

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**ASTAXANTINA MICROENCAPSULADA EN OLEOSOMAS: UN
INGREDIENTE FUNCIONAL PARA LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS.
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD Y DIGESTIBILIDAD *in vitro*.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

ELÍAS ALBERTO VILCHES MOLINA

TEMUCO-CHILE

2014

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**ASTAXANTINA MICROENCAPSULADA EN OLEOSOMAS: UN
INGREDIENTE FUNCIONAL PARA LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS.
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD Y DIGESTIBILIDAD *in vitro*.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

ELÍAS ALBERTO VILCHES MOLINA

PROFESOR GUÍA: DRA. FRANCISCA ACEVEDO CANALA-ECHEVARRÍA

**TEMUCO-CHILE
2014**

**ASTAXANTINA MICROENCAPSULADA EN OLEOSOMAS: UN INGREDIENTE
FUNCIONAL PARA LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD
Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*.**

PROFESOR GUÍA:

Dra. Francisca Acevedo Canala-Echevarría
Químico Farmacéutico
Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola

PROFESOR CONSEJERO:

Dra. Mónica Rubilar Díaz
Ingeniero en Alimentos
Departamento de Ingeniería Química
Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS:

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 6 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 12 |
| 2.1 Astaxantina..... | 12 |
| 2.1.1 Aspectos generales..... | 12 |
| 2.1.2 Propiedades químicas de la astaxantina..... | 13 |
| 2.1.3 Digestión de la astaxantina..... | 13 |
| 2.1.4 Inocuidad de la astaxantina..... | 14 |
| 2.1.5 Beneficios a la salud..... | 14 |
| 2.1.6 Microencapsulación de la astaxantina..... | 16 |
| 2.2 Oleosomas..... | 17 |
| 2.2.1 Aspectos generales..... | 17 |
| 2.2.2 Oleosinas..... | 18 |
| 2.2.3 Aplicaciones de los oleosomas..... | 19 |
| 2.3 Digestión in vitro..... | 19 |
| 2.3.1 Aspectos generales..... | 19 |
| 2.3.2 Digestión gástrica in vitro..... | 20 |
| 2.3.3 Digestión intestinal in vitro..... | 20 |
| 2.4 Hipótesis..... | 20 |
| 2.5 OBJETIVO GENERAL..... | 20 |
| 2.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 22 |
| 3.1 Análisis proximal de las semillas de Brassica Napus..... | 22 |
| 3.1.1 Determinación del contenido de humedad..... | 22 |
| 3.1.2 Determinación de cenizas..... | 22 |
| 3.1.3 Determinación de proteínas..... | 22 |
| 3.1.4 Determinación del extracto etéreo..... | 23 |
| 3.1.5 Determinación de la fibra cruda..... | 23 |
| 3.1.6 Determinación del extracto no nitrogenado..... | 24 |
| 2.1 Extracción de oleosomas..... | 24 |
| 3.2 Extracción de oleosomas..... | 24 |
| 3.3 Microencapsulación de astaxantina en oleosomas..... | 25 |
| 3.4 Evaluación de propiedades y estabilidad fisicoquímica de los oleosomas libres y cargados con astaxantina..... | 25 |
| 3.4.1 Evaluación de la tensión superficial en oleosomas libres y cargados con astaxantina..... | 25 |
| 3.4.2 Determinación de potencial zeta y tamaño de partícula..... | 26 |
| 3.4 Evaluación de la digestibilidad in vitro de los oleosomas..... | 27 |
| 3.4.1 Digestión gástrica..... | 28 |

| | |
|---|----|
| | 5 |
| 3.4.2 Digestión intestinal..... | 29 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 30 |
| 4.3 Evaluación de la capacidad de romper la tensión superficial de oleosomas libres y cargados con astaxantina..... | 31 |
| 4.4 Evaluación de la digestibilidad in vitro de los oleosomas libres y cargados con astaxantina..... | 33 |
| 4.4.1 Digestión gástrica..... | 33 |
| 4.4.2 Digestión intestinal..... | 41 |
| 4.5 Evaluación del potencial zeta y tamaño de partícula..... | 44 |
| 4.5.1 Efecto del cambio de pH..... | 44 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 56 |
| 6. LITERATURA CITADA..... | 57 |
| 7. ANEXOS..... | 62 |

RESUMEN

La astaxantina es un pigmento, perteneciente a los carotenoides, que ha adquirido importancia en los últimos años por su alta capacidad antioxidante. Sin embargo, este compuesto es sensible a la oxidación, lo que ocasiona que pierda sus propiedades y dificulte su almacenamiento e incorporación en preparaciones alimentarias o farmacológicas.

Los oleosomas son organelos cuya función es almacenar lípidos en semillas de plantas, protegiéndolos de la oxidación. Estos organelos se caracterizan por su estabilidad. Por lo anterior se ha propuesto como alternativa utilizar oleosomas como microcápsula para proteger a la astaxantina de condiciones ambientales desfavorables, preservando así sus propiedades bioactivas.

En este estudio, se evaluaron la estabilidad fisicoquímica y la digestibilidad gástrica e intestinal *in vitro*, tanto de oleosomas puros como de oleosomas cargados con astaxantina (astaxantina microencapsulada).

Para evaluar la estabilidad fisicoquímica, se midió la actividad tensioactiva de oleosomas puros y cargados con astaxantina. Por otra parte, se midió el potencial zeta y el tamaño de partícula de oleosomas puros y cargados con astaxantina, respecto a variaciones de pH, temperatura y fuerza iónica. La digestibilidad gástrica e intestinal también fue analizada sobre oleosomas puros y cargados con astaxantina, y se estudiaron mediante pruebas *in vitro*, usando pepsina y pancreatina respectivamente, en donde el efecto de la digestión gástrica se analizó mediante la hidrólisis de proteínas (a través de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida), y el efecto de la digestión intestinal mediante la liberación de ácidos grasos (a través del método pH-Stat).

Respecto a la estabilidad fisicoquímica los resultados de este estudio sugieren que los oleosomas puros y cargados con astaxantina poseen actividad tensioactiva. Además se mantienen estables frente a cambios de pH y temperatura, no así frente a un aumento en la fuerza iónica.

En cuanto a la digestibilidad, los resultados indican que a nivel gástrico tanto oleosomas puros como cargados con astaxantina pierden su estructura proteica, y a nivel intestinal liberan sus ácidos grasos, por lo que estos servirían como transportadores de compuestos bioactivos de interés, puesto que liberan su contenido en el lugar del tracto digestivo en donde se realiza la absorción (intestino delgado). De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, los oleosomas serían un material encapsulante adecuado para compuestos bioactivos lipofílicos que requieran protección para ser liberados en el tracto digestivo, como es el caso de la astaxantina. De esta forma, son una buena alternativa para su empleo como ingrediente funcional en aplicaciones alimentarias.

SUMMARY

Astaxanthin is a pigment that belongs to the group of carotenoids, which has gained importance in recent years due to its high antioxidant capacity. However, this compound is sensitive to oxidation, resulting in the losing of its properties and difficulties to storage and incorporate it into food or pharmaceutical preparations.

Oleosomes are organelles whose function is to store lipids in plant seeds, protecting them from oxidation. These organelles are characterized by their stability. Therefore it has been proposed as an alternative to use this as organelles as a microcapsule to protect astaxanthin from unfavorable environmental conditions, thus preserving their bioactive properties.

In this study, the physicochemical stability and the gastric and intestinal digestibility *in vitro*, from both, pure oleosomes and oleosomes loaded with astaxanthin (microencapsulated astaxanthin) were evaluated.

To evaluate the stability, the surface activity was measured. Moreover, the zeta potential and the particle size on the variations in pH, temperature and ionic strength was measured. Gastric and intestinal digestion were studied by *in vitro* tests where the effect of gastric digestion was analyzed by protein hydrolysis (by Polyacrylamide Gel Electrophoresis), and the effect of intestinal digestion by fatty acid release (through pH-Stat method).

Regarding stability, the results of this study suggest that pure oleosomes and oleosomes loaded with astaxanthin possess surface activity. Furthermore they are stable to changes in pH and temperature, but not against an increase in ionic strength.

As digestibility, the results indicate that both pure oleosome and oleosomes loaded with astaxanthin, at a gastric level, lost their protein structure, and at an intestinal release they release their fatty acids, which indicates that they can serve as carriers for bioactive compounds of

interest, since they release their contents in place of the digestive tract where absorption (small intestine) is performed. So we conclude that oleosomes loaded with astaxanthin can be incorporated into foods as functional ingredients.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la industria de los alimentos ha dado un giro hacia buscar ingredientes que posean cualidades adicionales a las comúnmente relacionadas con este tipo de productos, como mejorar sabor, color, aroma, textura y otras características orientadas a lo sensitivo. Estos ingredientes tienen la particularidad de cumplir una función agregada, como por ejemplo, afectar positivamente a la salud, prevenir enfermedades, mejorar funciones corporales; son los llamados “ingredientes funcionales”.

Un compuesto muy estudiado en la actualidad es la xantófila astaxantina, un carotenoide extraído principalmente de microalgas, que ha llamado la atención por su alta capacidad antioxidante, protegiendo al cuerpo de la acción de radicales libres, previniendo así enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, entre otras.

Además, se ha probado que es apta para el consumo humano y hasta la fecha no se ha evidenciado algún efecto negativo para la salud humana.

Sin embargo, este pigmento es altamente sensible a efectos del ambiente como cambios de pH, intensidad de luz, temperatura, etc. Esto hace que pierda todas sus propiedades biológicas de interés.

Se han propuesto diversos métodos para evitar esta pérdida de cualidades. Dentro de estas alternativas está la de microencapsular la astaxantina en alguna matriz que la proteja de los efectos adversos. Han sido estudiadas diversas matrices, mayoritariamente artificiales.

Por otra parte existen en el reino vegetal cápsulas naturales, llamadas oleosomas, que cumplen la función de proteger su contenido de la oxidación por algún agente externo. Estos son organelos encontrados en semillas de oleaginosas, son utilizados para almacenar los lípidos que la planta necesitará más adelante, y se caracterizan por ser altamente estables frente a diversos factores, manteniendo intactas las reservas energéticas de estos vegetales.

Surge entonces la idea de utilizar esta cápsula natural para proteger la molécula de astaxantina de ser oxidada.

Para este propósito, es importante estudiar la estabilidad de esta cápsula una vez que contiene la astaxantina, y la capacidad de transportar de manera oportuna su contenido a través del tracto digestivo, entregando en el lugar adecuado el pigmento, para ser absorbido y, finalmente, incorporado por el organismo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Astaxantina

2.1.1 Aspectos generales. Los carotenoides son pigmentos orgánicos que, en la naturaleza, son producidos principalmente por organismos fotosintéticos como plantas, algas y diversos microorganismos, aunque también existen microorganismos no fotosintéticos que pueden sintetizar carotenoides (Dutta et al., 2010).

Los carotenoides son tetraterpenos liposolubles y se pueden agrupar en dos clases principales: carotenos y xantófilas (Sajilata et al., 2008). Los primeros son hidrocarburos que pueden ser lineales o cíclicos en uno o los dos extremos de la molécula; como ejemplo α -caroteno y β -caroteno. Las xantófilas son los derivados oxigenados de los carotenos. La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β -caroteno-4,4'-diona) es un carotenoide perteneciente al grupo de las xantófilas, de color rojizo y abundante en animales marinos como el salmón, cangrejo, y crustáceos que viven en ambientes que contienen plancton y microalgas que poseen este pigmento. Se cree que el alga verde unicelular *Haematococcus pluvialis* tiene la más alta capacidad de acumular astaxantina en la naturaleza, bajo condiciones de estrés ambiental como inanición, alta salinidad, elevada temperatura o irradiación (Sarada et al., 2002). La astaxantina producida por *Haematococcus pluvialis* es una de las principales fuentes naturales de astaxantina para consumo humano (Lee et al., 2013).

La astaxantina es bien conocida por su potente capacidad antioxidante, lo que presumiblemente contribuye a sus diversas propiedades protectoras contra enfermedades neurodegenerativas, diabetes, enfermedades cardiovasculares, entre otras (Olaizola et al., 2003; Yuan et al., 2011). Por lo tanto, el uso de astaxantina como un suplemento dietario para una salud óptima ha aumentado rápidamente en los últimos años (Lee et al., 2013).

2.1.2 Propiedades químicas de la astaxantina. La astaxantina es soluble en aceite, con un peso molecular de 596,841 g/mol. Su fórmula molecular es $C_{40}H_{52}O_4$. Es lipofílica e insoluble en soluciones acuosas y en la mayoría de los solventes orgánicos, aunque puede ser disuelta a temperatura ambiente en diclorometano, cloroformo, acetona, dimetilsulfóxido y otros solventes no polares. Está compuesta de una cadena polieno (esto es, formada por enlaces carbono-carbono simples y dobles, de manera alterna) extendida (Dutta et al., 2010). Además, como otros carotenoides, posee dos anillos de carbono en los extremos, sin embargo, la astaxantina se diferencia en su estructura de otros carotenoides por la presencia de grupos hidroxilo y cetona en ambos extremos. Esta estructura polar-apolar-polar de la astaxantina permite que se alinee en la doble capa de la membrana celular y exponga ambos extremos hidrofílicos al ambiente acuoso (Pashkow et al., 2008). La astaxantina en forma libre es sensible a la oxidación, por lo tanto en la naturaleza, la astaxantina existe principalmente en una forma conjugada con proteínas, como en exoesqueletos de crustáceos, o esterificada (Olaizola et al., 2003; Lee et al., 2013).

Dufossé et al. (2005) señalaron que la astaxantina tiene algunas ventajas sobre otros carotenoides: más estable comparada a otros carotenoides, alto potencial antioxidante y puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica.

2.1.3 Digestión de la astaxantina. Debido a la baja solubilidad en ambientes acuosos, las xantófilas tienen una biodisponibilidad más baja que otros lípidos dietarios como los triglicéridos (Kotake-Nara y Nagao, 2011). Sin embargo, debido a la presencia de extremos polares en la astaxantina libre, esta puede ser absorbida mejor que otros carotenoides no polares como licopeno y β -caroteno (Ranga Rao et al., 2010). Como la astaxantina está presente mayoritariamente en su forma esterificada en la naturaleza, los ésteres de astaxantina necesitan ser hidrolizados para liberar la astaxantina y subsecuentemente sea incorporada en micelas para tener acceso a las células intestinales y así puedan ser absorbidas. La enzima colesterol esterasa es una posible candidata para la función de hidrolizar los ésteres de la astaxantina (Nagao, 2011). Se sabe que la presencia de aceite dietario afecta el grado de absorción de la astaxantina en el

intestino delgado (Okada et al., 2009). En humanos, la incorporación de astaxantina en una formulación basada en lípidos puede mejorar la absorción de astaxantina (Mercke Odeberg et al., 2003).

2.1.4 Inocuidad de la astaxantina. La astaxantina ha demostrado ser segura para el consumo humano (Spiller y Dewell, 2003). Hasta la fecha, no se han reportado efectos secundarios adversos de la suplementación con astaxantina en humanos. En el 2010 la Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) de Estados Unidos reconoció el estado de “generalmente reconocido como seguro (generally recognized as safe, GRAS)” de la astaxantina extraída de *Haematococcus pluvialis* (Lee et al., 2013).

