

ENCAPSULACION DE ACIDO LINOLEICO CONJUGADO EN LIPOSOMAS. FORMULACION Y CARACTERIZACION FISICOQUIMICA

Zanel Paula

Instituto de Lactología Industrial INLAIN-UNL-CONICET

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras clave: liposomas, ácido linoleico conjugado, alimentos funcionales

INTRODUCCION

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un ácido graso bioactivo, provee beneficios a la salud más allá de su aporte nutricional básico (Hur y col., 2007). Sin embargo, su utilización en alimentos es limitada debido a que es susceptible al deterioro, especialmente la oxidación, conllevando a la pérdida de la bioactividad de interés y la aparición de moléculas no deseadas. Una aproximación para lograr alimentos lácteos enriquecidos en este compuesto bioactivo sin los defectos asociados a su deterioro sería la adición de CLA protegido por encapsulamiento, uno de los métodos novedosos es el de los liposomas. Las estructuras liposomales son bicapas fosfolipídicas que favorecen la solubilidad y biodisponibilidad de los componentes liposolubles; además, son muy susceptibles al tipo y concentración de fosfolípidos, naturaleza del compuesto a encapsular, método de preparación, presencia de colesterol, lípidos iónicos, etc. (Sekhon, 2010). El objetivo del presente trabajo fue estudiar dos tipos de formulaciones liposomales en las que se modificó la proporción de fosfolípido: CLA. Para ello, las suspensiones se caracterizaron en tamaño, eficiencia de incorporación de CLA y fluidez de membrana a los 3 y 30 días de almacenamiento.

METODOLOGIA

Preparación de liposomas

Los liposomas se prepararon según la técnica de inyección etanólica (Wagner y col., 2006). Para ello, se utilizaron fosfolípidos de soja PC (Phospholipon 90 G, Lipoid, Suiza) y ácido linoleico conjugado CLA (isómeros 9c, 11t y 10t, 12c, BASF, Alemania) en dos proporciones (PC : CLA) diferentes (formulaciones A y B, información protegida). Además, se incluyeron controles sin CLA para cada formulación. Las suspensiones liposomales se conservaron a 4°C y se analizaron a los 3 y 30 días de almacenamiento.

Distribución de tamaño

Se determinó la distribución de tamaño registrándose el índice de polidispersión (PDI) y se identificó su valor medio utilizando un equipo DLS (modelo BI 200, Brookhaven, Inglaterra). El análisis se realizó por triplicado, a 25°C y a un ángulo de detección de 90°.

Proyecto: **Estrategias tecnológicas para favorecer la producción de compuestos bioactivos (galacto oligosacáridos, fosfopéptidos y ácido linoleico conjugado) en yogur. (CAI+D- UNL 2011)**

Director del proyecto: Ma. Cristina Perotti

Director del becario/tesista: Ma. Ayelén Vélez

Eficiencia de encapsulación de CLA. Cromatografía Gaseosa.

Una alícuota de las formulaciones se microfiltró en tubos falcon (Amicon, Millipore, Estados Unidos, peso molecular de corte: 10 KDa) por centrifugación (4000 g durante 45 minutos a 20°C). Los liposomas con CLA permanecieron en la fracción retenida y el sobrenadante con CLA no incorporado a los liposomas en el permeado. El contenido de CLA se determinó en suspensión original (3 días, $C_{suspensión}$) y en fracción retenida ($C_{retenido}$) por cromatografía gaseosa, calculando la eficiencia de encapsulación como muestra la **ecuación 1**:

$$EE\% = \frac{C_{retenido}}{C_{suspensión}} \times 100 \quad (1)$$

Los ácidos grasos se derivatizaron a ésteres metílicos (FAME) mediante la adaptación de la técnica de esterificación ácida *in situ* de acuerdo al trabajo de Park y Goins (1994); la cuantificación se realizó por el método del estándar interno. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, serie 9000, Estados Unidos) utilizando una columna capilar HP-INNOWAX (60 m x 0.25 um x 0.25 mm) (Agilent J&W, Estados Unidos).

Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)

El estudio de la fluidez de las membranas liposomales se llevó a cabo mediante la incorporación de los marcadores de espín 5-doxil ácido esteárico y 16-doxil esteárico (5-SASL y 16-SASL, Sigma, Estados Unidos). El primero, censa la parte externa de la membrana y el segundo, se ubica en la parte media de la membrana. Las suspensiones de liposomas se marcaron a una relación molar marcador/lípido del 1%. Los espectros de resonancia paramagnética electrónica fueron registrados a la temperatura de 25°C y frecuencia de banda X en un espectrómetro Bruker EMX-Plus con control de temperatura por circulación de nitrógeno. Para ambos marcadores se calculó el parámetro de orden S y para 16-SASL se calculó además el tiempo de correlación Tc. (Pincelli y col., 2000).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de variancia (ANOVA) para detectar diferencias significativas entre las formulaciones y controles analizados y para determinar la influencia del tiempo. Las medias se compararon por el test de Tukey. Se utilizó el programa SPSS (10v SPSS Inc., Estados Unidos).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Al inicio del almacenamiento, la eficiencia de encapsulación de CLA para las dos formulaciones estudiadas fue similar y superior al 80%, el cual no tuvo cambios significativos durante el almacenamiento (**Tabla 1**). Según nuestro conocimiento, no existen datos publicados de CLA encapsulado en liposomas, pero valores similares se reportaron para la encapsulación de aceites omega-3 por Sahari y col. (2016).

En cuanto a la distribución de tamaño, se observaron poblaciones únicas con una PDI que se mantuvo con valores inferiores a 0.26 en todos los casos (**Tabla 1**) sin cambios significativos durante el tiempo y entre las formulaciones ($p > 0.05$), excepto para la

formulación B, cuyo PDI se incrementó con el tiempo ($p < 0.05$). Estos resultados indicarían una distribución de tamaño estrecha y relativamente homogénea (Ghorbanzade y col. 2017). Respecto al tamaño medio, se observó que tanto a los 3 como a 30 días la formulación B presentó mayor valor. En todos los casos los valores fueron menores a 300 nm. En este sentido, se conoce que el tamaño es un parámetro susceptible a cambios de formulación (Mozafari y col. 2008).

Por otro lado, el análisis por EPR arrojó diferencias notables entre las formulaciones (**Figura 1**). Cabe aclarar que para este análisis los controles se agruparon, ya que presentaban un único componente de membrana (PC).

Tabla 1: Eficiencia de encapsulación, tamaño e índice de polidispersión de las formulaciones liposomales estudiadas.

	Tiempo (días)	Controles A	Controles B	Formulación A	Formulación B
Eficiencia de encapsulación	3	-	-	$81.5^{aA} \pm 0.4$	$83^{aA} \pm 6$
	30	-	-	$93^{aA} \pm 23$	$71^{aA} \pm 11$
Tamaño (nm)	3	$203^{bA} \pm 1$	$153^{cA} \pm 6$	$198^{bA} \pm 16$	$272^{aA} \pm 13$
	30	$186^{bA} \pm 8$	$149^{bA} \pm 6$	$197^{bA} \pm 16$	$252^{aA} \pm 15$
Índice de polidispersión (PDI)	3	$0.18^{aA} \pm 0.007$	$0.16^{aA} \pm 0.04$	$0.146^{aA} \pm 0.007$	$0.144^{aB} \pm 0.006$
	30	$0.25^{aA} \pm 0.04$	$0.19^{aA} \pm 0.05$	$0.17^{aA} \pm 0.03$	$0.210^{aA} \pm 0.006$

^{a,b} Superíndices distintos indican diferencias significativas entre columnas ($p < 0.05$).

^{A,B} Superíndices distintos indican diferencias significativas entre las filas ($p < 0.05$).

