

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN
BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“Antioxidantes en magaya de manzana: ex-
tracción, caracterización y encapsulación en
nanopartículas de origen vegetal”**

TRABAJO FIN DE MASTER
POR

WENWEN LIU

JULIO, 2017





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España



PROFESOR TUTOR:

Dr. Dra. Marta Elena Díaz García (Universidad de Oviedo)

Dr. Alfonso Fernández González (Universidad de Oviedo)

CERTIFICAN:

Que Dña. **Wenwen Liu** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11ª promoción curso 2016-2017.

Oviedo, 20 de julio de 2017

Dra. Marta Elena Díaz García

Dr. Alfonso Fernández González

VºBº

Dr. Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

Agradecimientos

Tras finalizar el presente trabajo de Fin de Máster, quisiera recordar a todas las personas e instituciones que me facilitaron la tarea del mismo, particularmente quiero agradecer:

A mis tutores, la Dra. Marta Elena Díaz García y el Dr. Alfonso Fernández González, por su paciencia, dedicación y motivación. Por ayudarme a cumplir este trabajo.

A Jing Chiu Chong Cheung, por su buena disposición en el laboratorio, por ayudarme en todo momento y por resolver mis dudas respecto a los antioxidantes y la magaya de manzana.

A Christian Chimeno Trinchet y Jorge Espina Casado, por el tiempo dedicado a enseñarme a trabajar en un laboratorio analítico y su compleja instrumentación.

Al Llagar Sidra Castañón de Villaviciosa, Asturias, por proporcionarnos la magaya que sirvió de materia prima para el desarrollo de este trabajo y sin cuya colaboración no habría sido posible.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	V
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABLAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA MAGAYA DE SIDRA	1
1.2 IMPORTANCIA DE LA REUTILIZACIÓN DE LA MAGAYA DE SIDRA	1
1.3 IMPORTANCIA DE LOS ANTIOXIDANTES	3
1.4 OBJETIVOS	4
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
2.1 ANTIOXIDANTES PRESENTES EN LA MAGAYA DE SIDRA	5
2.2 DISEÑO FACTORIAL PARA LA OPTIMIZACIÓN DE EXPERIMENTOS	6
2.3 EXTRACCIÓN SOXHLET	8
2.4 CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS.....	9
2.4.1 Espectroscopía VIS- UV.....	9
2.4.2 Espectroscopía FTIR.....	10
2.4.3 HPLC.....	11
2.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	13
2.5.1 Cuantificación de compuestos fenólicos totales (Método de Folin-Ciocalteu)	13
2.5.2 Método de captación de radicales (DPPH)	14
2.5.3 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)	16
2.6 SÍNTESIS DE NANOCÁPSULAS DE ZEÍNA	16
2.7 ENCAPSULACIÓN DE ANTIOXIDANTES	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.	19
3.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA	20
3.3. ÚTILLAJE DE LABORATORIO	21
3.4 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN	22
3.5 CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE MAGAYA DE SIDRA	23

3.5.1 Espectroscopía VIS- UV.....	24
3.5.2 Espectroscopía FTIR.....	24
3.5.3 HPLC.....	25
3.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	26
3.6.1 Cuantificación de compuestos fenólicos totales (Folin-Ciocalteu).....	26
3.6.2 Método de captación de radicales (DPPH).....	26
3.6.3 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP).....	27
3.7 SÍNTESIS DE NANOCÁPSULAS DE ZEÍNA.....	27
3.8 ENCAPSULACIÓN DE ANTIOXIDANTES.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN.....	31
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE MAGAYA DE SIDRA.....	33
4.2.1 Espectroscopía VIS- UV.....	33
4.2.2 Espectroscopía FTIR.....	34
4.2.3 HPLC.....	35
4.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	36
4.3.1 Cuantificación de compuestos fenólicos totales (Folin-Ciocalteu).....	36
4.3.2 Método de captación de radicales (DPPH).....	37
4.3.3 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP).....	38
4.4 SÍNTESIS DE NANOCÁPSULAS DE ZEÍNA.....	39
5. CONCLUSIONES.....	42
6. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	43
7. BIBLIOGRAFIA.....	44

Resumen

La industria de la sidra genera una gran cantidad de residuos en cada temporada de producción. El principal residuo, conocido como magaya en Asturias (España), es rico en nutrientes, vitaminas, minerales, polifenoles y celulosa. En este trabajo se ha optimizado la obtención de antioxidantes, preferentemente compuestos polifenólicos, a partir de magaya de sidra mediante extracción Soxhlet. La composición de los antioxidantes se caracterizó con HPLC, UV-Vis y FTIR. También se ha determinado la capacidad de antioxidante de la magaya mediante los métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH y FRAP. Finalmente se ha abordado la encapsulación de antioxidantes en nanopartículas de zeína y zeína-caseinato, Las nanopartículas se sintetizaron por el método de dispersión líquido-líquido, y se caracterizó su diámetro hidrodinámico.

Abstract

The cider industry generates a lot of waste during production season. The apple pomace residue, known as magaya in Asturias, is rich in nutrients, vitamins, minerals, polyphenols and cellulose. This work has optimized the preparation of antioxidants, preferably polyphenolic compounds, from the apple pomace of cider by Soxhlet extraction. The antioxidant composition was characterized by HPLC, UV-Vis and FTIR. The antioxidant capacity of apple pomace was also determined by Folin-Ciocalteu, DPPH and FRAP methods. Finally, the antioxidant encapsulation in zein and zein-caseinate nanoparticles was studied. Nanoparticles were synthesized by the liquid-liquid dispersion method, and its hydrodynamic diameter was characterized.