2.1.5 Beneficios a la salud.

2.1.5.1 Actividad antioxidante. Se ha identificado al estrés oxidativo como una de las mayores causas relacionadas al envejecimiento, enfermedades cardiovasculares, enfermedades hepáticas y otras (Wojcik et al., 2010). Los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO) son altamente inestables y reaccionan rápidamente con moléculas adyacentes para obtener electrones, iniciando reacciones en cadena. Una acumulación excesiva de estas especies y radicales reactivos pueden gatillar daño oxidativo a nucleótidos, proteínas o lípidos, eventualmente deteriorando actividades celulares y causando daño y muerte celular (Jones, 2008). Los radicales libres y las EROs se producen en procesos metabólicos normales y son rápidamente neutralizados por el organismo, mediante una compleja red consistente en moléculas y enzimas antioxidantes (Chow, 1979).

Se ha demostrado que los carotenoides pueden neutralizar al oxígeno singulete así como también tienen la capacidad de detener la reacción en cadena generada por el fenómeno de peroxidación lipídica (Dutta et al., 2010). Esta capacidad por lo general se atribuye a la actividad de la cadena de polieno e incrementa con el número de doble enlaces conjugados a lo largo de ésta (Cardounel

et al., 2003).

La astaxantina ha mostrado ejercer propiedades antioxidante superiores al β -caroteno en un número de estudios *in vitro* (Lawlor y O'Brien, 1995; Palozza y Krinsky, 1992).

2.1.5.2 Enfermedades cardiovasculares. Estudios epidemiológicos indican que el consumo de antioxidantes en la dieta pueden proteger ante enfermedades cardiovasculares (Kritchevsky, 1999).

La astaxantina puede beneficiar a la salud modificando los niveles sanguíneos de colesterol LDL y HDL (Olaizola et al., 2003). La astaxantina inhibe la oxidación de la lipoproteína de baja densidad, previniendo la aterosclerosis, estabilizando la placa de ateroma, reduciendo el riesgo de infarto de miocardio, y disminuyendo altas presiones sanguíneas, sugiriendo que puede ser útil para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular. Además la astaxantina puede ser también benéfica a la salud cardíaca reduciendo la inflamación asociada presumiblemente al desarrollo de enfermedad coronaria cardíaca (Dutta et al., 2010).

2.1.5.3 Enfermedades neurodegenerativas. El sistema nervioso es rico en grasas insaturadas (las que tienden a oxidarse) y hierro (que tiene propiedades pro-oxidantes) (Olaizola et al., 2003). Ambos, junto con la intensa actividad aeróbica metabólica y la rica irrigación con vasos sanguíneos hace que los tejidos del sistema nervioso sean particularmente susceptibles a daño oxidativo (Facchinetti et al., 1998). Existe evidencia científica que muestra que el estrés oxidativo es causante o al menos es un factor incidente en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas más importantes, y que dietas ricas en antioxidantes ofrecen el potencial para bajar los riesgos asociados (Dutta et al., 2010).

Las actividades antioxidante, antiinflamatoria y neuroprotectora, combinadas con la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica sugieren que la astaxantina puede ser benéfica en la prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Dutta et al., 2010; Olaizola et al., 2003).

2.1.5.4 Actividad antidiabética. La astaxantina puede ejercer efectos benéficos sobre la diabetes a través de la disminución de la toxicidad de la glucosa y preservación de la función de las células β (Dutta et al., 2010). La astaxantina ha mostrado reducir significativamente los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos comparados con los controles (Uchiyama et al. 2002). La astaxantina también reduce el daño renal producido por estrés oxidativo a partir de la diabetes (Naito et al., 2004).

2.1.5.5 Fotoprotección. Los carotenoides tienen un importante rol en la naturaleza en proteger tejidos contra la foto-oxidación mediada por la luz UV y con frecuencia se encuentran en tejidos directamente expuestos a la luz solar (Olaizola et al., 2003). La potente actividad antioxidante de la astaxantina sugiere su potencial fotoprotector contra la radiación UV, incluso más efectivamente que el β -caroteno y luteína (O'Connor y O'Brien, 1998).

2.1.5.6 Protección celular. Los antioxidantes, en particular los carotenoides, no sólo son esenciales para la salud celular porque ayudan a proteger componentes celulares contra el daño oxidativo sino que también porque cumplen un rol en regular la expresión genética e inducir comunicaciones célula a célula (Allen y Tresini, 2000).

En la mitocondria, múltiples reacciones en cadena oxidativas generan la energía necesaria para la célula, pero produce altas cantidades de radicales libres que necesitan ser neutralizados para mantener una función mitocondrial adecuada (Olaizola et al., 2003). La astaxantina tiene un importante rol en proteger membranas celulares y se cree que deriva de su habilidad para proteger tanto la superficie interna como externa de las membranas contra la oxidación (Matsushita et al., 2000; Barros et al., 2001).

2.1.6 Microencapsulación de la astaxantina. Debido a las propiedades ideales de la astaxantina se han buscado diversas maneras de protegerla. Una de estas vías es la de la microencapsulación, técnica que encierra gotas líquidas de pequeñas partículas dentro de un material protector en una matriz sólida de polímeros (Bae y Lee, 2008).

En la industria de los alimentos, la microencapsulación por secado spray es una de las técnicas

más empleadas, por su simpleza y porque transforma el material desde un estado líquido a un estado sólido en polvo entregando diversas ventajas y comodidades (Barragán-Huerta et al. 2013).

Como material de pared se pueden utilizar diversos compuestos, en el caso de la astaxantina se ha utilizado caseinato de sodio y lactosa (Pu et al. 2011), como también goma arábiga, maltodextrina e inulina (Barragán-Huerta et al. 2013).

2.2 Oleosomas

2.2.1 Aspectos generales. En todas las células, los lípidos requeridos para energía son almacenados en cuerpos lipídicos, también llamados gotas de lípidos u oleosomas.

El lugar utilizado mayoritariamente para la acumulación de lípidos en plantas son las semillas, puesto que la germinación y el establecimiento de la plántula requieren una alta entrada de energía (Chardot et al., 2008).

La gran mayoría de las semillas almacena sus lípidos en forma de triacilgliceroles (TAG) (Voelker y Kinney, 2001).

Usando microscopía electrónica de transmisión, Yatsu y Jacks (1972) propusieron un modelo estructural para los oleosomas en donde la matriz de TAG está rodeada por una monocapa de fosfolípidos con su cabeza expuesta hacia el citosol y las fracciones acil hacia adentro para interactuar con los TAG, modelo que luego fue confirmado por otros estudios (Beisson et al., 1996).

Sólo un pequeño número de proteínas están asociadas específicamente con los oleosomas de semillas de plantas. Sin embargo, este número suele variar dentro de las especies vegetales. Todas ellas pertenecen a tres grandes grupos, comprendiendo las proteínas estructurales (oleosinas y caleosinas), enzimas (como lipasas) y proteínas menores (como acuaporinas) (Chardot et al., 2008).

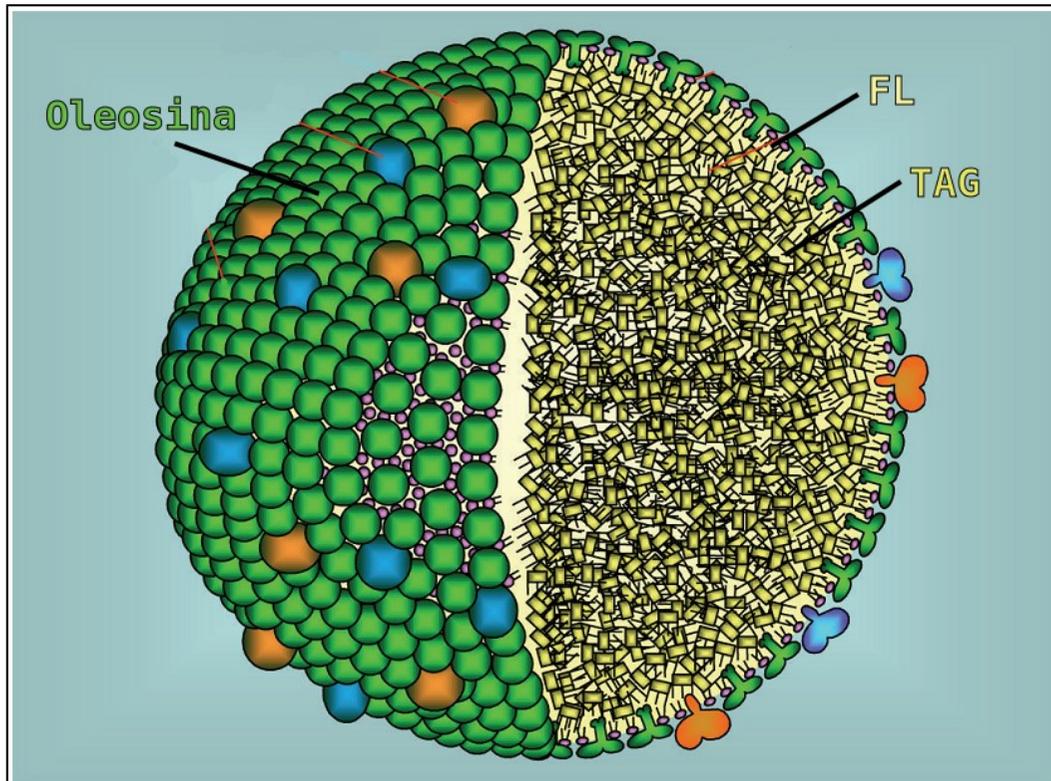


Figura 1: Estructura general del oleosoma: consta de una matriz de triacilglicérols (TAG) rodeada de una monocapa de fosfolípidos (FL). En la superficie de membrana existen proteínas, siendo las más importantes y numerosas las oleosinas. Modificado de Tzen, 2012.

2.2.2 Oleosinas. Las proteínas estructurales más abundantes de los oleosomas son las oleosinas, las que representan hasta el 1,6% del peso de la semilla. Las oleosinas son una clase de proteínas mayoritariamente alcalinas (10-53 kDa) que se cree son ubicuas en semillas almacenadoras de aceite (Huang, 1992).

La estructura primaria de las oleosinas es altamente conservada dentro de las especies. Su organización en tres dominios consistente de una región central altamente hidrofóbica flanqueada por dos extremos C y N-terminal más polares explica el mecanismo de inserción de la oleosina en el oleosoma (Vance y Huang, 1987).

El rol fisiológico propuesta para las oleosinas es mantener los oleosomas como pequeños organelos hasta la germinación. Ellas previenen la coalescencia de los oleosomas por

impedimento estérico y repulsión electrostática, gracias a la carga negativa de su capa externa (Tzen et al., 1998).

2.2.3 Aplicaciones de los oleosomas. Los oleosomas pueden servir como transportadores idóneos para moléculas hidrofóbicas (Acevedo et al., 2014), como compuestos nutracéuticos (por ejemplo, antioxidantes), medicamentos (por ejemplo, hormonas esteroidales) o ser incorporados en preparaciones cosméticas (Chardot et al., 2008). También han sido probados exitosamente para encapsular bacterias ácido-lácticas en productos de consumo diario (Hou et al., 2003).

2.3 Digestión *in vitro*

2.3.1 Aspectos generales. Para desarrollar ingredientes o alimentos funcionales con propiedades específicas, primero se debe tener conocimiento de cómo funciona el organismo, qué características bioquímicas serán las que enfrentará el producto con el que se trabaja y cómo se desenvolverá este producto bajo las diversas condiciones del tracto digestivo.

Para lo anterior se necesita simular de manera adecuada el ambiente que existe en cada etapa de la digestión.

Existen dos maneras de estudiar la digestión humana mediante modelos *in vitro*: modelo de un solo paso y modelo de múltiples pasos (McClements y Li, 2010). En el modelo de un solo paso se simula una región en particular del tracto digestivo, como la boca, el estómago, el intestino delgado o el colon. El método pH-Stat, por ejemplo, pertenece a este modelo de estudio puesto que sólo se enfoca en simular la digestión en el intestino delgado. Por otra parte en el modelo de múltiples pasos se simulan dos o más regiones del tubo digestivo.

Para cualquiera de los dos métodos, las muestras a estudiar son preparadas de una forma similar: por lo general son mezcladas con fluidos digestivos simulados, las soluciones son trabajadas a 37 °C para asimilar la temperatura del cuerpo humano, se aplican enzimas características de cada etapa de la digestión, entre otros pasos (McClements y Li, 2010).

2.3.2 Digestión gástrica *in vitro*. El estómago se caracteriza por su alta acidez, actividad enzimática específica y movimientos mecánicos propios. Los modelos de digestión gástrica más simples comprenden el ajuste del pH de la muestra a uno altamente ácido, por un periodo de tiempo específico con alguna forma de agitación mecánica (McClements y Li, 2010).

In vivo el pH del estómago se encuentra entre 1 y 3 (Kalantzi et al., 2006). La alta acidez encontrada en el estómago juega un importante rol en funciones fisiológicas como activar enzimas, hidrólisis de componentes alimenticios e inactivación de microorganismos (McClements y Li, 2010). En el estómago actúa principalmente la enzima pepsina, que tiene por función hidrolizar proteínas.

2.3.3 Digestión intestinal *in vitro*. En esta etapa los aspectos más importantes a considerar son el cambio de pH, desde ácido a neutro, la actividad de enzimas (principalmente lipasa), la presencia de surfactantes, como la bilis, entre otros. Para ello se preparan fluidos intestinales simulados (FIS) de diversa composición y complejidad (McClements y Li, 2010).

En el tubo digestivo, el intestino delgado es la región donde ocurre la mayor parte de la digestión de los lípidos y además es donde tiene lugar la absorción de los nutrientes (McClements y Li, 2010)

2.4 Hipótesis

Los oleosomas podrán ser utilizados como transportadores de astaxantina y serán capaces de liberar su contenido a través de la digestión *in vitro*, demostrando su idoneidad para ser incorporados como ingrediente funcional en alimentos.

2.5 Objetivo general

Evaluar la digestibilidad *in vitro* de un ingrediente funcional conteniendo astaxantina microencapsulada

2.6 Objetivos específicos

1. Evaluar la estabilidad fisicoquímica de oleosomas puros y cargados con astaxantina
2. Evaluar la digestibilidad gástrica e intestinal *in vitro* de oleosomas libres y cargados con astaxantina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Análisis proximal de las semillas de *Brassica Napus*

El análisis proximal (AOAC, 1990) corresponde a la determinación en conjunto de una serie de sustancias relacionadas entre sí. En general comprende la determinación del contenido de agua (humedad), proteína, grasa, ceniza, fibra y sustancias extraíbles no nitrogenadas.

3.1.1 Determinación del contenido de humedad. Se pesaron $2 \pm 0,001$ g de muestra en una cápsula de aluminio previamente tarada y desecada. Luego la muestra se desecó en estufa a 103 ± 2 °C por tres horas. Se retiró la cápsula de la estufa y se enfrió en desecador. Se pesó tan pronto como se equilibró a la temperatura ambiente. Más adelante se volvió a introducir la cápsula en la estufa. La operación se repitió hasta que las variaciones entre las dos pesadas sucesivas no excedieron los 2 mg. El peso perdido por la muestra se expresó como porcentaje de humedad.

3.1.2 Determinación de cenizas. Se pesó una cantidad de 0,5 g de muestra en una cápsula de incineración previamente tarada tras haber sido incinerada. Una vez pesada la muestra, se procedió a quemarla en mechero, evitando su inflamación hasta la obtención de cenizas blancas o grisáceas. Luego se incineró en una mufla hasta que las cenizas adquirieron completamente un color blanco grisáceo. Después se llevó directamente al desecador, se enfrió a temperatura ambiente y se pesó de inmediato. La incineración se realizó a 550 ± 25 °C.

