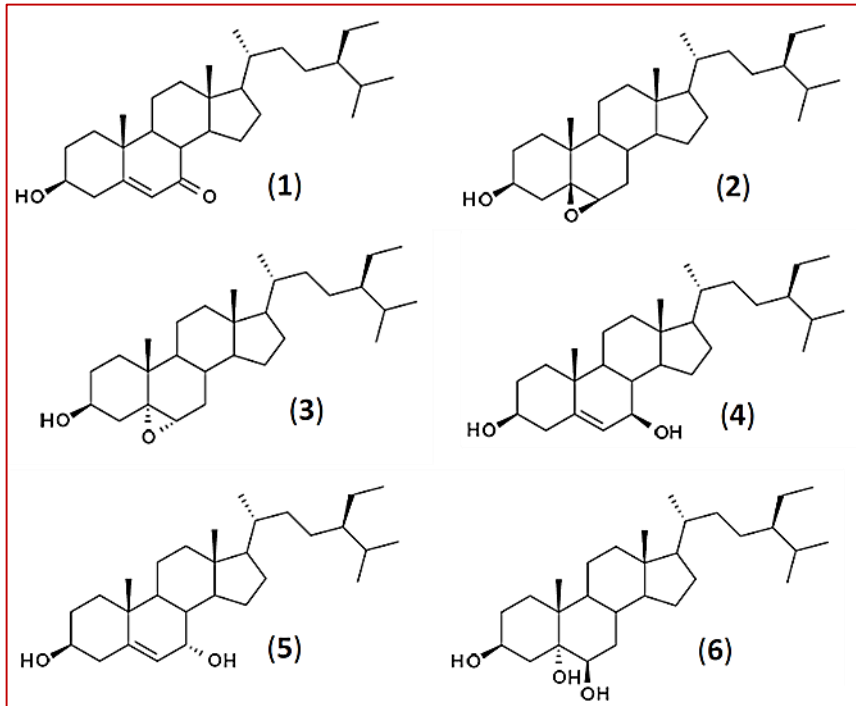
Conclusiones

- ✓ La estabilidad de las NE se evaluó durante 1 mes. Se encontró que las emulsiones preparadas con PC fueron estables durante todo el mes tanto a 37°C como a 4°C. Mientras que, las emulsiones preparadas con LPC, se desestabilizaron tanto a 37°C como a 4°C, aunque no en el mismo tiempo (4 días y 9 días, respectivamente). Por lo tanto, se encontró que la estabilidad de las emulsiones es afectada principalmente por la composición de ácidos grasos de los emulsificantes evaluados y a 4°C solo se retarda este proceso.
- ✓ La microscopia permitió elucidar los fenómenos de inestabilidad que gobernaban a los sistemas (floculación, coalescencia), y que complementan a los estudios de estabilidad óptica.
- ✓ El sistema que presentó un mejor comportamiento físico, químico y por lo tanto mejor estabilidad en el tiempo, al preparar NE O/W de fitoesteroles con emulsificantes naturales, fue el desarrollado con fosfatidilcolina (PC) bajo las condiciones evaluadas.