Lista de Figuras

Figura 1 Estructura de compuestos fenólicos	6
Figura 2 Equipo de extracción Soxhlet.....	8
Figura 3 Esquema básico de un espectrofotómetro FTIR.....	11
Figura 4 Componentes básicos de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución	12
Figura 5 Reducción y formación de color en el ensayo Folin-Ciocalteu.....	14
Figura 6 Mecanismo de la reacción de decoloración DPPH.....	15
Figura 7 Espectros de absorción del catión radical DPPH y de la forma reducida del mismo.....	15
Figura 8 Reducción del complejo Fe(TPTZ) ₂ ³⁺ en presencia de antioxidantes.....	16
Figura 9 Magaya de manzana fresca en el lugar de recogida de Llagar Sidra Castañón.	22
Figura 10 Extracción del antioxidante	24
Figura 11 Programa de elución	25
Figura 12 Nanocapsulas de zeína + caseinato (izquierda) y de zeína (derecha).....	28
Figura 13 De izquierda a derecha, disoluciones Z, ZC, B _Z y B _{ZC}	29
Figura 14 Curva de calibrado para la metodología Folin-Ciocalteu.....	31
Figura 15 Diagrama de Pareto de los efectos.....	32
Figura 16 Gráfica de interacción.....	33
Figura 17 Espectro UV-Vis del extracto alcohólico de magaya, diluido 1:100.	33
Figura 18 Espectro UV-Vis del extracto alcohólico de magaya, diluido 1:20.	34
Figura 19 Espectros FTIR-ATR de patrones y extracto de magaya	35
Figura 20 Cromatograma de los patrones a 280nm. 1 ácido gálico, 2 ácido clorogénico, 3 quercitrina, 4 epicatequina, 5 cumarina y 6 quercetina	36
Figura 21 Cromatograma de la muestra 2 a 280nm.....	36
Figura 22 La curva de calibración del método de DPPH.....	38
Figura 23 Comparación de los resultados obtenidos para la cantidad de antioxidantes por las tres metodologías de análisis.....	39
Figura 24 Distribución de diámetro obtenida por DLS de nanopartículas de zeína (arriba) y nanopartículas de zeína con magaya (abajo)	40

Lista de Tablas

Tabla 1 Valores (+) y (-) de los factores seleccionados para el diseño factorial	23
Tabla 2 Datos de la optimización.....	31
Tabla 3 Diámetros hidrodinámicos y PDI para los cuatro tipos de nanocápsulas sintetizadas.....	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación actual de la magaya de sidra

La sidra es una bebida alcohólica preparada a partir de zumo de manzana, es la segunda mayor producción de vino de fruta, solo después del de uva en el mundo.

España es el cuarto país productor de sidra en la Unión Europea con un 8% del total de la producción, por detrás de Reino Unido (58%), Francia (13%) y Alemania (11%). En nuestro país hay un líder claramente destacado, el cual, durante la campaña del año 2016 alcanzó una producción de 32 millones de litros de sidra. A nivel nacional, Asturias produce alrededor del 80% del total de sidra elaborada en España. Se producen más de 20.000 toneladas de orujo de manzana por año. (AICV, 2000).

El mayor residuo que se obtiene en la elaboración de la sidra se conoce en Asturias como magaya. Se obtiene tras el prensado de las manzanas para obtener el zumo y está formado principalmente por restos de pulpa, piel y pepitas. Este residuo es rico en nutrientes, vitaminas, minerales, polifenoles y celulosa. A nivel mundial se generan varios millones de toneladas de magaya de manzana (Bhushan et al., 2008).

1.2 Importancia de la reutilización de la magaya de sidra

Muchos residuos generados por las industrias agroalimentarias son fuentes potenciales de productos de alto valor añadido. El aprovechamiento de estos subproductos está siendo objeto de muchas investigaciones actualmente. La valorización de desechos del sector agroalimentario es una industria en auge, no solo por su valor estratégico sino por la importancia de proteger el medio ambiente y contribuir a la sostenibilidad de la propia industria.

Los productores de alimentos generan grandes cantidades de subproductos biológicos y residuos que podrían utilizarse para otros fines. La magaya de manzana representa una importante fuente potencial de residuos en muchos países.

Tradicionalmente la magaya de sidra se ha reaprovechado principalmente como alimento para el ganado y, por otra parte, como materia prima para la elaboración de orujo y para abono de cultivos. Debido al crecimiento exponencial de la industria sidrera y a la estacionalidad de la producción, la temporada de elaboración se reduce a dos meses en otoño, los usos tradicionales de la magaya no son suficientes. Por ello, es un residuo que causa problemas económicos por su alto coste de tratamiento y ambientales debido a su alta carga orgánica que puede contaminar acuíferos.

La magaya de manzana es un recurso muy interesante debido a la presencia de diferentes biomoléculas, en particular, polifenoles, fibra dietética, ácidos grasos y polisacáridos.

Las frutas y hortalizas son fuentes de antioxidantes naturales y entre ellas las manzanas tienen uno de los niveles más altos de actividad antioxidante (Chinnici, Bendini, Gaiani y Riponi, 2004). La magaya de manzana se ha utilizado como fuente para diversas aplicaciones (Vendruscolo et al., 2008), incluyendo la recuperación de pectina (Schieber et al., 2003), la alimentación animal (Sehm et al., 2007; Joshi et al., 2000), la producción de etanol (Hang et al., 1981) la producción de enzimas (Berovic y Ostroversnik, 1997; Favela-Torres et al., 2006), la producción de ácido cítrico, oligosacáridos y la producción de fibra dietética. Otra aplicación importante es la recuperación de antioxidantes naturales en forma de polifenoles (Bhushan et al., 2008). Muchos estudios demuestran que la manzana es un recurso rico en compuestos fenólicos (Tsuda et al., 1994).

El desarrollo de investigaciones y aprovechamiento de la magaya puede traer un futuro brillante, no sólo en el uso racional de los recursos como la resolución de problemas del medio ambiente, sino que también pueden traer enormes beneficios económicos.