3.1.3 Determinación de proteínas. Se realizó mediante el método de Kjeldahl. Se pesó 1 g de muestra seca. Se depositó la muestra pesada en un tubo de digestión de Kjeldahl y agregó una punta de espátula de una mezcla de CuSO_4 y K_2SO_4 en relación 1:10. Luego se agregaron 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y se llevó a digestión, en unidad digestora, aumentando gradualmente la temperatura, por aproximadamente dos horas. Una vez retirada de la unidad de

digestión, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó al tubo de Kjeldahl que contenía la solución digerida, 50 ml de agua destilada gota a gota. Se ubicó el tubo Kjeldahl en la unidad de destilación y se dejó caer una carga de 50 ml de NaOH al 40% sobre el tubo, después de lo cual se recibió el condensado en un vaso de 500 ml que contenía 50 ml de una solución de ácido bórico al 4% y 0,5 ml de indicador. Una vez recibido el condensado, se procedió a titular el contenido del vaso con HCl 0,1 N previamente estandarizado. El resultado se expresa en base húmeda.

3.1.4 Determinación del extracto etéreo. Se refiere a la determinación del contenido de materia grasa. Para ello se pesaron 2 g de muestra deshidratada y se transfirieron a un cartucho de extracción. Luego se adicionaron 150 ml de éter de petróleo a un balón de 250 ml de capacidad, previamente tarado. Se dispuso el cartucho con la muestra en un tubo de extracción Soxhlet, se montó sobre el balón y se procedió a extraer durante 5 h aproximadamente. Finalmente se eliminó el éter del balón, evaporándolo en rotavapor y se desecó el residuo en estufa a 105 °C durante una hora. Luego se dejó enfriar y se pesó.

3.1.5 Determinación de la fibra cruda. Se pesaron 2 g de muestra seca y desgrasada. Luego se vació en un matraz Erlenmeyer del 500 ml y agregó 250 ml de ácido sulfúrico 0,255 N hirviendo y gotas de alcohol amílico como medio antiespumante. Se adaptó varilla de vidrio con tapón de goma al matraz y se puso sobre el aparato de digestión con placa de calentamiento. Se llevó a ebullición durante 30 minutos, girando periódicamente el matraz. Después se retiró el matraz y se filtró el contenido empleando equipo de filtración al vacío. El matraz se enjuagó con 50-75 ml de agua destilada hirviendo y el contenido se hizo pasar a través del embudo Büchner. Se repitió el lavado con tres porciones de 50 ml de agua se succionó para secar el residuo retenido en el medio filtrante. Luego se arrastró el residuo seco del medio filtrante con 250 ml de NaOH 0,313 N y se recibió en un matraz de 500 ml e hirvió por 30 minutos. Se repitió lo anterior cambiando solamente el medio filtrante por papel filtro seco, previamente tarado. Se llevó a secar el residuo obtenido en estufa a 105 °C por 30 minutos. Finalmente se enfrió en desecador y se pesó.

3.1.6 Determinación del extracto no nitrogenado. El extracto no nitrogenado se calcula por diferencia entre 100% y la sumatoria de: materia grasa, proteína, fibra cruda y cenizas.

3.2 Extracción de oleosomas.

Para todos los ensayos que serán descritos más adelante se utilizaron oleosomas extraídos desde semillas de *Brassica napus*, facilitadas por el Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola (CGNA). La extracción se basó en el método descrito por Chen et al. (2012). Se pesaron 50 g de semillas de raps, las que fueron molidas utilizando un molinillo de café comercial (Sindelen Coffee Grinder MOL-165) para luego ser suspendidas en solución tamponada (Tris 100 mM con 3 mM de $MgCl_2$ a pH 8,5). La mezcla fue agitada a 4 °C por una hora, a 200 rpm , después de lo cual se filtró a través de tres capas de Miracloth. El filtrado fue trasvasado a tubos Falcon y centrifugado a 8000 rpm, por 30 minutos a 4 °C. Lo anterior produce que la mezcla se separe en dos fases, correspondiendo la fase superior a los oleosomas puros, de consistencia pastosa (Figura 1). Esta fase es separada utilizando una espátula y traspasada a un nuevo tubo.

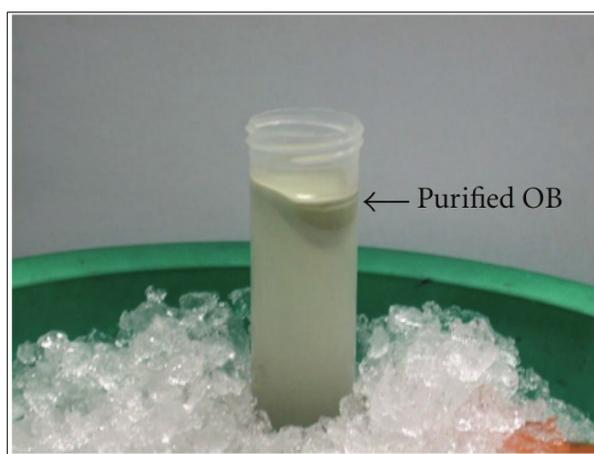


Figura 2. Oleosomas aislados por centrifugación (de acuerdo a metodología descrita por Chen 2012; imagen extraída de Tzen 2012).

3.3 Microencapsulación de astaxantina en oleosomas

Se disolvieron 8 mg de astaxantina en polvo en 20 ml de dimetilsulfóxido. Esta solución fue mezclada con una suspensión de oleosomas al 10% p/v, en la que utilizó solución tamponada (Tris 100 mM con 3 mM de MgCl₂ a pH 8,5) como dispersante. Luego, la mezcla se agitó a 200 rpm por 5 horas con 20 minutos, después de lo cual se centrifugó por 30 minutos. Los oleosomas cargados con astaxantina se encontraron en la fase superior de la mezcla separada por centrifugación, por lo que fueron extraídos con espátula y traspasados a un nuevo recipiente. Se realizaron dos lavados con solución tamponada, para luego obtener astaxantina microencapsulada en oleosomas (Acevedo et al., 2014).

3.4 Evaluación de propiedades y estabilidad fisicoquímica de los oleosomas libres y cargados con astaxantina.

3.4.1 Evaluación de la tensión superficial en oleosomas libres y cargados con astaxantina.

Se utilizó la técnica de dispersión de aceite documentada previamente por Morikawa *et al.* (2000). En una placa petri de 9.1 cm de diámetro se añadieron 25 ml de agua destilada. Sobre el agua se puso una gota de aceite de motor y esperó a que se dispersara, hasta formar una película de aceite que cubriera toda la superficie de la placa. Sobre esta película, en el centro de la placa, se dejó caer suavemente una gota de muestra, correspondiente a una suspensión de oleosomas al 10%. Al caer la gota, se forma un halo de dispersión; el diámetro de este halo fue medido.

Se realizó el mismo procedimiento, esta vez con un tensioactivo conocido (Dodecilsulfato sódico, SDS), a distintas concentraciones: 0,0625%; 0,125%; 0,1875%; 0,25%; 0,5; 1% y 1,5%. A partir de las medidas de los halos observados se analizó el cambio del diámetro de estos respecto a la concentración de surfactante y se realizó una curva con tales datos. La cantidad de tensioactivo que contienen las muestras de oleosomas puros y cargados con astaxantina se obtuvo a partir de esta curva.

3.4.2 Determinación de potencial zeta y tamaño de partícula

El potencial zeta (al que se le asigna la letra griega ζ) es un parámetro que permite conocer la estabilidad que probablemente poseerá un sistema coloidal, como el analizado en este estudio, en donde los oleosomas puros y cargados con astaxantina se encuentran dispersos en una suspensión. El potencial zeta es el potencial eléctrico que existe en la doble capa eléctrica de una partícula en suspensión. Si el potencial zeta de las partículas de una suspensión son altamente negativos o positivos, estas partículas tenderán a repelerse, y por ende no existirá floculación en el sistema. Por el contrario, si las partículas de una suspensión poseen un potencial zeta bajo, no existe fuerza suficiente para que se repelan y tiendan a flocular. En general, se ha establecido que suspensiones con valores de potencial zeta de alrededor de 30 mV o superiores, ya sea con carga positiva o negativa, son consideradas estables. El potencial zeta y el tamaño de partícula se determinaron en el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Inglaterra). Este equipo mide el potencial zeta y tamaño de partícula indirectamente. El parámetro que mide es la dispersión de luz producida por la incidencia de un láser en las partículas de la muestra y a partir de estos datos genera los valores de potencial zeta y tamaño de partícula de las muestras estudiadas.

3.4.2.1 Efecto de la variación de pH. Para realizar mediciones de potencial zeta y tamaño de partícula mediante un gradiente de pH, anexado al Zetasizer se utilizó un titulador automático (MPT-2; Malvern Instruments, Inglaterra).

Las suspensiones de oleosomas, puros y cargados con astaxantina, a una concentración del 10% p/v fueron diluidas 100 veces, para llegar a una concentración del 0,1% p/v. Se utilizó como solvente agua desionizada.

Se colocaron 10 ml de suspensión de oleosomas al 0,1% en un tubo plástico (provisto por el fabricante) y se acopló al titulador automático. La titulación se realizó en dos fases: primero se realizó un gradiente desde el pH propio de la muestra hacia un pH ácido y luego se realizó de

manera similar con un pH básico. En la fase ácida se usó como agente titulador HCl 0,1 M y HCl 1 M, el pH final de la medición se estableció en 1. En el caso de la fase básica, el agente titulador fue NaOH 0,1 M y 1 M, y pH final fue de 9. La temperatura a la que se realizaron las mediciones fue de 25°C. El cambio de pH para ambos casos fue de 0,5.

En el caso del potencial zeta se realizaron 25 ciclos de medición y tres repeticiones para cada muestra. En cuanto al tamaño de partícula, se realizaron entre 15 y 20 ciclos y se realizaron 3 repeticiones para cada muestra.

3.4.2.2 Efecto de la variación temperatura. Se realizaron mediciones de potencial zeta y tamaño de partícula a las muestras de oleosomas puros y cargados con astaxantina (pH 5,8) utilizando un gradiente de temperatura desde 20 a 50 °C, con un intervalo de 2,5 °C. El potencial zeta y el tamaño de partícula fueron medidos por separado.

Los ciclos y repeticiones para las mediciones del potencial zeta y de tamaño de partícula se mantuvieron de forma similar al estudio respecto de la variación de pH.

3.4.2.3 Efecto de la variación de fuerza iónica. Se realizaron mediciones de potencial zeta y tamaño de partículas a las muestras de oleosomas puros y cargados con astaxantina (pH 5,8) a distintas fuerzas iónicas (0, 25, 50, 75 y 100 mM de NaCl). Para esto se utilizó un volumen final de 3 ml de muestra de oleosomas y oleosomas cargados con astaxantina al 0,1 %, a las que se les añadió la cantidad necesaria de NaCl 5 M para alcanzar las fuerzas iónicas requeridas. Luego, cada muestra se midió manteniendo los parámetros antes mencionados.

3.4 Evaluación de la digestibilidad *in vitro* de los oleosomas

Se llevaron a cabo ensayos de digestión gástrica e intestinal *in vitro* para evaluar el comportamiento de oleosomas puros y cargados con astaxantina frente a las condiciones existentes en el estómago e intestino delgado.

Primero, para ambas etapas de la digestión, se realizaron pruebas con distintas razones

enzima/sustrato sólo con oleosomas puros. Luego de haber obtenido la razón óptima para las digestiones gástrica e intestinal, se procedió a realizar los ensayos con oleosomas cargados con astaxantina.

3.4.1 Digestión gástrica. Según el procedimiento descrito por Gallier & Singh (2012), se mezclaron 20 ml de suspensión de oleosomas al 10% con 20 ml de fluido gástrico simulado (FGS) (para 100 ml: 0,2 g de NaCl y 0,7 ml de HCl a pH 1,2). Luego, la mezcla se acidificó con HCl 6 M, hasta llegar a un pH de 1,5. Después la muestra fue incubada a 37 °C en baño María con agitación, por 10 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 3 mg de pepsina, y se mantuvieron las condiciones de agitación y temperatura durante dos horas.

3.4.1.1 Hidrólisis de oleosinas. La evaluación de la hidrólisis de las oleosinas se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (en inglés, SDS-PAGE). El gel separador se preparó a una concentración del 15%, para lo cual se utilizó 1,635 ml de agua desionizada, 0,709 ml de solución tamponada Tris-HCl 1,5 M a pH 8,8 con 0,4 % de SDS, 2,375 ml de acrilamida-bisacrilamida 29:1, 42,54 µl de persulfato amónico (PSA) al 10% y 14,18 µl de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), para un gel de 1 mm de grosor. Por otra parte, el gel compactador se preparó con 0,1675 ml de acrilamida-bisacrilamida 29:1, 0,25 ml de solución tamponada Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8 con 0,4% de SDS, 0,575 ml de agua desionizada, 7,5 µl de PSA al 10% y 1,25 µl de TEMED.

Se tomaron muestras del ensayo de digestión gástrica, mencionado anteriormente, a los 0, 5, 15, 60 y 120 minutos. Además, se utilizaron dos muestras como control: la suspensión de oleosomas puros y la suspensión de oleosomas acidificada. De cada muestra se tomaron 50 µl y se mezclaron con 200 µl de buffer de carga (para 5 ml: 0,0303 g de Tris, 0,005 g de azul de bromofenol, 0,1 g de SDS, 0,57 g de glicerol y 0,077 g de 1,4-ditioltreitol) en tubos Eppendorf, la mezcla se llevó a 105 °C por 10 minutos con el fin de desnaturalizar las proteínas. Luego de dejar enfriar, se centrifugaron los tubos por 1 min. Se tomaron 15 µl del sobrenadante para ser cargados en el gel. La electroforesis fue llevada a cabo a 100 V por alrededor de 1,5 h. Una vez

terminada, los geles se sumergieron en solución de teñido (250 ml de metanol, 250 ml de agua destilada, 50 ml de ácido acético y 0,55 g de azul de coomasie D-250) por 24 h. Finalmente, los geles son sumergidos en solución de desteñido (250 ml de metanol, 250 ml de agua destilada y 50 ml de ácido acético) hasta que las bandas se distinguen nítidamente. Los resultados fueron registrados por fotografía.

3.4.1.2 Relación sustrato/enzima. Utilizando la misma técnica anterior se evaluó la relación óptima sustrato/enzima para la hidrólisis de oleosinas. Las distintas razones estudiadas se lograron manteniendo constante la cantidad de pepsina agregada y cambiando la concentración de las suspensiones de oleosomas. Las razones probadas fueron: 1,56:1 – 3,125:1 – 6,25:1 – 12,5:1 – 25:1 – 50:1 – 62,5:1 – 75:1 – 87,5:1.

3.4.2 Digestión intestinal. Luego de la digestión gástrica, se tomaron 7,5 ml de la suspensión resultante y se mezclaron con 22,5 ml de fluido intestinal simulado (para 100 ml: 0,68 g de K_2HPO_4 , 19 ml de NaOH 0,2 M), además de añadir 0,15 g de extracto biliar. Esta mezcla se lleva a una temperatura de 37 °C y se ajusta el pH levemente bajo 7 (6,8-6,9).

3.4.2.1 Cuantificación de la liberación de ácidos grasos. Se llevó a cabo mediante el método pH-Stat. Para ello se utilizó un titulador automático pH-Stat Titrande 902 (Malvern Instruments, Inglaterra). El proceso fue realizado en dos etapas: primero, el equipo ajustó el pH de la muestra a 7,0 con NaOH 0,2 N. Luego se inició el modo pH-Stat propiamente tal, en donde se establece un valor de pH constante por un periodo de tiempo determinado (en este caso el valor de pH indicado es 7,0). A los 20 s de haber iniciado el modo, se añadió la pancreatina y se cuantificó la liberación de ácidos grasos durante 15 minutos, a través de la observación del cambio de pH. La pancreatina añadida fue disuelta en solución tamponada de fosfato a pH 7,0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis proximal de las semillas de *Brassica napus*.