GRACIAS

Phytosterol oxidation products



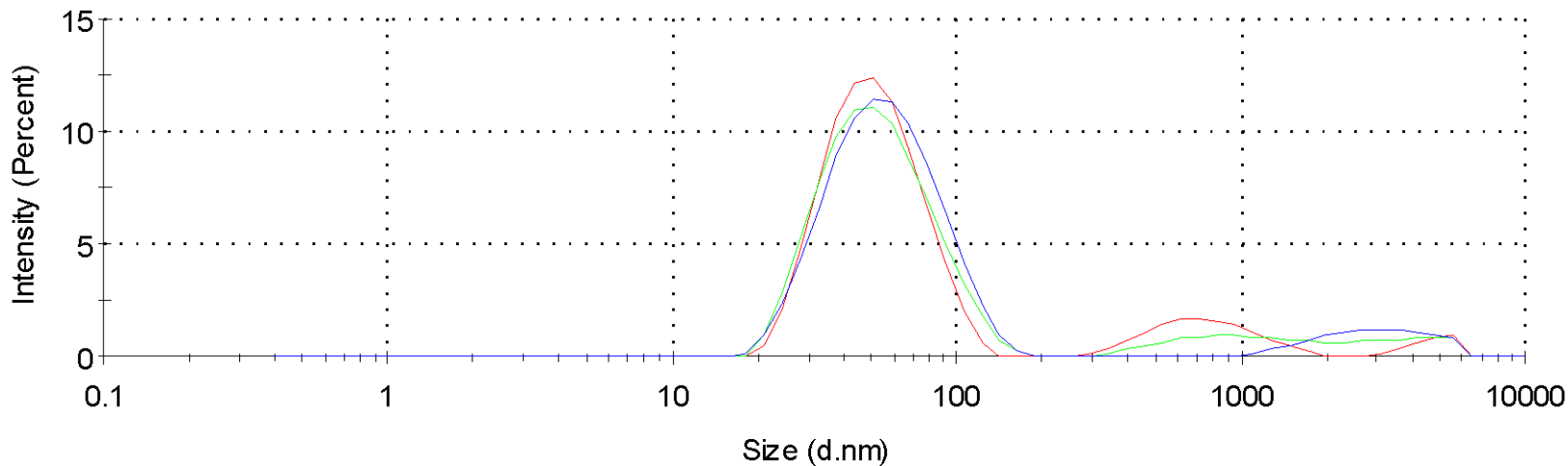
β -Sitosterol oxides

	Name
(1)	7-ceto-Sitosterol
(2)	5,6 β -epoxy-Sitosterol
(3)	5,6 α -epoxy-Sitosterol
(4)	7 β -hydroxy-Sitosterol
(5)	7 α -hydroxy-Sitosterol
(6)	Sitostanetriol

Campesterol oxides

	Name
(a)	Campesta -3,5-dieno
(b)	Campesta -3,5,22-trieno
(c)	Campesta -2,4,6-trieno
(d)	7-ceto-campesterol
(e)	5,6-epoxy-campesterol
(f)	7-hydroxy-campesterol

Size Distribution by Intensity



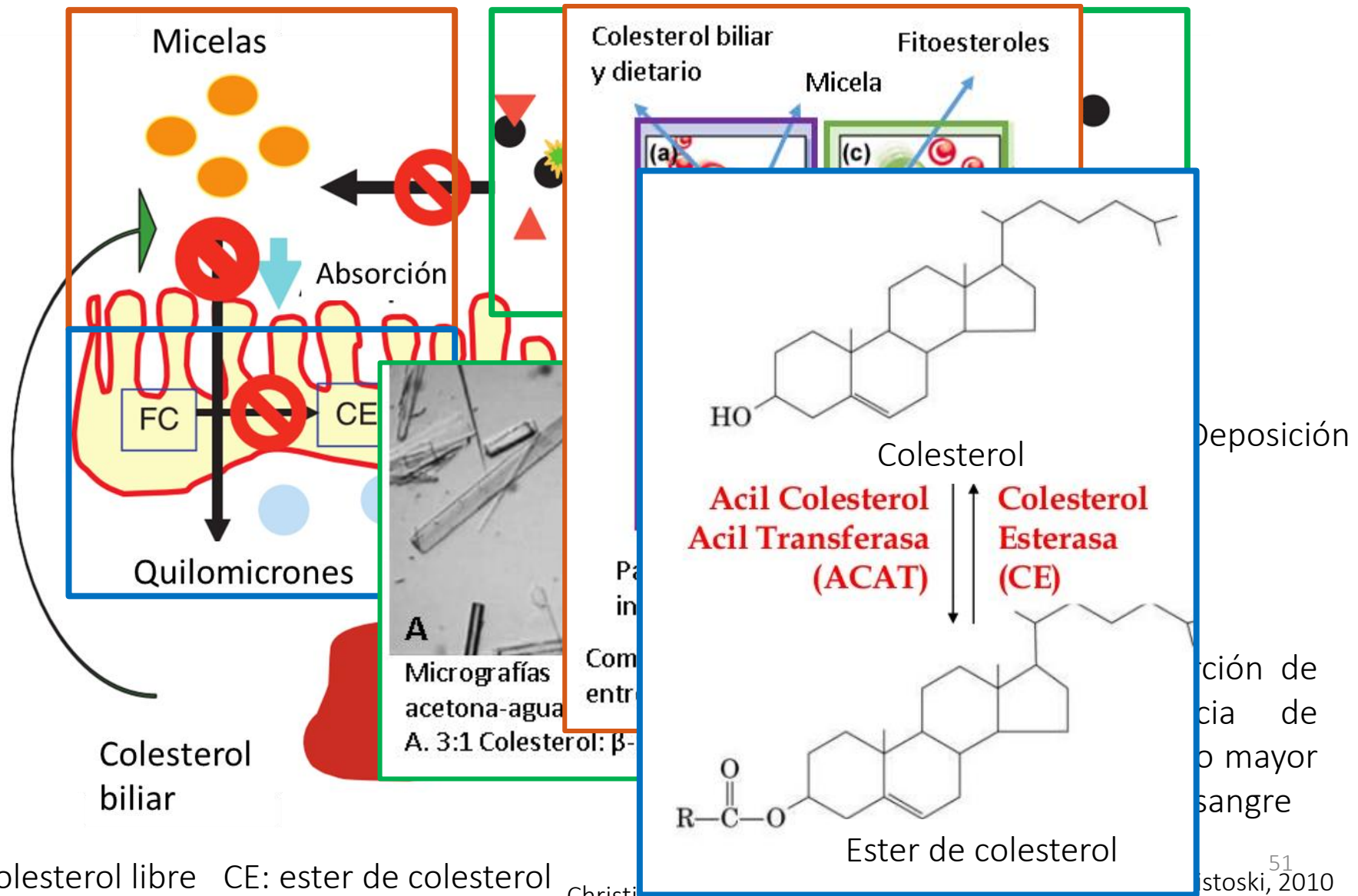
Lpc Autor ok.