1.3 Importancia de los antioxidantes

Los antioxidantes juegan un papel determinante en la eliminación de los radicales libres. Las reacciones de oxidación en los organismos pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación al oxidarse ellos mismos.

A pesar de los beneficios aparentes de los antioxidantes, éstas son moléculas inestables que están relacionadas con el desarrollo de una serie de enfermedades y condiciones degenerativas incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares, deterioro cognitivo, disfunción inmune, cataratas y degeneración macular (Leborgne, Maziere, Maziere y Andrejak, 2002, Folts, 2002).

El sistema antioxidante del cuerpo es comparable al sistema inmunológico, tiene unos mecanismos de acción muy complejos que cuando funcionan correctamente permiten una vida más saludable.

Cada vez más estudios demuestran que el empleo de antioxidantes es muy importante en la prevención del envejecimiento, debido a que los radicales libres u oxidantes pueden descomponer células y tejidos, lo que afecta el metabolismo y causa diversos problemas de salud. Si se pudiese eliminar el exceso de oxidación de radicales libres, muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento podrían prevenirse. Por ejemplo, formas comunes de cáncer, arteriosclerosis, diabetes, cataratas, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Alzheimer, artritis, etc. Se cree que estas enfermedades están asociadas con los radicales libres.

Por ello, debemos lograr una adecuada ingesta de antioxidantes ya sea en la propia dieta o a través de suplementos alimenticios para tener bajas tasas de degradación del cuerpo, evitar el envejecimiento de la piel, y mantener un aspecto saludable.

1.4 Objetivos

Según lo mencionado en los apartados anteriores. La magaya posee gran cantidad de compuestos de interés. Por ello, en el presente trabajo se estudiará un posible uso de la magaya y, en concreto, el aprovechamiento de antioxidantes tras su extracción de la propia magaya.

A continuación, se enumeran los objetivos de este trabajo:

- Optimizar la obtención de antioxidantes, preferentemente compuestos polifenólicos, a partir de magaya de sidra mediante extracción Soxhlet.
- Caracterización de los antioxidantes extraídos mediante técnicas analíticas como HPLC, UV-Vis y FTIR.
- Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de magaya empleando los métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH y FRAP.
- Síntesis de nanocápsulas de origen vegetal para la encapsulación antioxidantes.

2. Fundamentos teóricos

2.1 Antioxidantes presentes en la magaya de sidra

La magaya de sidra presenta diferentes compuestos con capacidad antioxidantes (Sun et al., 2002). Los compuestos fenólicos que se producen en la manzana se pueden dividir en varios grupos (Figura 1):

- (a) ácidos hidroxibenzoicos: ácido p-hidroxibenzoico, ácido protocatequídico, ácido gálico, ácido jeringa, ácido gentísico,
- (b) ácidos hidroxicinámicos y sus derivados: ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico, clorogénico,
- (c) flavonoles: como la quercetina, que se presenta en forma glicosilada,
- (d) di-hidrocalconas: floricina y sus derivados,
- (e) antocianos: cianidinas y sus glicosidos, flavanoles monoméricos como epicatequina y catequina,
- (f) flavanoles oligoméricos: como la procianidina B2 (Monika K. et al.,2014).

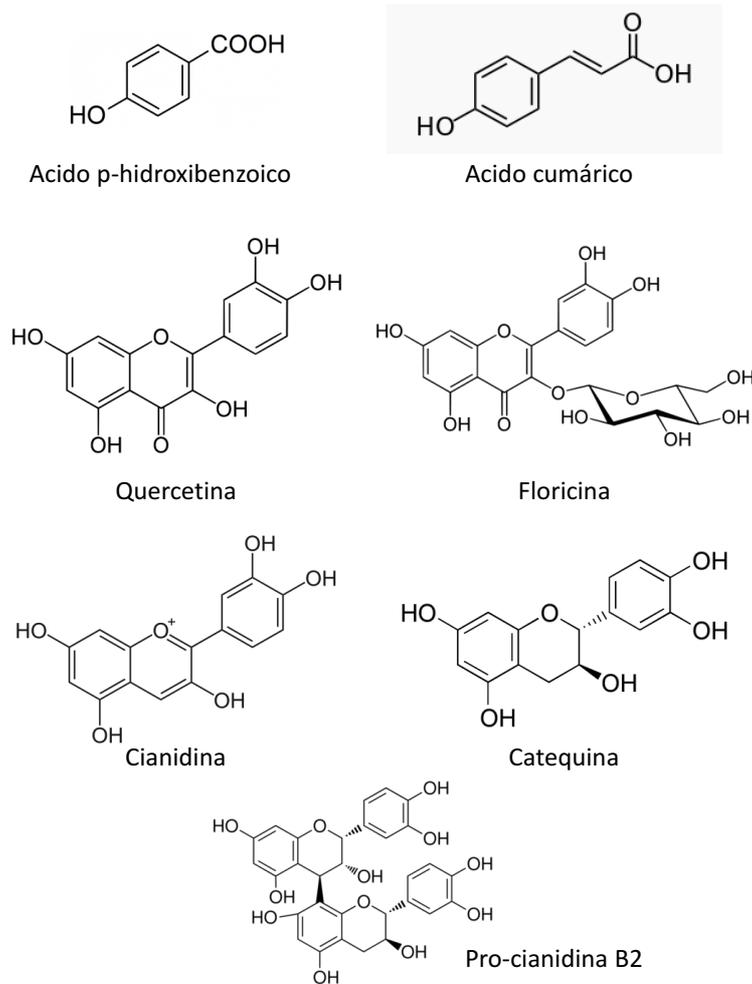


Figura 1 Estructura de compuestos fenólicos

2.2 Diseño factorial para la optimización de experimentos

Los diseños factoriales completos son la estrategia experimental óptima para estudiar simultáneamente el efecto de varios factores sobre la respuesta y sus interacciones. Por su potencia y sencillez, su campo de aplicación es muy amplio.