Los resultados del análisis proximal de las semillas de *Brassica napus* se presentan en la Tabla 1. El componente que aparece en mayor proporción en semillas de *Brassica napus* es la materia grasa, con un 45,3%. Estos resultados son similares a los entregados por otros autores, en cuanto a contenido de humedad y cenizas, principalmente, en semillas de *Brassica napus* (Onay y Kockar, 2003; Haykiri-Acma y Yaman, 2008).

Cuadro 1. Análisis proximal de semillas de *Brassica napus*, obtenidos según la metodología AOAC 1990

| Parámetro | Resultado |
|-----------------------------|-----------|
| Humedad (%) | 5,67 |
| Materia grasa (%) | 45,3 |
| Proteína (%) | 16,9 |
| Fibra cruda (%) | 8,15 |
| Cenizas (%) | 3 |
| Extracto no nitrogenado (%) | 20,98 |

4.2 Obtención de oleosomas puros y cargados con astaxantina.

El porcentaje de extracción de oleosomas desde semillas de raps es cercano al 30% y la eficiencia de microencapsulación de astaxantina en estos organelos es de un 99%, como ha sido descrito por Acevedo et al. (2014).

4.3 Evaluación de la capacidad de romper la tensión superficial de oleosomas libres y cargados con astaxantina

Se graficó el cambio en el diámetro del halo producido sobre la capa de aceite, respecto de la concentración de surfactante (SDS) utilizada (Figura 2). Este gráfico muestra una relación lineal directa entre estos factores, puesto que al aumentar la concentración de SDS también aumentó el diámetro del halo. Lo anterior concuerda con lo descrito por Morikawa et al. (2000).

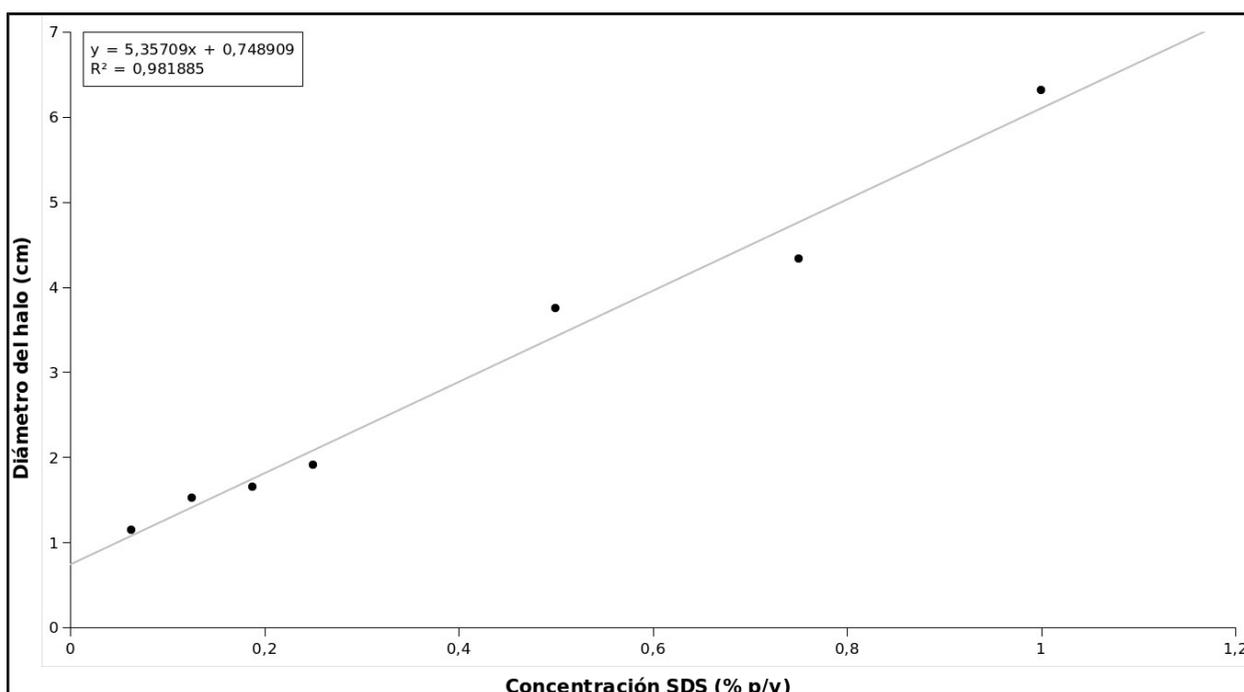


Figura 3: Gráfica que muestra la relación entre la concentración del surfactante (SDS) y el diámetro del halo producido por éste, a partir de la cual se calculó la ecuación de la recta. Mediante esta ecuación se obtuvo la cantidad aproximada de surfactante encontrada en oleosomas.

La ecuación de la recta generada por el gráfico fue utilizada para obtener una mejor aproximación a la concentración de surfactante que poseen los oleosomas en estado puro como también los cargados con astaxantina. Por otra parte, el ensayo que midió el desplazamiento de aceite generado por los oleosomas libres y cargados con astaxantina respecto del tiempo indica que esta actividad surfactante se mantiene relativamente estable durante los 7 días de medición

(Cuadro 2). Esto se puede deber a que los oleosomas libres y cargados se mantienen estables estructuralmente, o que posee componentes en su superficie que generan esta capacidad de romper la tensión superficial. Se ha descrito que en la estructura de los oleosomas, la proteína superficial predominante, la oleosina así como los fosfolípidos de la membrana externa, poseen actividad surfactante por lo que es posible que en este caso sean estos componentes los que estén generando el efecto tensioactivo descrito (Tzen, 2012). Hasta este momento, no se han realizado estudios similares en otros oleosomas.

Cuadro 2: Concentración de surfactante presente en oleosomas puros y cargados con astaxantina durante 7 días, obtenida a partir del diámetro del halo generado.

| Tiempo (días) | Diámetro del halo (cm) | | Concentración de surfactante (%) | |
|---------------|------------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| | Oleosomas | Oleosomas cargados con Astaxantina | Oleosomas | Oleosomas cargados con Astaxantina |
| 0 | 1,75 | 1,55 | 0,187 | 0,150 |
| 1 | 2,31 | 1,78 | 0,291 | 0,192 |
| 2 | 1,75 | 1,81 | 0,187 | 0,198 |
| 4 | 1,86 | 1,56 | 0,207 | 0,151 |
| 7 | 2,07 | 1,78 | 0,247 | 0,192 |

Por lo general, los surfactantes poseen cierta resistencia a condiciones ambientales como cambios de pH y temperatura, además de brindar estabilidad a las emulsiones en las que se encuentran inmersos (Nitschke y Costa, 2007). Ambas condiciones son ideales para aplicaciones alimentarias.

4.4 Evaluación de la digestibilidad *in vitro* de los oleosomas libres y cargados con astaxantina

4.4.1 Digestión gástrica

En primer instancia, se evaluaron distintas razones sustrato/enzima para la digestión gástrica de oleosomas puros de modo de determinar la razón óptima (punto 4.2.1.1). Posteriormente, usando la razón sustrato/enzima óptima determinada, se evaluó la digestión gástrica de los oleosomas libres y cargados con astaxantina (punto 4.2.1.2).

4.4.1.1 Razón sustrato/enzima. Las razones probadas fueron: 1,56:1 – 3,125:1 – 6,25:1 – 12,5:1 – 25:1 – 50:1 – 62,5:1 – 75:1 – 87,5:1. Para efectos prácticos, se presentan los resultados en grupos.

a) Grupo 1, razón sustrato/enzima 62,5:1 – 75:1 – 87,5:1

En este grupo de relaciones sustrato-enzima, se observó que los controles 1 y 2 (oleosomas puros y oleosomas con solución ácida) no mostraron diferencias aparentes en sus patrones de bandas, mostrando proteínas cuyos pesos fueron desde los 62 kD hasta los 21 kD en forma nítida, y finalmente un grupo de polipéptidos de alrededor de 12 kD en la parte baja del gel (Figura 4). Se destacan las bandas de 27 y 21 kD por mostrarse bastante marcadas, en particular esta última. Según estudios de otros autores (Jolivet et al., 2013), esta banda debe corresponder a las oleosinas presentes en la membrana de los oleosomas, debido a que son las que en mayor cantidad se encuentran. Hasta este momento, las proteínas de los oleosomas se mantuvieron estables, a pesar del cambio radical de pH (pues la solución se ha acidificado hasta pH 1,5), lo que podría dar muestra de la estabilidad del oleosoma a este cambio en el medio. Sin embargo, desde el momento en el que se agregó la enzima gástrica pepsina (muestra tiempo 0, M0) el patrón de bandas cambió drásticamente, existiendo sólo una débil banda de alrededor de 32 kD y un grupo de polipéptidos, cuyo peso promedio es de 12 kD (Figura 4). Esto muestra que la pepsina actúa instantáneamente sobre la suspensión y las proteínas de los oleosomas son sustrato

para esta enzima. La banda de las oleosinas no se visualiza, lo que puede deberse a que los oleosomas han perdido parte de su estructura, o debido a la hidrólisis de sus proteínas.

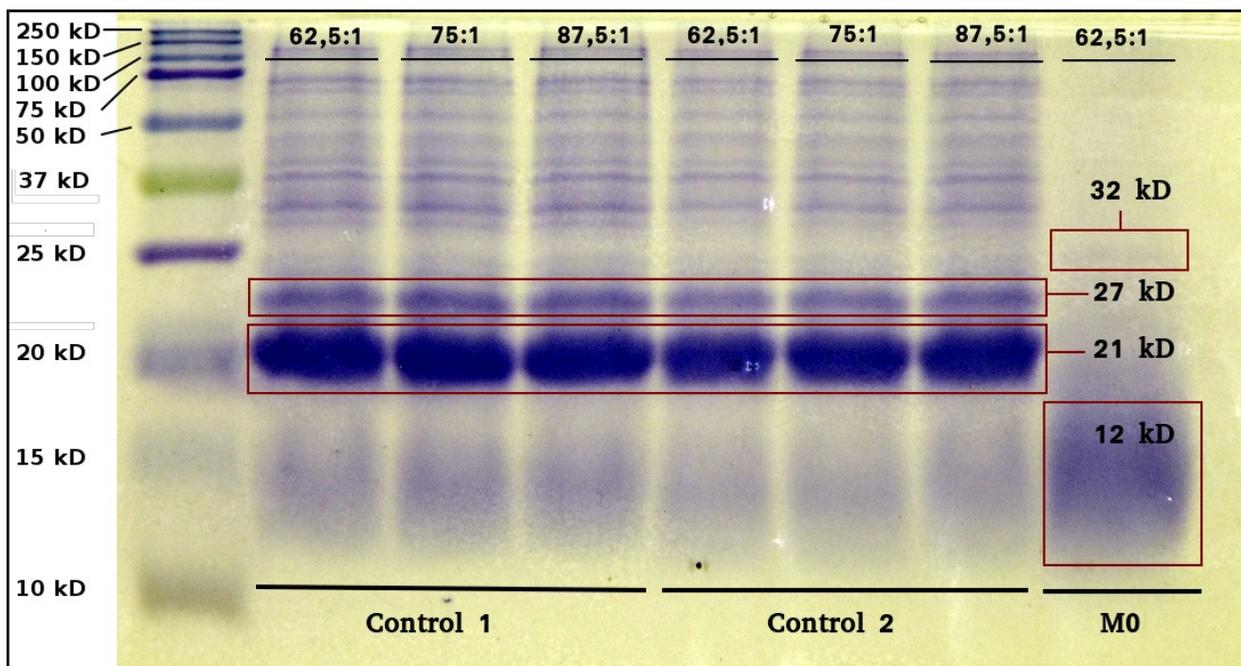


Figura 4: Muestras correspondientes a oleosomas puros (Control 1), oleosomas con solución ácida (Control 2) y muestra con pepsina (M0). Se destacan las bandas marcadas con mayor intensidad en los controles 1 y 2, de 21 kD, pertenecientes a las oleosinas de los oleosomas. En la M0 se observan los polipéptidos producidos por acción de la pepsina.

Las muestras a los 5 y 15 minutos no evidenciaron muchas diferencias con la muestra al tiempo 0, aún se mantuvo una banda de alrededor de 32 kD (Figura 5). Luego, en las muestras de los 60 y 120 minutos ya no se apreció la banda de 32 kD, sólo quedó el grupo de polipéptidos de alrededor de 14 kD (Figura 6). Este grupo de polipéptidos mostró una alta nitidez, lo que significa que se encontraban en una alta cantidad saturando el sistema, y la concentración de pepsina no fue suficiente para hidrolizar todos los polipéptidos presentes, aunque las proteínas observadas en los controles 1 y 2 fueron hidrolizadas por completo. Por lo anterior, este grupo de relaciones enzima/sustrato no es considerado óptimo, puesto que la cantidad de pepsina no fue suficiente para hidrolizar todo el contenido de proteína presente en el medio.

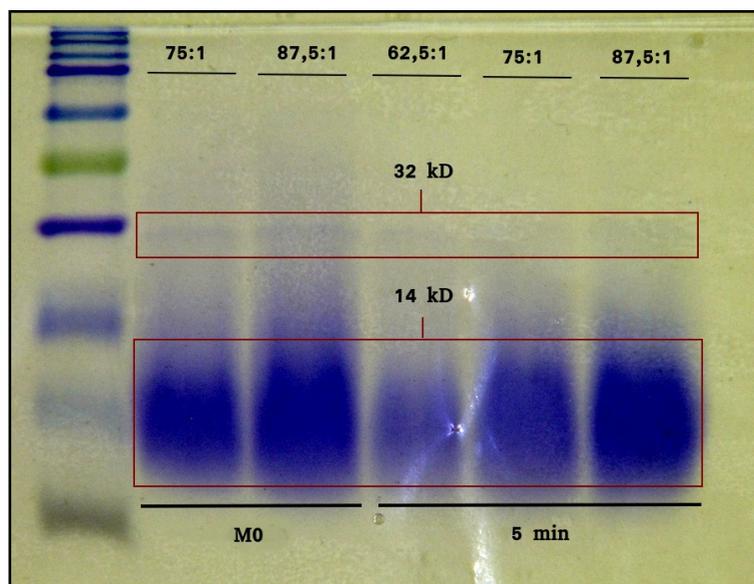


Figura 5: Muestras a los 5 y 15 minutos de digestión gástrica. Se aprecia una banda de 32 kD resistente a la acción de la pepsina, aunque marcada levemente. La mayoría de las proteínas en el sistema fue reducida a péptidos de alrededor de 14 kD.