- -
 -
- Record 13: Lpc 2 ok 26 sept 1 Record 14: Lpc 2 ok 26 sept 2
 Record 15: Lpc 2 ok 26 sept 3

Lpc Autor ok.

Media	Moda	Mediana	D90	D50	Z-Aver
330,44	37,73	60,09	693,03	51,99	56,00

Mecanismo de acción hipocolesteremiante



FC: Colesterol libre CE: ester de colesterol

POPs effects in humans

POPs ingested on diet are absorbed in tissues
The POPs absorption rate depends on type of phytosterol and phytosterol oxide

~~Genotoxicity~~

Subchronic Toxicity

128 mg/Kg/día

Cytotoxicity and pro-inflammatory potential

Pro-atherogenic effect

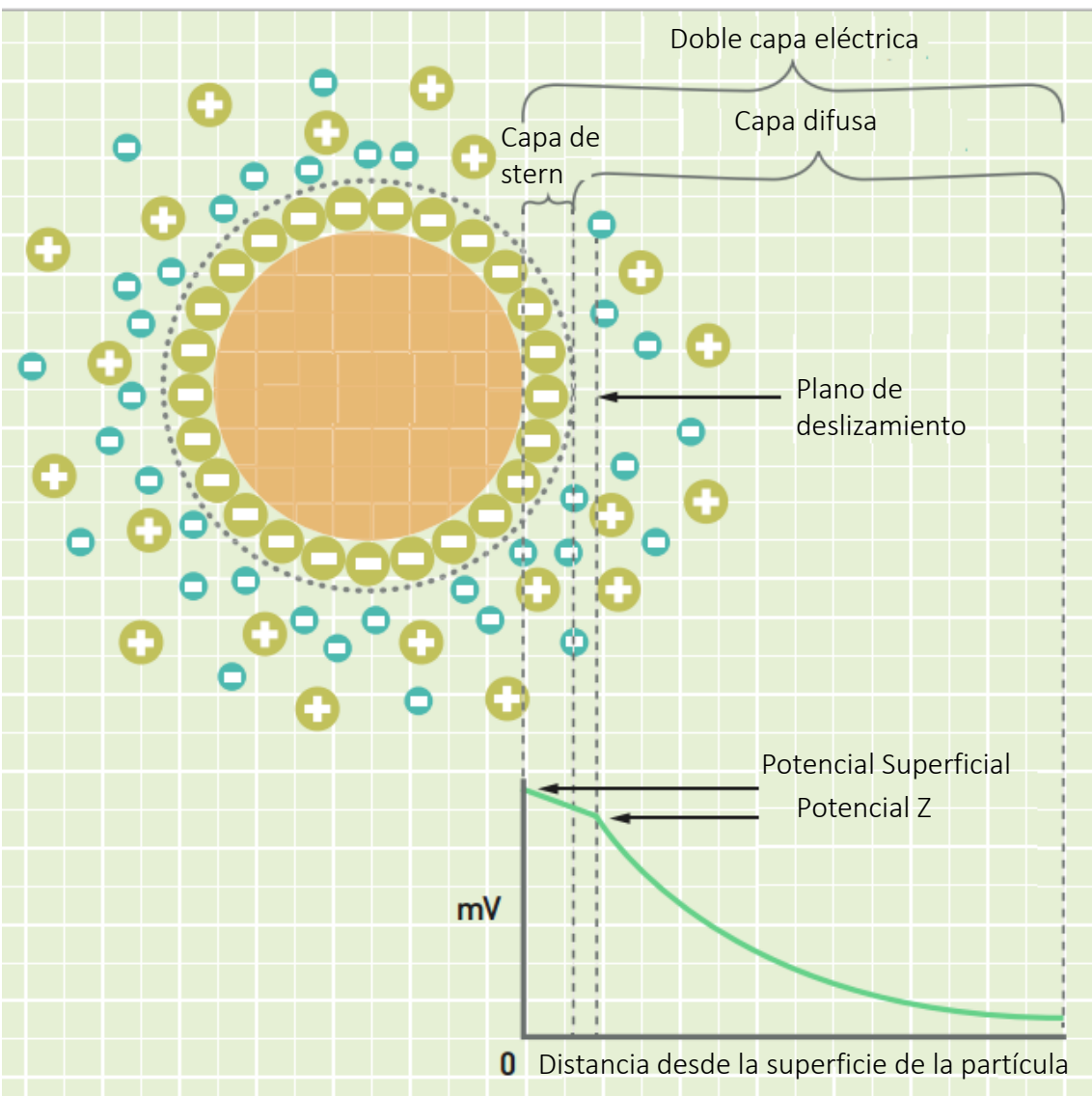
Lost its hypocholesterolemic properties

Similar cytotoxic effect with Cholesterol Oxidation Products (COPs) but in higher concentrations (>60µM). 5 times less effect