El método tradicional de variar un factor cada vez no suele ser la mejor opción. Puede implicar más experimentos de los necesarios y, a pesar de ello, proporcionar sólo información parcial. Por ejemplo, no mostrará si existe interacción entre factores. Las interacciones suelen ser muy corrientes y a veces son los efectos más importantes, por lo que conocerlas es imprescindible para comprender el comportamiento de muchos sistemas.

El diseño factorial completo 2^k describe los experimentos más adecuados para conocer simultáneamente qué efecto tienen k factores sobre una respuesta y descubrir si interactúan entre ellos. (Khoshrooz Kazemi, et al., 2016).

Estos experimentos están planeados de forma que se varían simultáneamente varios factores, pero se evita que se cambien siempre en la misma dirección. Al no haber factores correlacionados se evitan experimentos redundantes. Además, los experimentos se complementan de tal modo que la información buscada se obtiene combinando las respuestas de todos ellos. Esto permite obtener la información con el mínimo número de experimentos (y, por tanto, con el menor coste) y con la menor incertidumbre posible (porque los errores aleatorios de las respuestas se promedian).

El diseño factorial tiene las características siguientes:

- (1) poder probar simultáneamente el efecto de varios factores en sí
- (2) influenciar mutua entre los factores se puede evaluar
- (3) aumentar el número de repeticiones de cada factor, para reducir el error experimental.

Esta metodología tiene las ventajas de: no desperdiciar materia prima (reactivos, aditivos, entre otros), requiere poco tiempo de análisis, tiene en cuenta las interacciones bifactoriales, trifactoriales, etc, también posee la gran ventaja de que una vez realizado el plan de experiencias, se obtiene una ecuación que describe el comportamiento del sistema dentro de los rangos predichos. (Pedro D. et, al.,2010).

La utilización del diseño experimental factorial 2^k es muy favorable y sobre todo adecuada para llevar a cabo investigaciones de optimización, puesto que en éstas es de vital importancia estudiar los efectos que producen una o más variables, sus consecuencias y la relación causa-efecto que se puede originar entre ellas, parámetros bajo los cuales el diseño factorial cobra su importancia, dado que son precisamente éstos los argumentos por los cuales se determina la utilización o no de dicho diseño experimental.

2.3 Extracción Soxhlet

El método de extracción Soxhlet es un método eficiente, muy selectivo y es la base de métodos de extracción automáticos sencillos. Además, posee un bajo consumo de energía,

pues se emplea un agente de extracción con bajo punto de ebullición. El equipo necesario es simple y fácil de operar (ver Figura 2).

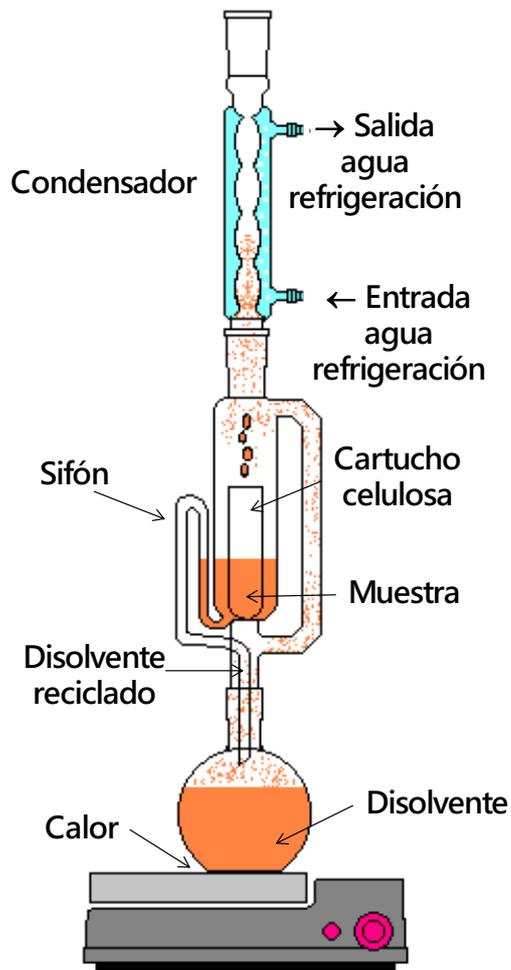


Figura 2 Equipo de extracción Soxhlet

Cuando el extractor Soxhlet se calienta, el disolvente se evapora y sube hasta el área superior de la cámara de extracción donde es condensado en la columna de refrigeración situada en la parte superior del equipo. El disolvente condensado cae dentro del cartucho en el que se encuentra la muestra (en nuestro caso, la magaya), disolviendo así los compuestos solubles en el mismo. Cuando la cantidad de disolvente alcanza un determinado nivel, por efecto sifón es arrastrado al matraz inferior, arrastrando consigo los compuestos solubilizados. El proceso se repite varias veces, hasta alcanzar el nivel de extracción deseado. Una vez, detenido el proceso, los compuestos extraídos se recuperan por evaporación del disolvente, quedando en el matraz como un residuo.

2.4 Caracterización de compuestos de interés

Para dilucidar la composición cualitativa de los antioxidantes presentes en el extracto de magaya de sidra, se emplearon diferentes técnicas analíticas: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

2.4.1 Espectroscopía VIS- UV

El número de bandas de absorción molecular, la intensidad y la longitud de onda de absorción máxima de los mismos depende de la estructura de los compuestos y de los cromóforos presentes en ellos.