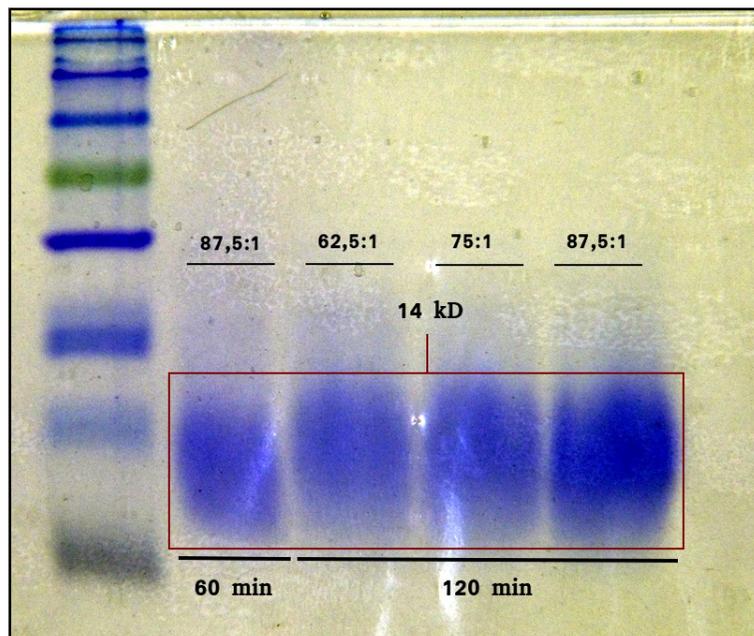


Figura 6: Muestras a 60 y 120 minutos de digestión gástrica. Todas las proteínas del sistema han sido reducidas a péptidos de 14 kD, para todas las razones sustrato/enzima.

b) Grupo2, razón sustrato/enzima 12,5:1 – 25:1 – 50:1

En este grupo de razón sustrato/enzima, en los controles 1 y 2 no se vieron diferencias en cuanto al patrón de bandas, habiendo proteínas que, de forma similar al grupo anterior, se ven de forma nítida, con un peso de alrededor de 23 kD (Figura 7). Sin embargo, a diferencia del grupo anterior, aquí se comenzaron a ver diferencias entre las distintas relaciones sustrato/enzima, en cuanto a la intensidad con la que se marcaron las bandas, mostrándose la razón 50:1 más marcada en relación a la 25:1, y está más marcada que la razón 12,5:1.

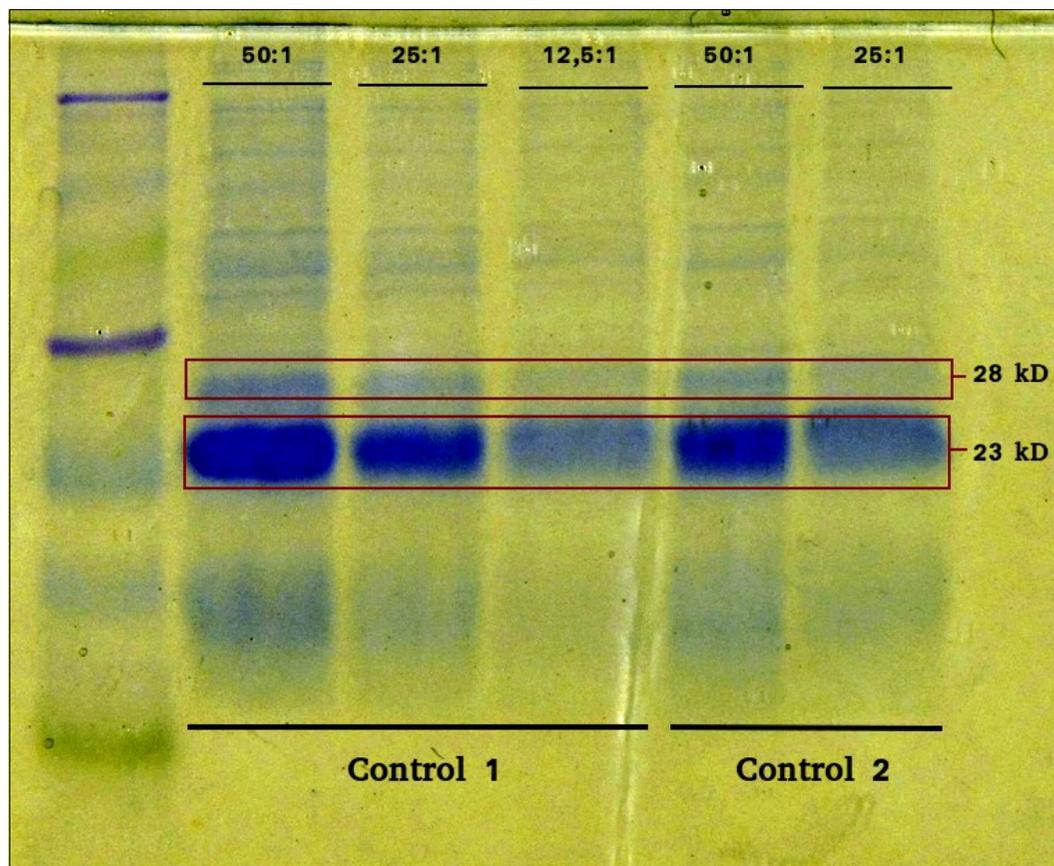


Figura 7: Oleosomas puros (Control 1) y mezclados con solución ácida (Control 2). Se ven dos grandes grupos de proteínas, de 28 y 23 kD, asociados a las oleosinas de los oleosomas. En las tres razones sustrato/enzima se ve el mismo patrón de bandas.

Se observó que a medida que avanzó el tiempo de incubación (60 y 120 minutos), las bandas se fueron marcando con menor intensidad. A los 120 minutos se ven las diferencias más claras con las muestras del grupo estudiado anteriormente: la banda de la relación 50:1 aún se puede ver claramente, no así aquellas de las relaciones 25 y 12,5:1 (Figura 8).

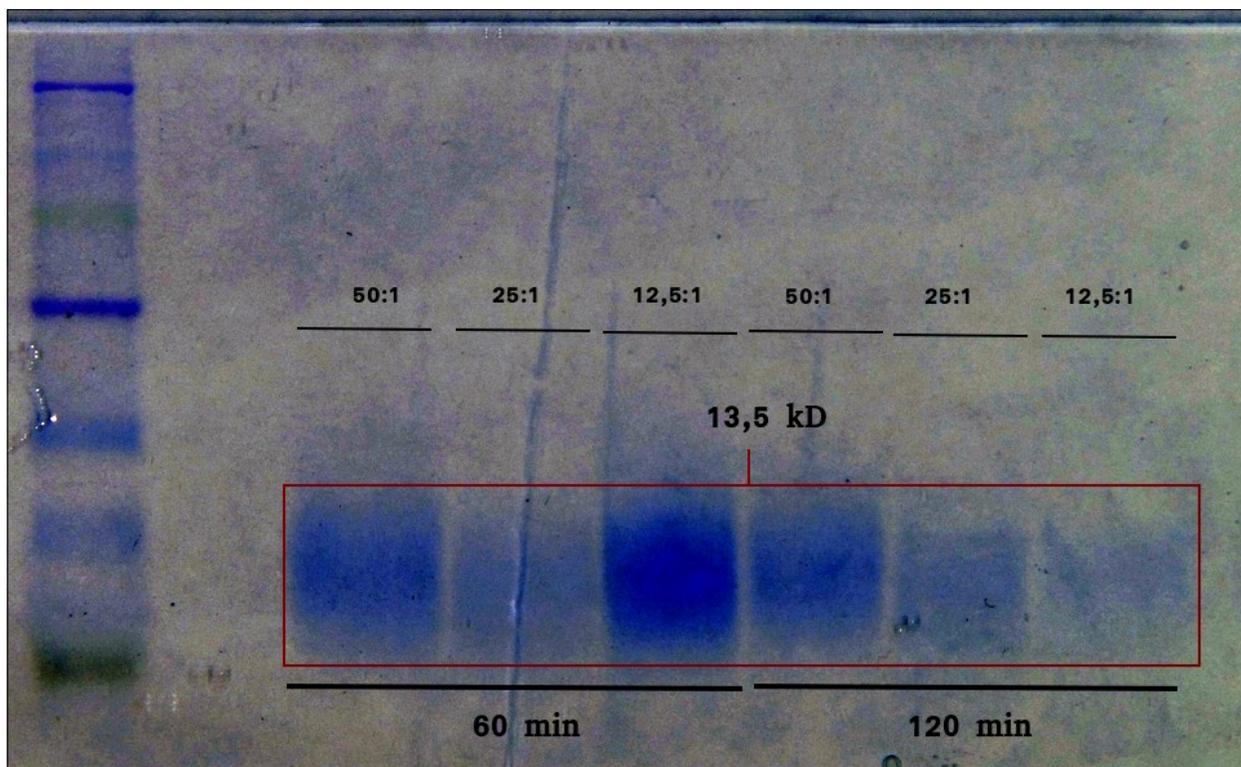


Figura 8: Oleosomas a 60 y 120 minutos de digestión gástrica. Los polipéptidos a los 120 minutos han sido prácticamente digeridos por completo en las razones sustrato/enzima 25:1 y 12,5:1.

c) Grupo 3, relaciones sustrato/enzima 1,56:1 – 3,125:1 – 6,25:1

En el caso de este grupo de relaciones sustrato/enzima, al final de la incubación (60 min, 120 min) no hubo un grupo de polipéptidos de alrededor de 12 kD, como los hubo en los dos grupos anteriores (Figura 9). A pesar de lo anterior, apareció una banda de alrededor de 82 kD, probablemente correspondiente a la pepsina, lo que indicaría que el sistema fue saturado con la enzima, habiendo una cantidad de sustrato inferior para que el proceso sea óptimo.

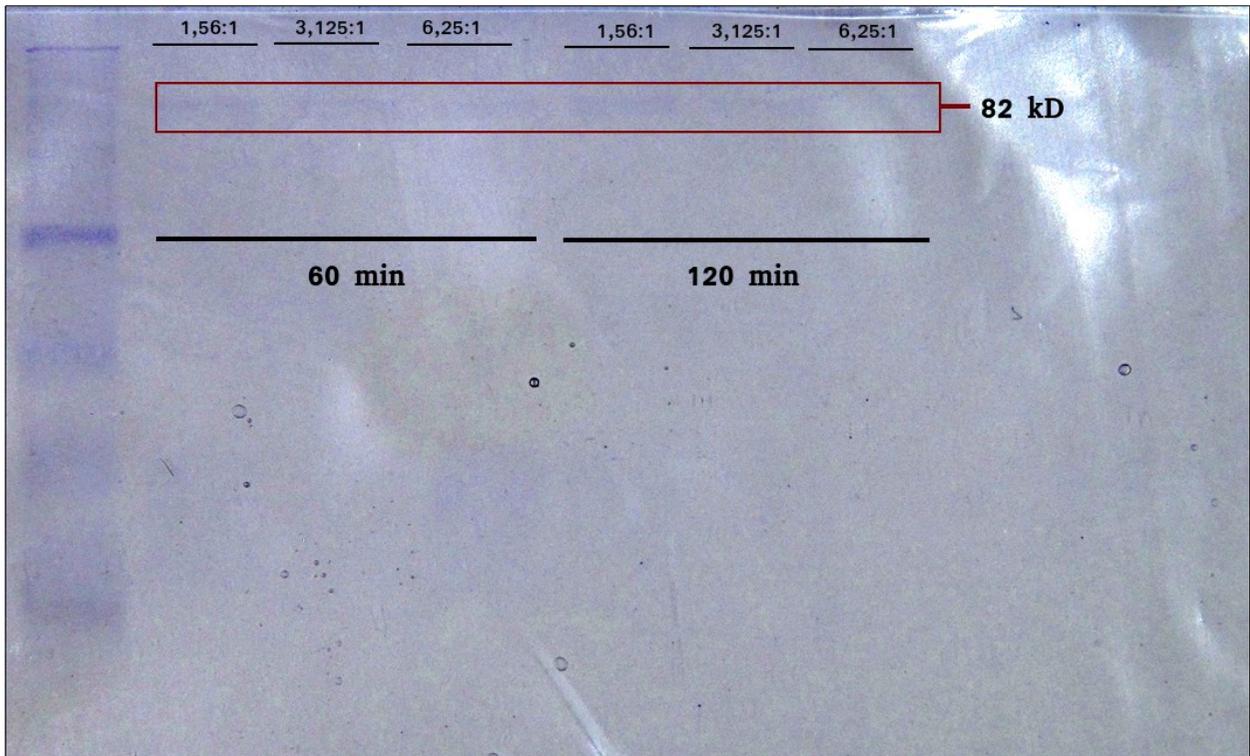


Figura 9: Oleosomas a 60 y 120 minutos de digestión gástrica. Se distingue, de forma leve, una banda de 82 kD en todos los tratamientos. Tal banda, perteneciente a la pepsina..

Luego de estos análisis se ha determinado como óptima la relación sustrato/enzima 25:1, debido a que prácticamente no quedan rastros de polipéptidos, y tampoco se evidencia la banda correspondiente a la pepsina. El tiempo óptimo de digestión gástrica fue establecido en 120 minutos. Lo anterior se asemeja a lo observado en otros estudios (Gallier y Singh, 2012).

4.4.1.2 Digestión gástrica de oleosomas puros y cargados con astaxantina

Luego de haber determinado la razón sustrato/enzima y tiempo de digestión óptimos, se procedió a realizar la digestión gástrica con los oleosomas puros y cargados con astaxantina, para comparar el comportamiento de estos frente al proceso antes mencionado.

En esta ocasión las muestras analizadas fueron los oleosomas puros y cargados en suspensión (control 1), en presencia de la solución ácida (control 2), los oleosomas en presencia de la enzima gástrica pepsina a tiempo cero (M0) y los oleosomas sometidos a la digestión gástrica por 120 minutos.

Los resultados mostraron que no hubo diferencia en los patrones de bandas de los oleosomas puros y los oleosomas cargados con astaxantina, comportándose ambos de manera similar frente a la digestión. Tal como en los ensayos para encontrar la mejor relación sustrato/enzima, las proteínas permanecen íntegras en los controles 1 y 2; al momento de agregar la pepsina la mayoría de éstas son hidrolizadas, y luego de 120 minutos queda una pequeña cantidad de polipéptidos resistentes a la hidrólisis (Figura 10).

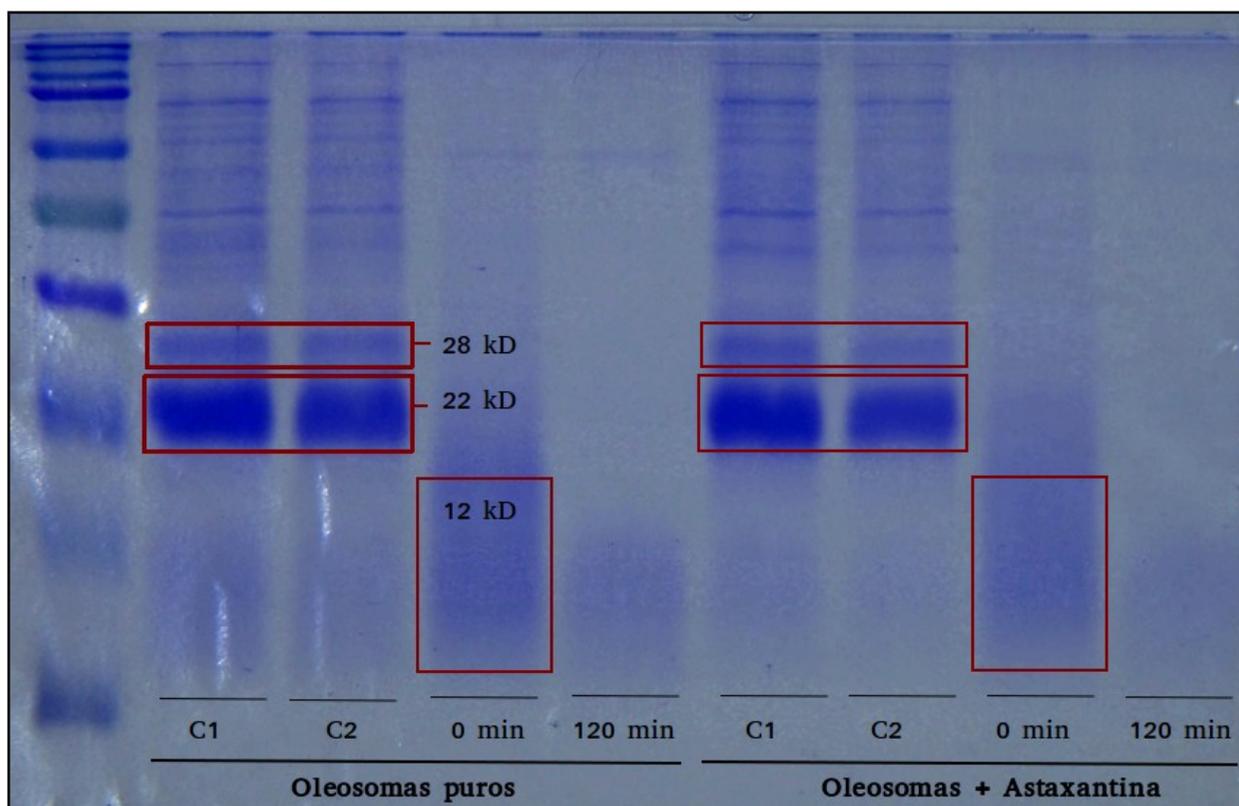


Figura 10: Digestión gástrica de oleosomas puros y oleosomas cargados con astaxantina. No existen diferencias aparentes entre los oleosomas puros y los cargados con astaxantina respecto de la digestión gástrica. A los 120 minutos la digestión es completa.