In vitro has shown pro-inflammatory effect. Rising TNF-α, IL-8 e IL-10

(Cercaci et al. 2007)

Potencial Z

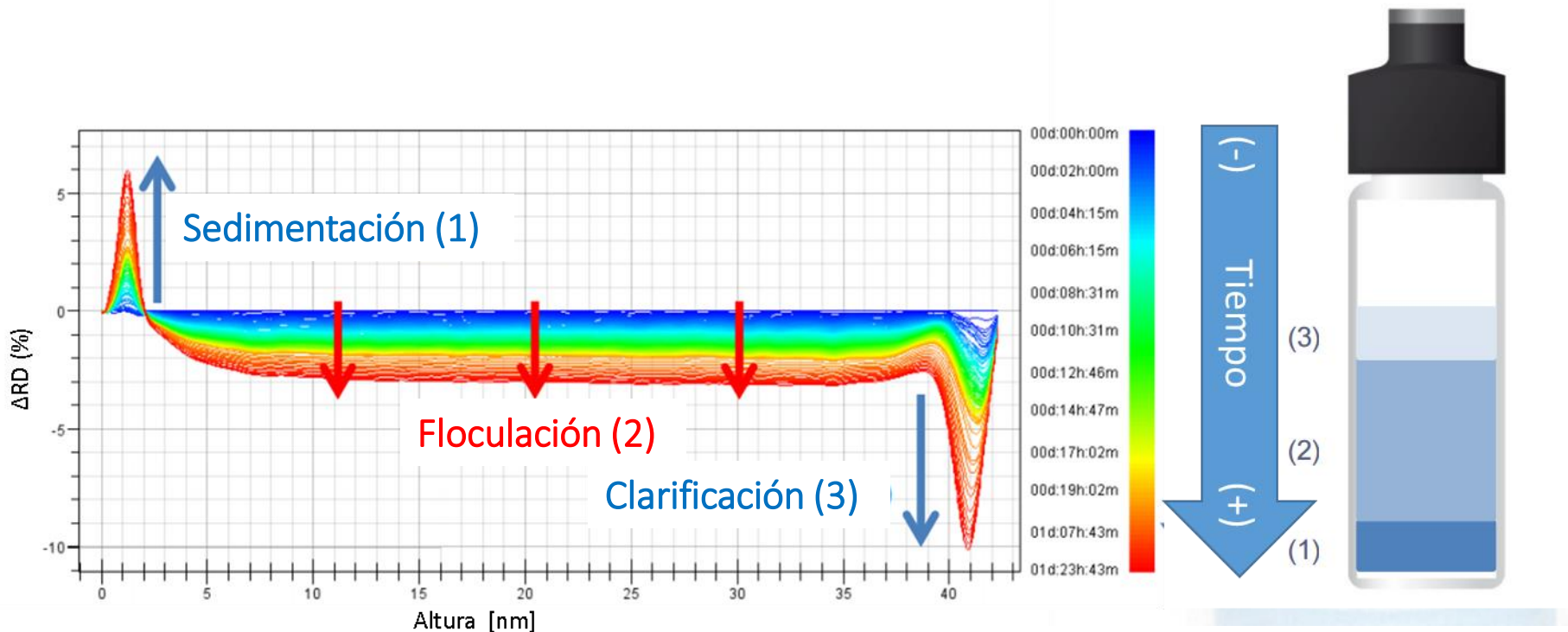


Técnica: Microelectroforesis Laser- Doppler

La velocidad con la que se mueven las moléculas se determina con análisis de fase de luz difusa, este valor permite determinar la movilidad electroforética y por lo tanto el potencial z.

Turbiscan

Tecnología: dispersión múltiple de luz estática (MLS) a través de la altura de la muestra. Fuente de luz: NIR a 880 nm.



$$RD \approx \left[\frac{1}{l^*} \right]^2 \quad l^* = \left[\frac{2d}{3\Phi(1-g)Q_s} \right]$$

$$TSI = \sum_i \frac{\sum_h |scan_i - scan_{i-1}|}{H}$$

TSI vs Tiempo = Cinética de desestabilización