La absorbancia (A) de una muestra a determinada longitud de onda depende de la cantidad de especie absorbente. La ley de Lambert-Beer relaciona la intensidad de luz incidente (I_0) en un medio con la intensidad de la radiación transmitida (I_T) después de que en dicho medio se produzca absorción. La relación entre ambas intensidades puede expresarse a través de la siguiente relación:

$$A = -\log_{10}(I_T/I_0) = \varepsilon \times l \times c$$

Expresión en la que l , es la longitud atravesada por la luz en el medio, c es la concentración molar de la especie absorbente en el medio y ε es el coeficiente de absorción molar (característico de la especie a una longitud de onda dada).

El equipo necesario es simple y de bajo costo. Además, permite un análisis rápido, de alta sensibilidad, alta precisión y exactitud.

2.4.2 Espectroscopia FTIR

La espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) es una técnica muy empleada para la identificación de compuestos gracias a su rapidez y facilidad de uso.

La radiación infrarroja (IR) emitida por la fuente de excitación atraviesa la muestra y, gracias al interferómetro de Michelson y a la transformada de Fourier, puede obtenerse la absorbancia a cada longitud de onda sin necesidad de separar éstas físicamente a través de un monocromador. El interferómetro más común es el de Michelson y está constituido por:

- Un divisor del haz IR incidente en dos haces
- Dos espejos planos (uno fijo, otro móvil) para reflejar los dos haces de luz hacia el divisor de haz donde interfieren de modo constructivo o destructivo, dependiendo de la posición del espejo móvil
- La posición del espejo móvil se expresa como diferencia de paso óptico (DPO) (ver Figura 3).

La espectrofotometría FTIR es rápida, sensible y permite el análisis multi-componente. Por otra parte, los espectros de infrarrojos, muestran al menos seis importantes zonas de absorción que permiten caracterizar los compuestos:

Región 1: $3700-3200\text{ cm}^{-1}$, característica de grupos $-\text{OH}$, alquino, amina o amida

Región 2: $3200-2700\text{ cm}^{-1}$, típica de grupos aldehído, carboxilo, alquil sp^3 , aril o vinil sp^2

Región 3: $2700-2000\text{ cm}^{-1}$, característica de grupos alquino $\text{C}\equiv\text{C}$, nitrilo $\text{C}\equiv\text{N}$

Región 4: $1850-1650\text{ cm}^{-1}$, característica de grupos carbonilo (cetonas, aldehídos, ester, amida)

Región 5: $1680-1450\text{ cm}^{-1}$, característica de grupos $\text{C}=\text{C}$ (alqueno, benceno)

Región 6: $1300-700\text{ cm}^{-1}$, región de la “huella digital”, de enlaces sencillos, compleja.

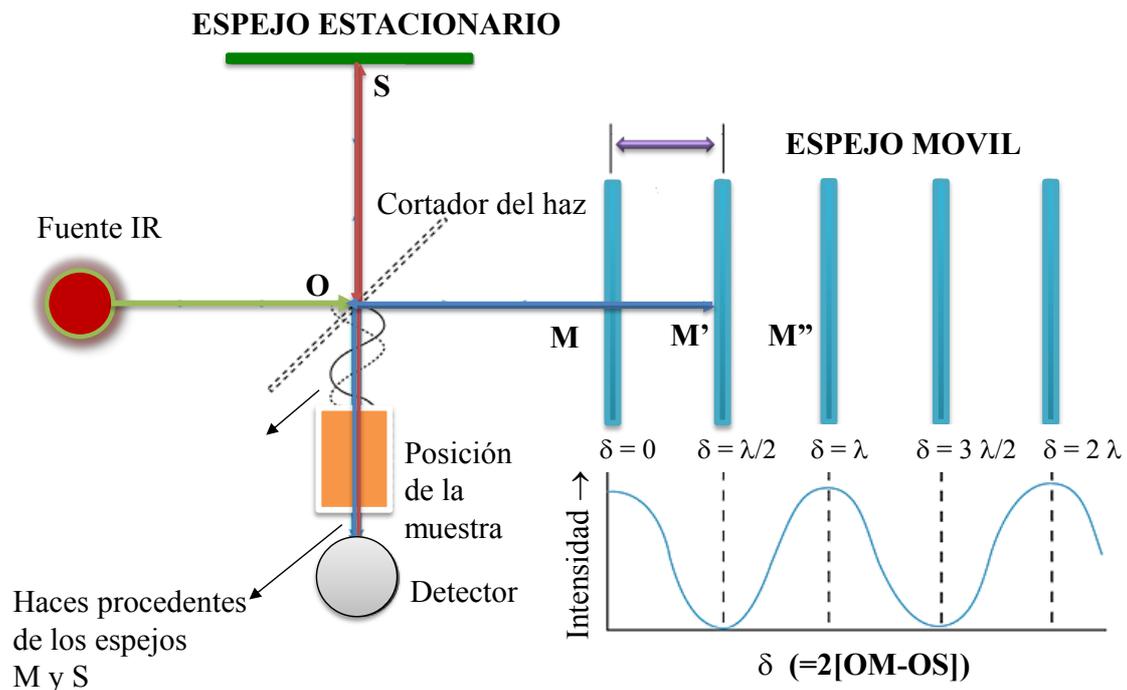


Figura 3 Esquema básico de un espectrofotómetro FTIR

Las ventajas más importantes de la espectrofotometría IR es la selectividad (bandas muy estrechas, en general), buena sensibilidad, precisión y rapidez, lo que la hace una de las herramientas más importantes en la caracterización de compuestos. (Robert M. Silverstein, et al. 2005)

2.4.3 HPLC

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es una de las técnicas analíticas más empleadas no sólo en la identificación de compuestos, sino en la cuantificación de los mismos.

La técnica se basa en la separación de mezclas de compuestos mediante su distribución entre una fase estacionaria y una fase móvil en función del tiempo. La cromatografía HPLC constituye realmente la automatización de la cromatografía líquida tradicional bajo condiciones de alta presión que proporcionan mejores separaciones durante periodos de tiempo más cortos. Es una de las técnicas más poderosas para la separación y el análisis cuantitativo utilizado hoy día para una amplia variedad de moléculas de diferente tamaño.