Debido a que las oleosinas son hidrolizadas en su totalidad durante la digestión gástrica, es probable que los oleosomas pierdan su estabilidad (Gallier y Singh, 2012; Tzen, 2012), por lo que su contenido interno sea susceptible de liberarse en un posterior proceso de digestión intestinal. Esto es lo que se espera, ya que es en el intestino delgado en donde ocurre la absorción de los nutrientes (McClements y Li, 2010) que son transportados por los oleosomas, en este caso la astaxantina.

4.4.2 Digestión intestinal

4.4.2.1 Estandarización de la concentración pancreatina para la digestión intestinal de oleosomas

Para todas las concentraciones de enzima probadas (5, 10, 30, 64, 128, 160, 224 mg/ml) se observó una relación directa entre el aumento de la concentración de pancreatina y la liberación de ácidos grasos por parte de la suspensión de oleosomas. La cantidad de ácidos grasos liberados fue en aumento a medida que se incrementó la concentración de pancreatina, sin embargo este fenómeno se vio hasta la concentración de 160 mg/ml. Luego al evaluar la liberación de ácidos grasos con la siguiente concentración (221 mg/ml) el aumento dejó de ser importante (Cuadro 3). Por lo tanto, se consideró 160 mg/ml como la cantidad óptima para cuantificar el máximo de ácidos grasos liberados por parte de los oleosomas.

En todos los ensayos, la liberación de ácidos grasos fue constante en el tiempo.

Cuadro 3: Ácidos grasos liberados por oleosomas sometidos a digestión intestinal, a los 10 y 15 minutos respecto de las distintas concentraciones de de pancreatina.

| Concentración de pancreatina (mg/ml) | Acidos grasos liberados promedio (μ mol) | |
|---|--|-----------------|
| | 10 min | 15 min |
| 0 (control) | 0 | 0 |
| 5 | 27,85 \pm 3 | 41,30 \pm 5 |
| 10 | 59,07 \pm 5 | 72,63 \pm 7 |
| 30 | 68,87 \pm 2 | 82,70 \pm 3 |
| 64 | 73,60 \pm 7 | 88,97 \pm 5 |
| 128 | 103,50 \pm 1 | 121,80 \pm 3 |
| 160 | 126,70 \pm 11 | 143,00 \pm 14 |
| 224 | 129,00 \pm 5 | 148,00 \pm 7 |

Desde el momento en el que se agregó la pancreatina, instantáneamente se vio liberación de ácidos grasos (Figura 11). En otros trabajos se ha visto la presencia de una fase estacionaria en la curva de titulación, al principio del ensayo, lo que aparentemente se debe a que la membrana de los oleosomas obstaculiza la actividad lipolítica de la enzima lipasa pancreática, ocupada en estos ensayos (Beisson et al., 2001; Gallier y Singh, 2012). En los ensayos aquí mostrados, no existió fase estacionaria, esto se puede deber a que se ocupó, en lugar de lipasa pancreática, pancreatina, la que es una mezcla de enzimas intestinales y otros componentes biológicos producidos por las células exocrinas del páncreas lo que entrega condiciones más idóneas para la acción de estas enzimas (McClements y Li, 2010), imitando de mejor manera el ambiente bioquímico encontrado en el intestino delgado.

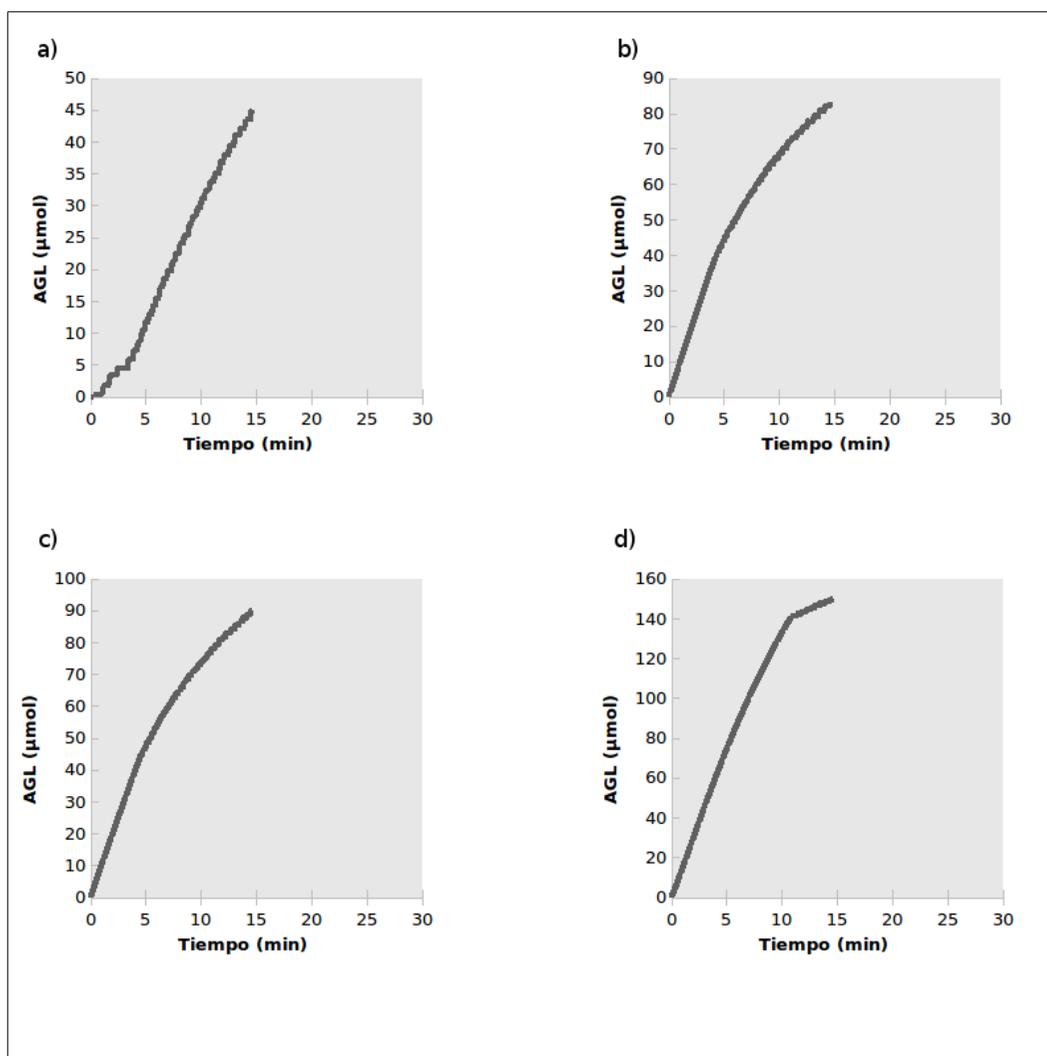


Figura 11: Curvas de liberación de ácidos grasos a las concentraciones de pancreatina de 5 mg/ml (a), 30 mg/ml (b), 64 mg/ml (c) y 160 mg/ml.

En el caso de los oleosomas cargados con astaxantina, el valor de ácidos grasos liberados a los 15 minutos, aplicando una concentración de enzima de 64 mg/ml, fue de 82 μmol. Lo anterior muestra que los oleosomas mantienen sus características de interés para transportar la astaxantina y liberarla en el intestino delgado.

4.5 Evaluación del potencial zeta y tamaño de partícula

4.5.1 Efecto del cambio de pH

4.5.1.1 Potencial zeta. En el caso de los oleosomas puros, a un valor de pH 1, el potencial zeta fue de 23,9 mV aumentando hasta un máximo de 53,9 mM a pH 3,2 lo que indica que la suspensión presenta estabilidad a ese rango de pH, probablemente debido a que por las cargas de las partículas se repelen evitando que exista un fenómeno de floculación, agregación o precipitación (Gallier y Singh, 2012). Lo anterior se relaciona con los resultados mostrados en las distintas electroforesis realizadas para la digestión gástrica, ya que en aquellos ensayos aun habiendo agregado la solución ácida (alcanzando un pH de 1,5), los oleosomas no se desintegraron. A pH 4,5 el potencial zeta promedio de los oleosomas disminuyó a 26,7 mV, alcanzando la neutralización de sus cargas a un pH cercano a 5,8.

A pH básico, el potencial zeta alcanza valores negativos, y en descenso constante, cuyos valores absolutos van desde -17,2 a -45,9 mV, por lo que esta vez también la suspensión se mantendría estable bajo esas condiciones, debido a la repulsión de las cargas negativas en la capa externa de los oleosomas (Figura 12).

En oleosomas, el potencial zeta depende de los componentes activos de su superficie, como las oleosinas, lo que forma una barrera estérica que previene la coalescencia de éstos (Gallier et al., 2012).

La tendencia observada concuerda con otros estudios (Guzey et al., 2004; McClements et al., 1997). Los resultados sugieren que las oleosinas se mantuvieron en la superficie de los oleosomas luego de su extracción desde las semillas (Iwanaga et al., 2008). Además, los oleosomas podrían haber mantenido su estructura de manera íntegra a través de todo el gradiente de pH, lo que explicaría que a valores de pH ácido tuvieran una carga altamente positiva, y luego de pasar por el punto isoeléctrico pudieran adquirir una carga altamente negativa.

La tendencia fue similar en el caso de los oleosomas cargados con astaxantina, obteniendo un valor de potencial zeta de 19,5 mV a pH 1 el cual aumentó a 45,2 mV a pH 2,9. De la misma forma que con los oleosomas puros, la suspensión se mantiene estable en este rango de pH. La neutralidad de las cargas se alcanzó a pH cercano a 5,8 y a medida que el valor de pH aumentó, el potencial zeta aumentó en su valor absoluto alcanzando valores de -36,5 mV, lo que da cuenta de la estabilidad de la suspensión (Figura 12).

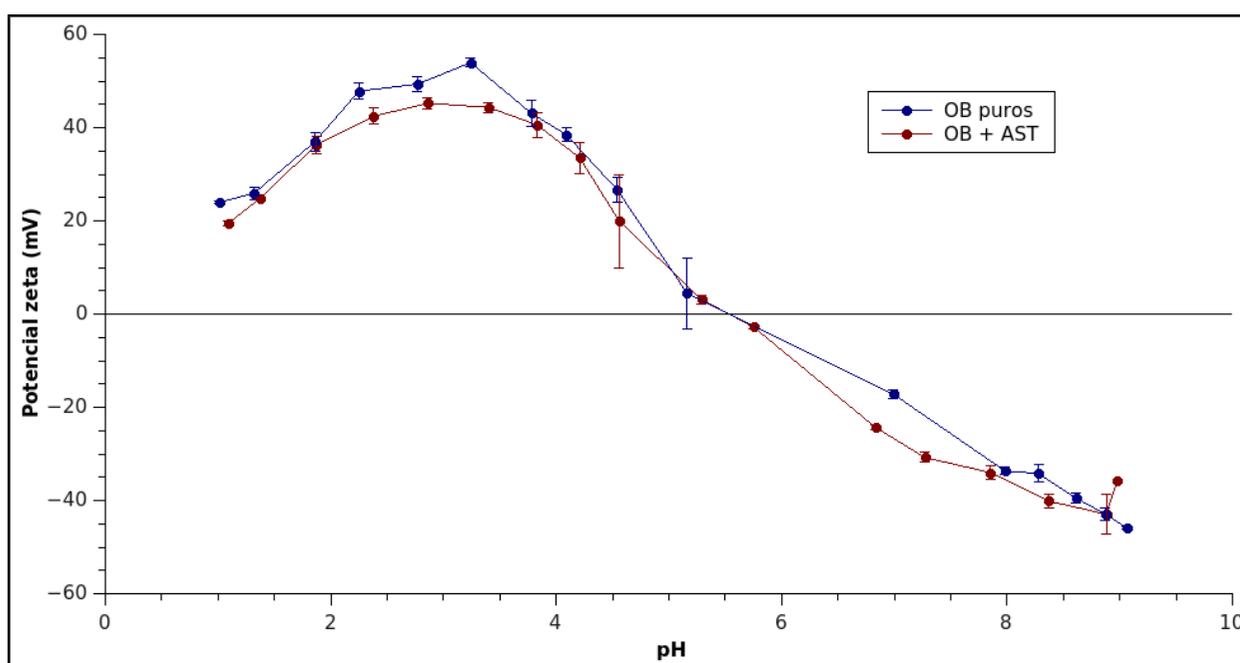


Figura 12: Cambio en el potencial zeta de suspensiones de oleosomas puros y cargados con astaxantina al 10% p/v, respecto del cambio de pH en el medio a una temperatura de 25 °C.

En general los valores de potencial zeta de oleosomas puros y cargados con astaxantina no mostraron diferencias notorias, tomando en cuenta el valor absoluto entre los pH básicos y ácidos, lo que podría significar que no hubo cambios en la composición interfacial de los oleosomas y la mayoría de las proteínas de membrana permanecieron en su lugar en la superficie (Gallier y Singh, 2012).

La tendencia seguida por estas curvas se puede explicar por el aumento de cationes hidrógeno (H^+) en la suspensión en el caso de la titulación con HCl, lo que produciría un cambio en la carga de la capa externa de las partículas, haciéndolas más positivas y por ende aumentando también el potencial eléctrico, hasta llegar a un punto en donde el sistema se satura de cationes hidrógeno y el potencial zeta comienza a descender. Lo mismo ocurriría al titular con NaOH, puesto que esto genera un aumento de aniones hidróxido (OH^-), lo que carga negativamente la capa externa de las partículas generando esta vez un descenso en el potencial zeta.

4.5.1.2 Tamaño de partícula. La estabilidad de los oleosomas a través del gradiente de pH también se visualiza al medir el tamaño de partículas. En efecto, a un valor de pH 1 el tamaño de partículas promedio fue bajo (2379 nm) aumentando a 5170 nm al alcanzar la neutralidad de las cargas lo que indica agregación de las partículas en esa zona. A pH básico, el tamaño de partícula disminuyó drásticamente alcanzando valores entre 1307 y 1412 nm en promedio en el rango de pH 7 y 9, señalando estabilidad de los oleosomas bajo estas condiciones, al mantenerse como cuerpos individuales a ese rango de pH (Figura 13).

En el caso de los oleosomas cargados con astaxantina, en cuanto al tamaño de partículas, éste fue menor a pH ácido y básico aumentando por agregación de partículas (12005 nm) a pH cercano a 5,8. A diferencia de los oleosomas puros, el tamaño de partículas de los oleosomas cargados con astaxantina fue en general mayor, probablemente debido a la intercalación de los grupos polieno de la astaxantina dentro de la monocapa de los oleosomas (Hama et al., 2012).