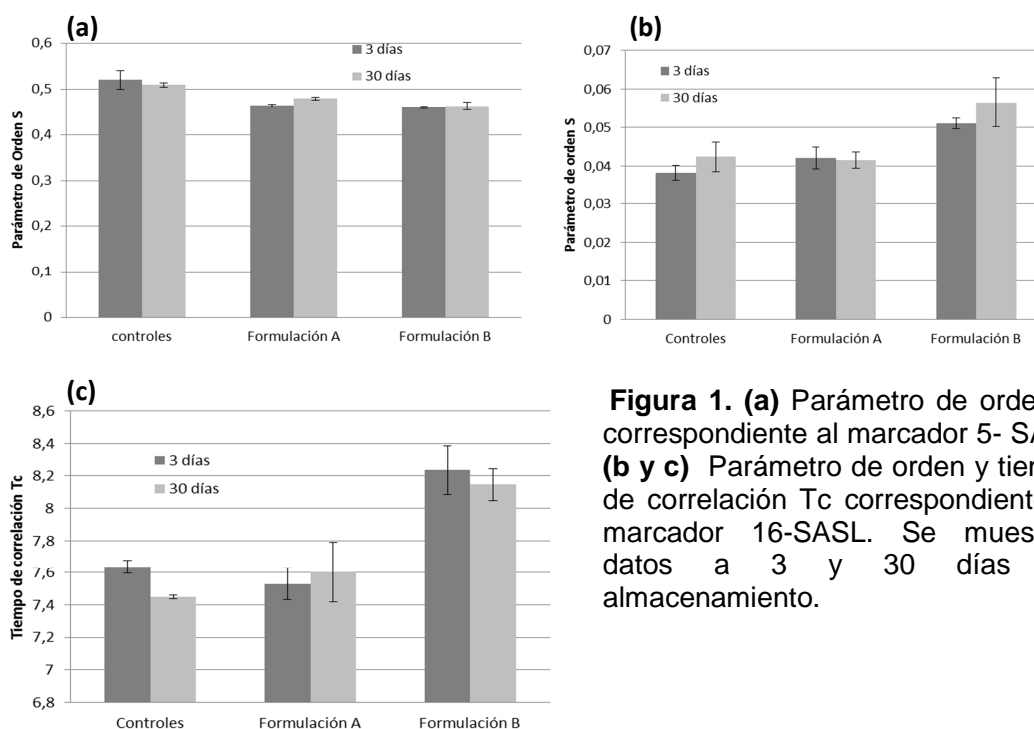


Figura 1. (a) Parámetro de orden S correspondiente al marcador 5- SASL (b y c) Parámetro de orden y tiempo de correlación Tc correspondiente al marcador 16-SASL. Se muestran datos a 3 y 30 días de almacenamiento.

Respecto al parámetro de orden S calculado a partir del marcador 5-SASL, se observó que para ambos tiempos de maduración las formulaciones con CLA presentaron menores valores que los controles ($p < 0.05$). En cuanto al tiempo de maduración, no se observó una influencia significativa del mismo para cada tipo de formulación ($p > 0.05$). Estos resultados indicaron que el CLA desordenó la bicapa fosfolipídica en la región externa, cercana a las cabezas polares, lo cual otorga mayor fluidez en esa zona. Por el contrario, cuando se analizó el marcador 16-SASL se observó que la formulación B presentaba mayor parámetro S a ambos tiempos de maduración ($p < 0.05$). El efecto también se reflejó en tiempo de correlación, el cual fue significativamente superior en la formulación B respecto a la formulación A y los controles a ambos tiempos de maduración ($p < 0.05$). Estos resultados muestran que en la formulación B la capa media de la membrana se rigidizó, presentando menor fluidez. Estudios similares en liposomas con CLA no se encuentran en bibliografía, pero estos resultados se encuentran en concordancia con otros autores que establecen que variaciones en la composición de las membranas fosfolipídicas influyen sobre la fluidez de las vesículas (Mendanha y Alonso, 2015).

CONCLUSIONES

Se obtuvieron suspensiones liposomales portadoras de CLA, con distribuciones de tamaño estrechas, valores de tamaño medios menores a 300 nm y con distintas características de membrana. Las formulaciones presentaron mayor desorden en la región externa incrementando su fluidez, pero en una de ellas la región interna se presentó el efecto contrario: mayor orden y menor fluidez. Estos resultados son promisorios ya que podrían tener implicancias en la digestibilidad de los ácidos grasos y en las propiedades físicas de los alimentos.

BIBLIOGRAFIA BASICA

- Ghorbanzade, T., Jafari, S.M., Akhavan, S., Hadavi R., 2017.** Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*. 1; 216:146-52.
- Hur S., Park G., Joo S., 2007.** Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. *Livestock Science* 110, 221-229.
- Mohammad A.S., Moghimi H.R., Hadian Z., Barzegar M., Mohammadi A., 2016.** Improved physical stability of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid encapsulated using nanoliposome containing α -tocopherol. *International Journal of Food Science and Technology* 2016, 51, 1075–1086.
- Mozafari MR., Johnson C., Hatziantoniou S. y Demetzos C., 2008.** Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research* 18(4) 309-327.
- Mendanha S. A., Alonso A., 2015.** Effects of terpenes on fluidity and lipid extraction in phospholipid membranes. *Biophysical Chemistry* 198 45–54.
- Park P. W. y Goins RE., 1994.** In Situ Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Analysis of Fatty Acid Composition in Foods. *Journal of Food Science* 59 (6)1262-1266.
- Pincelli M.M., Levstein P.R., Fidelio G.D., Gennaro A.M., 2000.** Cholesterol-induced alterations of the packing properties of gangliosides: an EPR study. *Chemistry and Physics Lipids* 104, 193-206.
- Sekhon B.S., 2010.** Food nanotechnology an overview. *Nanotechnology, Science and Applications* 3: 1–15.
- Wagner A., Platzgummer, M., Kreismayr G., Quendler H., Stiegler G., Ferko B., Vecera G., 2006.** GMP production of liposomes – A new industrial approach. *Journal of Liposome Research*, 16(3): 311-319.