En una de las modalidades más ampliamente utilizada, HPLC en fase inversa, la fase estacionaria es muy poco polar, constituida por fases enlazadas hidrofóbicas como por ejemplo C_{18} , mientras que la fase móvil es polar, constituida por fases acuosas modificadas con algún disolvente orgánico. La separación se basa en las diferentes polaridades de los compuestos de la mezcla y su interacción con la fase estacionaria de carácter apolar. La separación puede lograrse mediante métodos isocráticos (misma polaridad de la fase móvil durante todo el proceso) o mediante métodos que empleen gradientes de la fase móvil, variando la polaridad de la misma con el modificador orgánico a fin de lograr una mejor resolución o un menor tiempo de análisis.

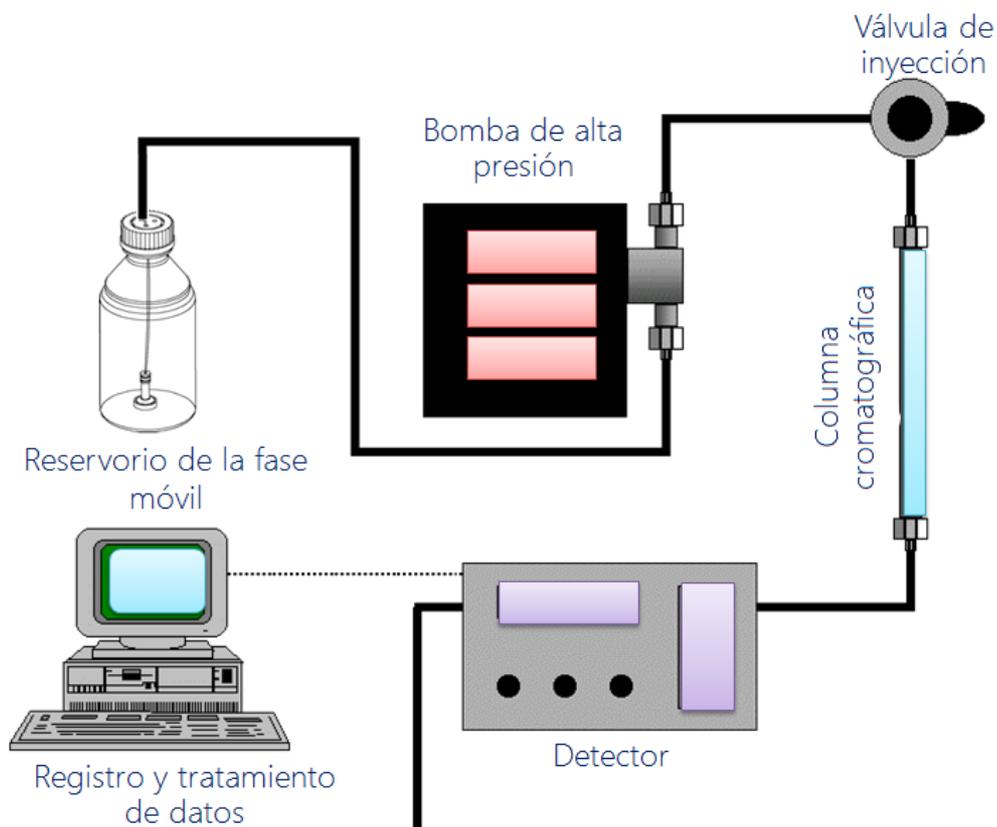


Figura 4 Componentes básicos de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución

La técnica de HPLC presenta las siguientes ventajas:

- Alta velocidad: La velocidad de análisis es muy superior que en la cromatografía líquida clásica al emplear bombas de alta presión.

- **Mayor eficiencia:** La posibilidad de empleo de diferentes fases estacionarias y móviles permite lograr separaciones óptimas para la mayoría de las muestras que pudiéramos tener.
- **Alta sensibilidad:** Los detectores actuales permiten observar concentraciones muy bajas.
- **Poco volumen de muestra:** No es necesario el empleo de grandes volúmenes de muestra, además la muestra puede recuperarse fácilmente ya que no se destruye y puede ser recogida al final del análisis, siempre que se utilice un detector no destructivo.

2.5 Determinación de la capacidad antioxidante

Aunque la actividad antioxidante de los extractos se puede determinar a través de múltiples metodologías, en el presente trabajo se utilizaron únicamente tres, que se describen a continuación.

2.5.1 Cuantificación de compuestos fenólicos totales (Método de Folin-Ciocalteu)

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la reducción, en condiciones básicas, de los polifenoles. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de fosfomolibdato y fosfowolfrato sódicos, que permite cuantificar los polifenoles totales mediante espectroscopía VIS-UV, y expresar el resultado como equivalentes de un estándar de referencia como puede ser el ácido gálico (Sánchez-Rangel et al. 2013)

La reacción de reducción del ácido fosfomolibdowolfrámico (formado en medio ácido) por los compuestos fenólicos da lugar a la formación de un complejo de color azul que permite la determinación espectrofotométrica cuantitativa de los mismos a 765 nm (Figura 5)