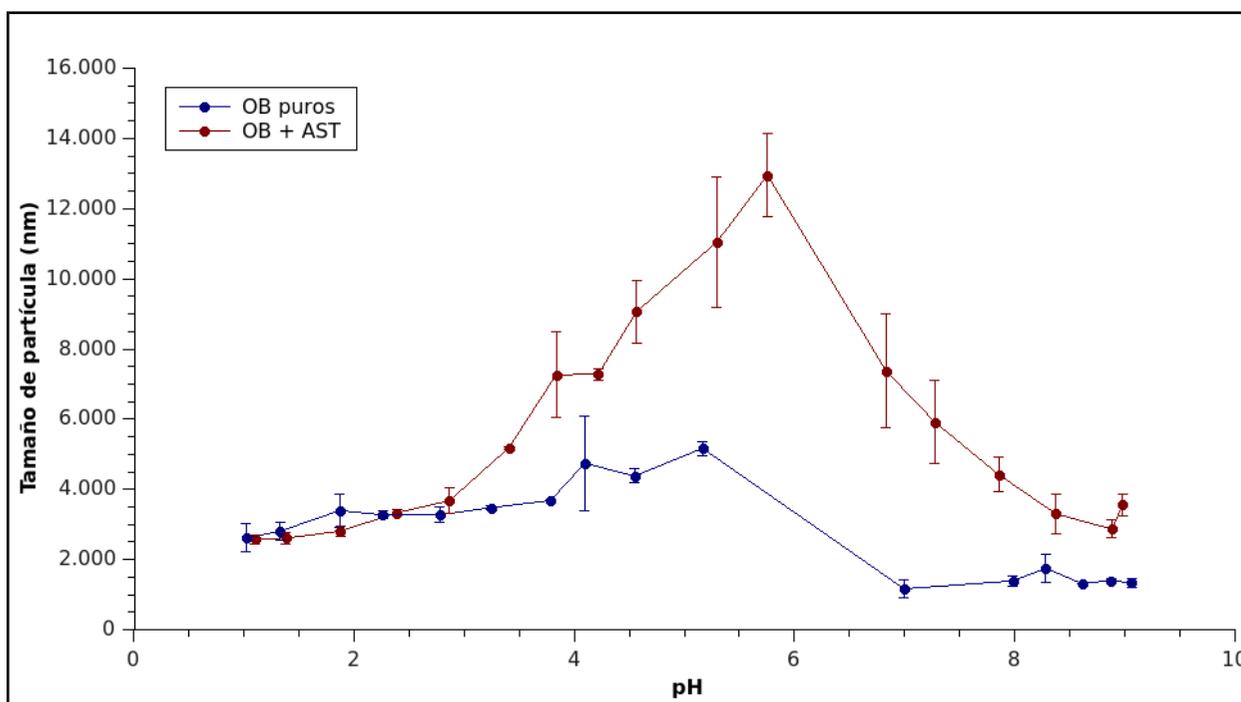


Figura 13: Cambio en el tamaño de partículas de oleosomas libres y cargados con astaxantina frente al cambio de pH.

4.5.2 Efecto de temperatura

4.5.2.1 Potencial zeta. Para la muestra de oleosomas puros, el potencial zeta fue ascendiendo a medida que la temperatura aumentaba, con un potencial zeta inicial de -17,5 mV, el que se mantuvo constante hasta los 35 °C en donde aumentó a -13,4 mV, en donde nuevamente se mantuvo relativamente constante hasta los 50 °C (Figura 14).

Si bien el potencial zeta en estas muestras aumentó, en general los valores se mantuvieron negativos, en donde al final del ensayo, a los 50 °C, el valor alcanzado fue de -12,5 mV. La estabilidad térmica de los oleosomas, tanto naturales como artificiales, ha sido documentada con anterioridad (Adams et al., 2012).

Por parte de los oleosomas cargados con astaxantina, el potencial zeta aumentó desde los -17,3 a los -4,9 mV en un rango de temperatura de 20 a 50 °C, sin alcanzar un potencial zeta igual a 0 (Figura 14).

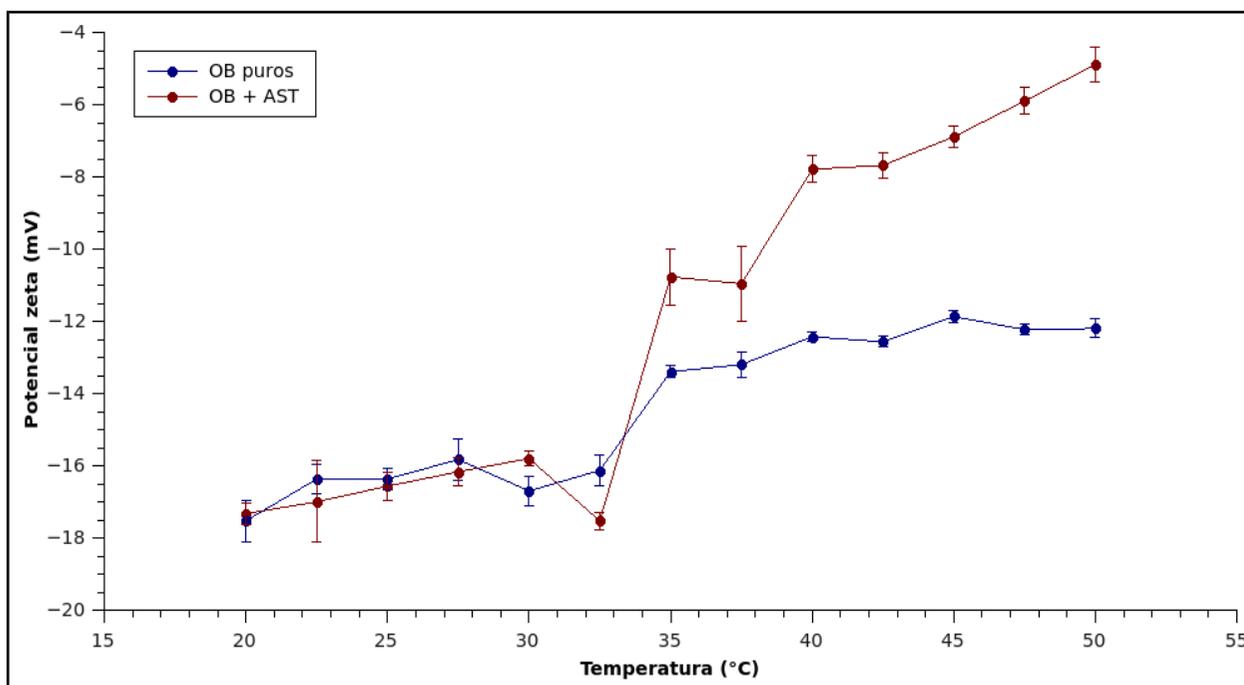
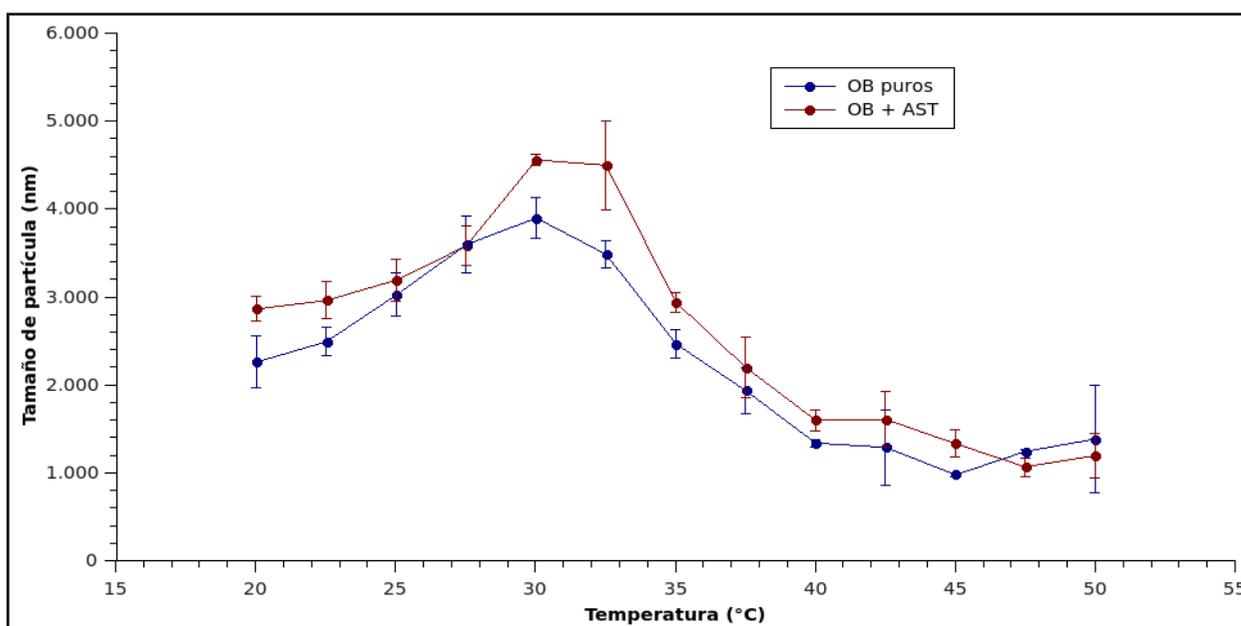


Figura 14: Cambio del potencial zeta de oleosomas puros y cargados con astaxantina respecto al aumento de temperatura, con un aumento de 2,5 °C.

Estos parámetros se han estudiado en oleosomas de otras especies. En oleosomas de calabaza se ha visto una tendencia similar: el potencial zeta se mantiene relativamente estable, al igual que el tamaño de partícula, sin embargo, alrededor de los 37 °C el tamaño comienza a descender (Adams et al., 2012), tendencia es similar a la observada en este estudio.

Aunque la explicación a éste fenómeno no se ha clarificado, se puede inferir que a temperaturas altas algunas proteínas de membrana de los oleosomas comienzan a desnaturalizarse y por lo tanto perder su estructura y funcionalidades.

4.5.2.2 Tamaño de partícula. En cuanto al tamaño de partícula de los oleosomas puros, éste aumentó hasta los 30 °C (3898 nm), en donde comienza a descender constantemente hasta los 50 °C llegando a un valor de 1031 nm. Los oleosomas cargados con astaxantina siguen la misma tendencia de los oleosomas puros en cuanto al tamaño de partícula, sufriendo un descenso de éste a partir de los 30 °C (Figura 15). Si bien el potencial zeta disminuye con el aumento de temperatura, se observa que el tamaño de partícula también disminuye. Esto se puede deber a, como se menciona anteriormente, la desnaturalización de las proteínas de membrana, lo que llevaría a una alteración de esta membrana y una disminución en el tamaño de los oleosomas.



Figuras 15: Cambio del tamaño de partícula en oleosomas puros y cargados con astaxantina respecto del aumento de temperatura en el medio.

4.5.3 Efecto de la fuerza iónica

4.5.3.1 Potencial zeta. Respecto a los oleosomas puros, la muestra control (oleosomas sin presencia de NaCl) mostró un potencial zeta de -16,9 mV, sin embargo el cambio fue notorio respecto de la muestra con 25 mM de NaCl, en donde el potencial zeta llegó a los -7,78 mV, . En presencia de las concentraciones de NaCl siguientes (50, 75, y 100 mM), el potencial cambió levemente, pero mostró una tendencia hacia 0 (Figura 16). Por lo tanto, la carga de la capa externa de los oleosomas se ve fuertemente afectada por el cambio en la fuerza iónica.

En cuanto a los oleosomas cargados con astaxantina, se observó una curva similar a la observada para los oleosomas puros, con un potencial zeta de -32 mV, él que comenzó a acercarse a cero a medida que fue aumentando la fuerza iónica (Figura 16).

Se ha visto en otros estudios una tendencia similar, en donde el potencial zeta de oleosomas tiende a acercarse a 0 (Yang et al., 2012; McClements et al, 2005; Adams et al., 2012). El descenso en el potencial zeta en suspensiones coloidales respecto al aumento de la fuerza iónica puede deberse al efecto conocido como apantallamiento electrostático (*electrostatic screening effect*, en inglés) (McClements et al, 2005).

También hay un efecto de los iones Na^+ (Acevedo et al, 2012). Los iones Na^+ pueden desplazar parcialmente los iones disueltos (Mg^{+2} , Ca^{+2}) asociados con la fuerza iónica de oleosinas a pH neutro. El hecho de que los oleosomas tengan, en general, un potencial zeta relativamente bajo (alrededor de +/- 20 mV) puede ser la causa de que concentraciones de NaCl bajas (25-50 mM) produzcan cambios en el potencial zeta (Iwanaga et al., 2008).

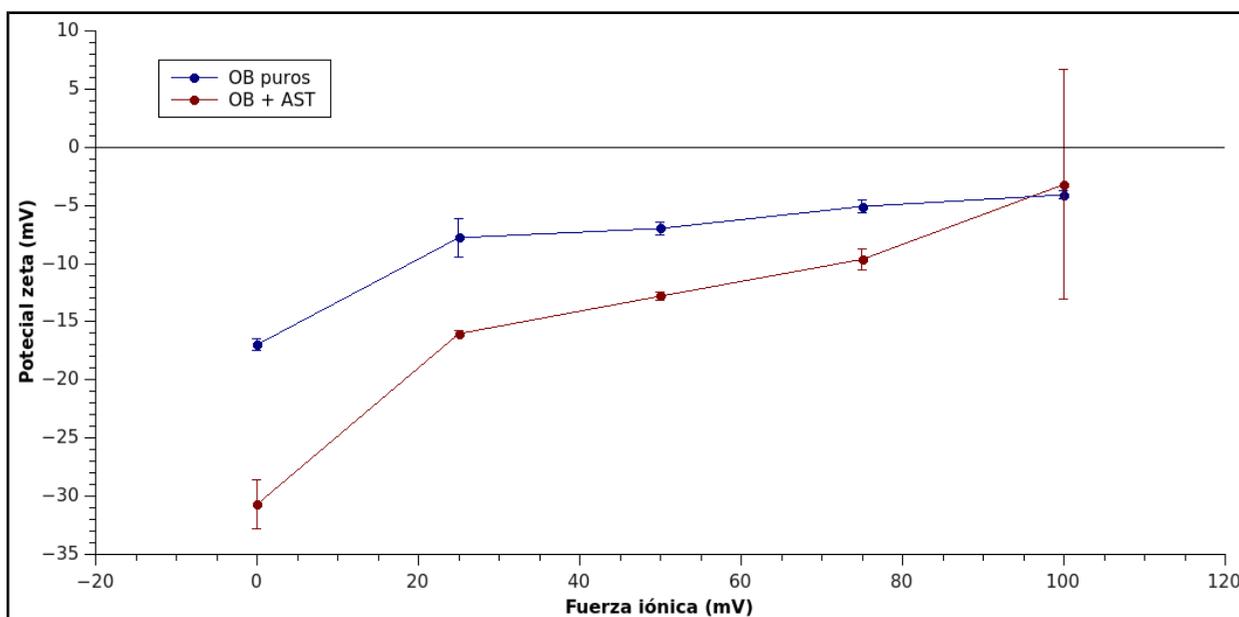


Figura 16: Cambio del potencial zeta frente a cambio en la fuerza iónica, en oleosomas puros y cargados con astaxantina, a pH y temperatura constantes, utilizando distintas concentraciones de NaCl (0, 25, 50, 75 y 100 mM).

4.3.3.2 Tamaño de partícula. Para oleosomas puros, el tamaño de partícula presentó una tendencia a descender a medida que aumentaba la fuerza iónica. Sin embargo, se hubiera esperado una tendencia contraria, al igual que aquella presentada en oleosomas de otras especies en presencia de iones de sodio (Iwanaga et al., 2008; Yang et al., 2012). En el caso de los oleosomas cargados con astaxantina, no se observaron cambios aparentes en el diámetro de partícula a medida que aumentaba la fuerza iónica.

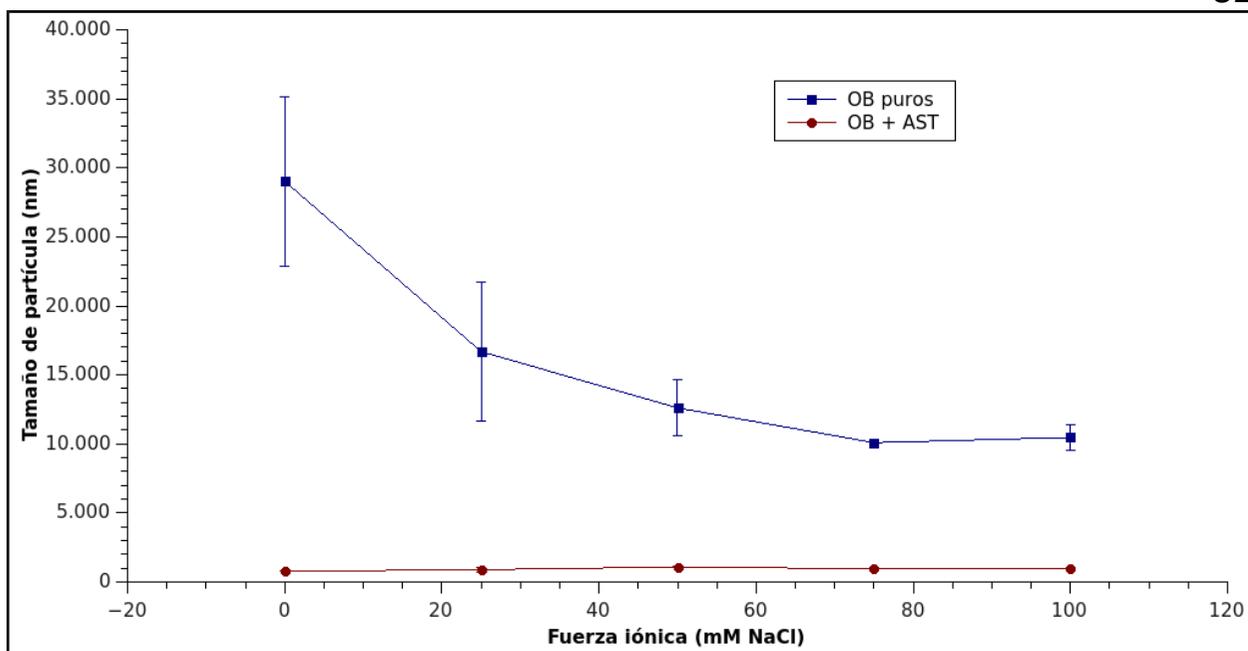


Figura 17: Cambio del tamaño de partículas de oleosomas puros frente a aumento de fuerza iónica, a pH y temperatura constantes, utilizando distintas concentraciones de NaCl (0, 25, 50, 75 y 100 mM).

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados de la evaluación de la estabilidad de los oleosomas puros y cargados con astaxantina se concluye que:

- Poseen capacidad tensioactiva, propiedad importante para poder ser utilizados como ingrediente funcional en la formulación de alimentos.
- Presentan estabilidad a condiciones ácidas y básicas, además de ser estables frente a cambios de temperatura (20 - 50 °C), lo que es importante para su almacenamiento y condiciones de procesamiento en la industria de alimentos.
- Son fuertemente afectados por cambios en la fuerza iónica.

En cuanto a la digestión gástrica los oleosomas puros y cargados con astaxantina, pierden su estructura proteica lo que permitiría dejar la astaxantina accesible para ser transportada hacia el intestino delgado.

Luego, en la simulación de digestión intestinal se produce liberación de ácidos grasos, demostrando que los oleosomas pueden liberar su contenido en esta etapa de la digestión

Finalmente, se concluye que los oleosomas son cápsulas estables que pueden ser utilizadas como transportadores eficientes a nivel gástrico e intestinal de moléculas bioactivas como astaxantina constituyendo un ingrediente funcional interesante para la industria de alimentos.

6. LITERATURA CITADA

- Acevedo, F., Rubilar, M., Jofré, I., Villarroel, M., Navarrete, P., Esparza, M., ... Shene, C.** 2014. Oil bodies as a potential microencapsulation carrier for astaxanthin stabilization and safe delivery. *Journal of microencapsulation*.
- Adams, G.G., Imran, S., Wang, S., Mohammad, A., Samil Kok, M., Gray, D.A., ... Harding, S.E.** 2012. Extraction, isolation and characterisation of oil bodies from pumpkin seeds for therapeutic use. *Food Chemistry*. 134(4): 1919-1925.
- Allen, R. & Tresini, M.** 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine*. 28(3): 463-499.
- AOAC International.** 1990. AOAC: Official Methods of Analysis.
- Bae, E.K. & Lee, S.J.** 2008. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of microencapsulation*. 25(8): 549-560.
- Barragán-Huerta, B.E., Bustos-Garza, C. & Yáñez-Fernández, J.** 2013. Thermal and pH stability of spray-dried encapsulated astaxanthin oleoresin from *Haematococcus pluvialis* using several encapsulation wall materials. *Food Research International*. 54(1): 641-649.
- Barros, M.P., Pinto, E., Colepicolo, P. & Pedersén, M.** 2001. Astaxanthin and Peridinin Inhibit Oxidative Damage in Fe²⁺-Loaded Liposomes: Scavenging Oxyradicals or Changing Membrane Permeability? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 288(1): 225-232.
- Beisson, F, Ferte, N. & Noat, G.** 1996. Oil-bodies from sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *The Biochemical journal*. 317 (Pt 3): 955-956.
- Beisson, Frédéric, Ferte, N., Bruley, S., Voultoury, R., Verger, R. & Arondel, V.** 2001. Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1531(1-2): 47-58.
- Cardounel, A.J., Dumitrescu, C., Zweier, J.L. & Lockwood, S.F.** 2003. Direct superoxide anion scavenging by a disodium disuccinate astaxanthin derivative: relative efficacy of individual stereoisomers versus the statistical mixture of stereoisomers by electron paramagnetic resonance imaging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 307(3): 704-712.
- Chardot, T., Purkrtova, Z., Jolivet, P. & Miquel, M.** 2008. Structure and function of seed lipid body-associated proteins. *Comptes Rendus Biologies*. 331(10): 746-754.

- Chen, B., McClements, D.J., Gray, D.A. & Decker, E.A.** 2012. Physical and oxidative stability of pre-emulsified oil bodies extracted from soybeans. *Food Chemistry*. 132(3): 1514-1520.
- Chow, C.K.** 1979. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *The American journal of clinical nutrition*. 32(5): 1066-1081.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K.N. & Ravishankar, G.A.** 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*. 16(9): 389-406.
- Dutta, D., Goswami, G. & Chaudhuri, S.** 2010. The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26(11): 1925-1939.
- Facchinetti, F., Dawson, V.L. & Dawson, T.M.** 1998. Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cellular and molecular neurobiology*. 18(6): 667-682.
- Gallier, S. & Singh, H.** 2012. Behavior of almond oil bodies during in vitro gastric and intestinal digestion. *Food & Function*. 3(5): 547.
- Guzey, D., Kim, H.J. & McClements, D.J.** 2004. Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. *Food Hydrocolloids*. 18(6): 967-975.
- Hama, S., Uenishi, S., Yamada, A., Ohgita, T., Tsuchiya, H., Yamashita, E. & Kogure, K.** 2012. Scavenging of Hydroxyl Radicals in Aqueous Solution by Astaxanthin Encapsulated in Liposomes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 35(12): 2238-2242.
- Haykiri-Acma, H. & Yaman, S.** 2008. Thermal reactivity of rapeseed (*Brassica napus* L.) under different gas atmospheres. *Bioresource Technology*. 99(2): 237-242.
- Hou, R.C.W., Lin, M.Y., Wang, M.M.C. & Tzen, J.T.C.** 2003. Increase of Viability of Entrapped Cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in Artificial Sesame Oil Emulsions. *Journal of Dairy Science*. 86(2): 424-428.
- Huang, A.H.C.** 1992. Oil bodies and oleosins in seeds. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*.
- Iwanaga, D., Gray, D., Decker, E.A., Weiss, J. & McClements, D.J.** 2008. Stabilization of Soybean Oil Bodies Using Protective Pectin Coatings Formed by Electrostatic Deposition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(6): 2240-2245.
- Jones, D.P.** 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *AJP: Cell Physiology*. 295(4):

C849-C868.

- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J.B. & Reppas, C.** 2006. Characterization of the Human Upper Gastrointestinal Contents Under Conditions Simulating Bioavailability/Bioequivalence Studies. *Pharmaceutical Research*. 23(1): 165-176.
- Kotake-Nara, E. & Nagao, A.** 2011. Absorption and Metabolism of Xanthophylls. *Marine Drugs*. 9(12): 1024-1037.
- Kritchevsky, S.B.** 1999. beta-Carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. *The Journal of nutrition*. 129(1): 5-8.
- Lawlor, S.. & O'Brien, N..** 1995. Astaxanthin: Antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts. *Nutrition Research*. 15(11): 1695-1704.
- Lee, J.-Y., Yang, Y. & Kim, B.** 2013. Astaxanthin Structure, Metabolism, and Health Benefits. *Journal of Human Nutrition & Food Science*.
- Matsushita, Y., Suzuki, R., Nara, E., Yokoyama, A. & Miyashita, K.** 2000. Antioxidant activity of polar carotenoids including astaxanthin-beta-glucoside from marine bacterium on PC liposomes. *Fisheries Science*. 66(5): 980-985.
- McClements, David Julian & Li, Y.** 2010a. Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*. 1(1): 32.
- McClements, David Julian & Li, Y.** 2010b. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*. 159(2): 213-228.
- McCLEMENTS, D.J., Demetriades, K. & Coupland, J.N.** 1997. Physical Properties of Whey Protein Stabilized Emulsions as Related to pH and NaCl. *Journal of Food Science*. 62(2): 342-347.
- McClements, D.Julian, Aoki, T. & Decker, E.A.** 2005. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocolloids*. 19(2): 209-220.
- Mercke Odeberg, J., Lignell, Å., Pettersson, A. & Höglund, P.** 2003. Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 19(4): 299-304.
- Morikawa, M., Hirata, Y. & Imanaka, T.** 2000. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell*

- Biology of Lipids. 1488(3): 211-218.
- Nagao, A.** 2011. Absorption and metabolism of dietary carotenoids. *BioFactors*. 37(2): 83-87.
- Naito, Y., Uchiyama, K., Aoi, W., Hasegawa, G., Nakamura, N., Yoshida, N., ... Yoshikawa, T.** 2004. Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *BioFactors*. 20(1): 49-59.
- Nitschke, M. & Costa, S.G.V.A.O.** 2007. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 18(5): 252-259.
- O'Connor, I. & O'Brien, N.** 1998. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by β -carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*. 16(3): 226-230.
- Okada, Y., Ishikura, M. & Maoka, T.** 2009. Bioavailability of astaxanthin in Haematococcus algal extract: the effects of timing of diet and smoking habits. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 73(9): 1928-1932.
- Olaizola, M., Guerin, M. & Huntley, M.E.** 2003. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. 21(5): 210-216.
- Onay, O. & Kockar, O.M.** 2003. Slow, fast and flash pyrolysis of rapeseed. *Renewable Energy*. 28(15): 2417-2433.
- Palozza, P. & Krinsky, N.I.** 1992. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 297(2): 291-295.
- Pashkow, F.J., Watumull, D.G. & Campbell, C.L.** 2008. Astaxanthin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *The American Journal of Cardiology*. 101(10): S58-S68.
- Pu, J., Bankston, J.D. & Sathivel, S.** 2011. Developing microencapsulated flaxseed oil containing shrimp (*Litopenaeus setiferus*) astaxanthin using a pilot scale spray dryer. *Biosystems Engineering*. 108(2): 121-132.
- Ranga Rao, A., Raghunath Reddy, R.L., Baskaran, V., Sarada, R. & Ravishankar, G.A.** 2010. Characterization of Microalgal Carotenoids by Mass Spectrometry and Their Bioavailability and Antioxidant Properties Elucidated in Rat Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(15): 8553-8559.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S. & Kamat, M.Y.** 2008. The Carotenoid Pigment Zeaxanthin—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 7(1): 29-49.
- Sarada, R., Tripathi, U. & Ravishankar, G..** 2002. Influence of stress on astaxanthin

- production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry*. 37(6): 623-627.
- Spiller, G.A. & Dewell, A.** 2003. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized clinical trial. *Journal of medicinal food*. 6(1): 51-56.
- Tzen, J.T.C.** 2012. Integral Proteins in Plant Oil Bodies. *ISRN Botany*. 2012: 1-16.
- Tzen, J.T., Chuang, R.L., Chen, J.C. & Wu, L.S.** 1998. Coexistence of both oleosin isoforms on the surface of seed oil bodies and their individual stabilization to the organelles. *Journal of biochemistry*. 123(2): 318-323.
- Uchiyama, K., Naito, Y., Hasegawa, G., Nakamura, N., Takahashi, J. & Yoshikawa, T.** 2002. Astaxanthin protects β -cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Report*. 7(5): 290-293.
- Vance, V.B. & Huang, A.H.** 1987. The major protein from lipid bodies of maize. Characterization and structure based on cDNA cloning. *The Journal of biological chemistry*. 262(23): 11275-11279.
- Voelker, T. & Kinney, A.J.** 2001. VARIATIONS IN THE BIOSYNTHESIS OF SEED-STORAGE LIPIDS. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 52: 335-361.
- Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I. & Wozniak, L.A.** 2010. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Current medicinal chemistry*. 17(28): 3262-3288.
- Yang, X.-Q., Wu, N.-N., Huang, X., Guo, J., Zheng, E.-L., Yin, S.-W., ... Zhang, J.-B.** 2012. Stabilization of soybean oil body emulsions using ι -carrageenan: Effects of salt, thermal treatment and freeze-thaw cycling. *Food Hydrocolloids*. 28(1): 110-120.
- Yatsu, L.Y. & Jacks, T.J.** 1972. Spherosome Membranes: Half Unit-Membranes. *PLANT PHYSIOLOGY*. 49(6): 937-943.
- Yuan, J.-P., Peng, J., Yin, K. & Wang, J.-H.** 2011. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular Nutrition & Food Research*. 55(1): 150-165.

7. ANEXOS

7.1 Productividad científica

7.1.1 Congreso Nacional

2013. Vilches, A.; Acevedo, F.; Burgos-Díaz, C.; Rubilar, M. *Digestión gástrica e intestinal de oleosomas de raps como fuente estable de ácidos grasos esenciales.* XIX Congreso nacional de Ciencias y Tecnología de los Alimentos. Innovación y seguridad: Claves para el desarrollo de alimentos saludables. 27 al 30 Octubre 2013. Antofagasta, Chile

7.1.2 Artículo aceptado

2014. F. Acevedo, M. Rubilar, I. Jofré, M. Villarroel, P. Navarrete, , M. Esparza, F. Romero, Vilches E., V. Acevedo, C. Shene. *Oil bodies as a potential microencapsulation carrier for astaxanthin stabilization and safe delivery.* Journal of Microencapsulation (accepted).

Esta tesis ha sido financiada por el proyecto **FONDECYT n° 3120022**El autor de este trabajo agradece a la Dra. Mónica Rubilar, por facilitar las instalaciones y equipamiento de su laboratorio para llevar a cabo los ensayos requeridos.