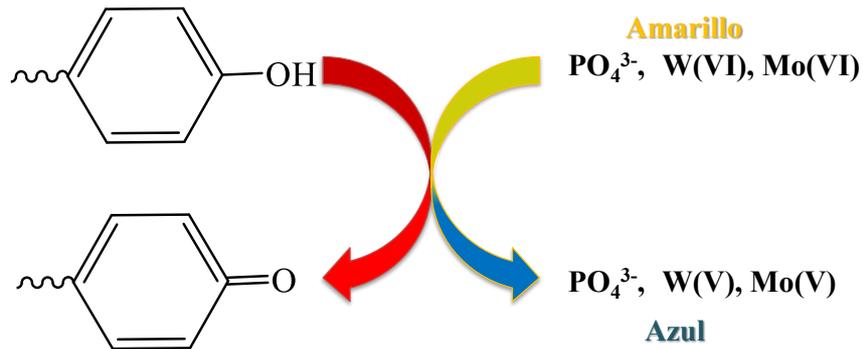


Figura 5 Reducción y formación de color en el ensayo Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu se emplea habitualmente como un método para medir el contenido total de productos naturales fenólicos, este método es sencillo, sensible y exacto. Sin embargo, cualquier sustancia reductora (por ejemplo, ácido ascórbico, glucosa, fructosa) puede interferir el ensayo. En consecuencia, el reactivo mide la capacidad reductora total de una muestra, no sólo el nivel de compuestos fenólicos.

2.5.2 Método de captación de radicales (DPPH)

El método de decoloración del catión radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es uno de los más comúnmente utilizados para la medición de la capacidad antioxidante de una sustancia. El DPPH es un radical estable, que presenta color púrpura oscuro en solución alcohólica y con un máximo de absorción a 517 nm. El ensayo se basa en la determinación inicial de la concentración de DPPH y la concentración una vez que se ha adicionado la posible sustancia antioxidantes. Una disminución del color púrpura se relaciona con una disminución en la concentración de DPPH, debida a la transferencia de electrones de la especie antioxidante (Figura 6):

Al igual que el método de Folin-Ciocalteu el resultado se expresa como equivalentes de un estándar de referencia como puede ser el ácido gálico.

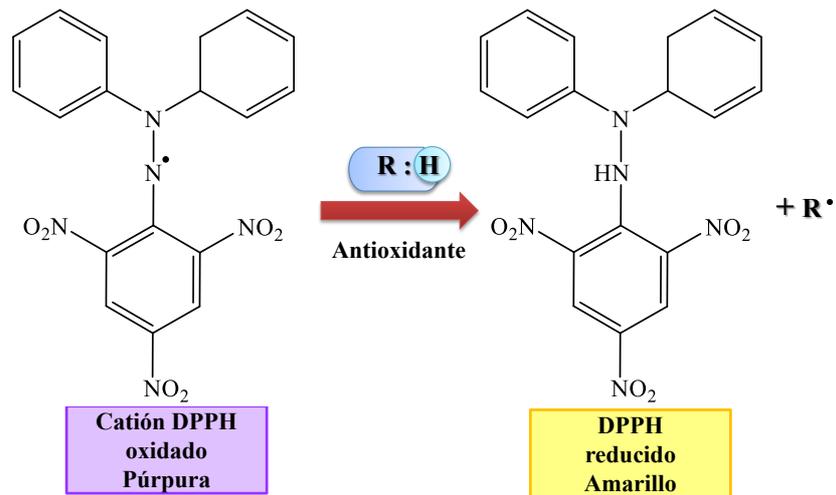


Figura 6 Mecanismo de la reacción de decoloración DPPH

El método DPPH es rápido y simple pero presenta un gran inconveniente que es el propio espectro de absorción del DPPH, que puede solaparse con el del analito (Figura 7), lo que puede afectar al resultado de la medición. Además, el intervalo lineal es relativamente estrecho, y todos los agentes reductores pueden dar la reacción con DPPH.

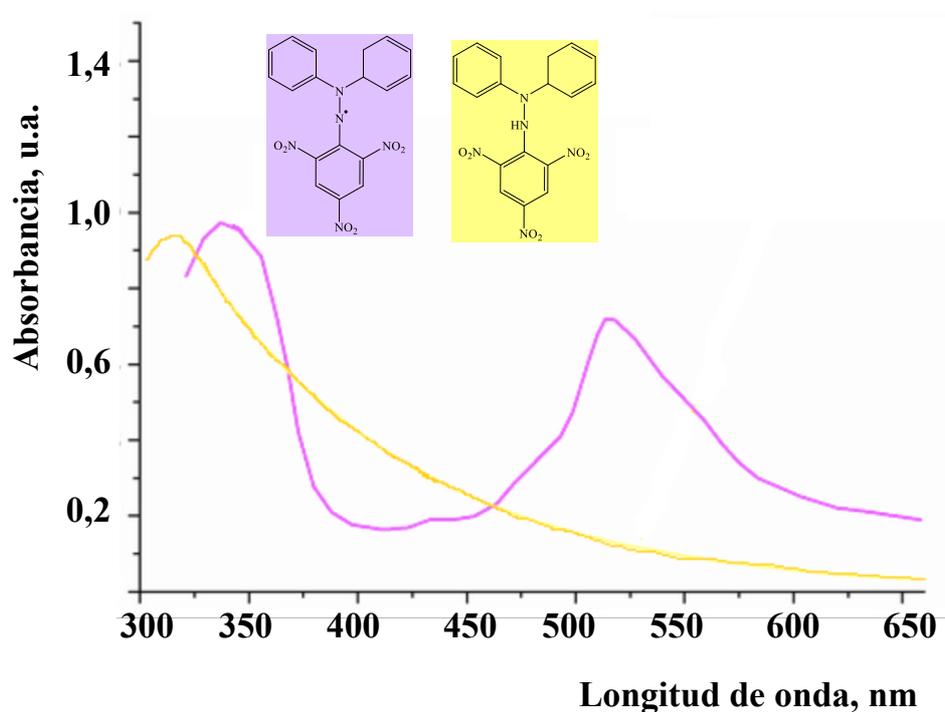


Figura 7 Espectros de absorción del catión radical DPPH y de la forma reducida del mismo

2.5.3 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

Es el método menos utilizado de los descritos en el presente trabajo para la medición de la capacidad antioxidante de un compuesto. Se basa en reducción del Fe(III) presente en el complejo tripiridil-triazina férrica, $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$, en presencia de antioxidantes, observándose la formación de un intenso color debido a la formación del complejo $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{2+}$, que presenta un máximo de absorción a 593 nm (Alam Md.N, et al, 2013). En la Figura 8 se muestra un esquema de la reacción de reducción.

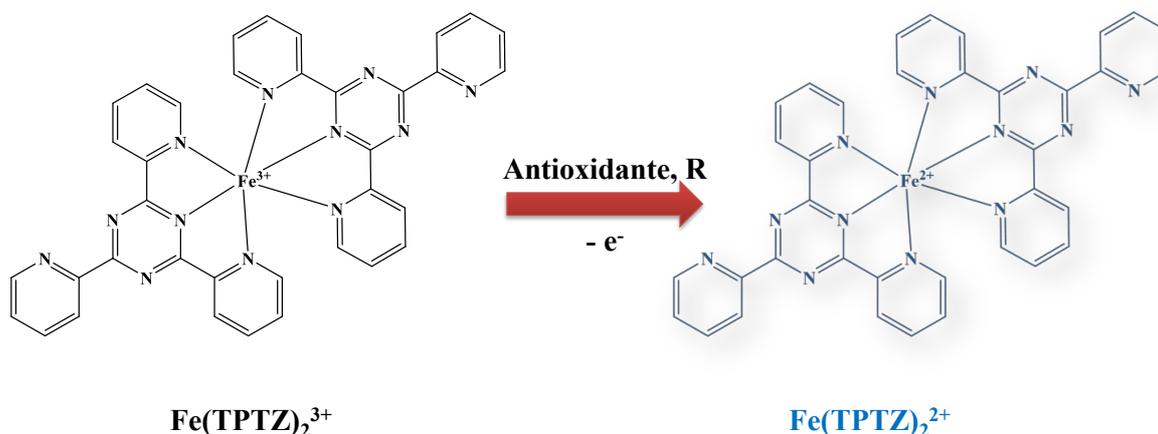


Figura 8 Reducción del complejo $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$ en presencia de antioxidantes.

Al igual que los métodos previos se expresa el resultado como equivalentes de un estándar de referencia como puede ser el ácido gálico. El método FRAP es rápido, fácil de operar y tiene una buena reproducibilidad y no presenta tantas interferencias como los otros métodos descritos.

2.6 Síntesis de nanocápsulas de zeína

La zeína, una proteína prolamínica, se puede usar como un vehículo bio-polimérico de grado alimentario debido a su insolubilidad en los disolventes convencionales de alimentos. La zeína es uno de los pocos biopolímeros hidrofóbicos insolubles en agua que han sido aprobados para uso oral por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

La zeína, principal proteína de almacenamiento de las semillas de maíz (*Zea mays L.*), ha sido objeto de investigaciones de interés científico y de aplicaciones industriales (como

material utilizado en la producción de recubrimientos, fibras y tinta de imprenta). La hidrofobicidad de la zeína se atribuye al alto porcentaje de aminoácidos no polares (leucina, alanina y prolina), que en conjunto representan más del 50% de su contenido total de aminoácidos. Debido a esta hidrofobicidad inherente, la zeína se puede preparar en dispersiones coloidales simplemente modificando su solubilidad en un disolvente orgánico primario (p.e. etanol) por dilución con otro disolvente (agua, por ejemplo), procedimiento comúnmente conocido como método de precipitación anti-disolvente o dispersión líquido-líquido (Sadeghi et al, 2016). La insolubilidad de la zeína en medios acuosos es una ventaja para su preparación como partículas coloidales biopoliméricas naturales, que pueden usarse para el suministro y/o liberación controlada de fármacos u otras moléculas funcionales tales como los nutraceuticos.

La zeína presenta una serie de propiedades que la hacen un excelente vehículo para la encapsulación de moléculas de interés alimentario, como son:

- La zeína de maíz es un biomaterial generalmente reconocido como seguro que tiene características prometedoras, incluyendo biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja/nula toxicidad.
- Su naturaleza hidrófoba y la solubilidad en disolventes orgánicos permiten la fabricación rápida y sencilla de micro-/nanopartículas de zeína, cápsulas ideales para fármacos hidrófobos y nutrientes.
- La digestibilidad relativamente más lenta de la zeína que otras proteínas hace que los sistemas de administración a base de zeína sean más deseables para vía oral
- Los nanoencapsulados son fáciles de fabricar.

Las nanopartículas de zeína pueden sintetizarse en presencia de caseinato. El caseinato sódico es una proteína anfifílica que se adsorbe a la superficie de las nanopartículas de zeína, reduciendo su hidrofobicidad superficial e incrementando la repulsión electrostática. La presencia de caseinato de sodio en el medio de precipitación da lugar a la interacción superficial de las partículas cargadas positivamente de la zeína y las cargadas

negativamente del caseinato, dando lugar a dispersiones de nanopartículas más estables. Las partículas pueden dispersarse en la fase acuosa sin ningún efecto significativo en la distribución de tamaños de partícula.

2.7 Encapsulación de antioxidantes

Los antioxidantes extraídos de la magaya de manzana se oxidan fácilmente cuando están expuestos al medio ambiente, perdiendo así su actividad antioxidante, si no se consumen o utilizan rápidamente o no se protegen de manera adecuada. La encapsulación de los mismos en nanocápsulas de zeína es una posibilidad que no ha sido explorada y que, en principio, ofrece un gran potencial debido a que las nanocápsulas son una barrera protectora frente a la radiación UV y la temperatura, la humedad y otros factores, permitiendo así mantener las propiedades del material, aumentar la estabilidad de almacenamiento, mantener sus propiedades antioxidantes y no cambiar su actividad fisiológica. Además, las nanocápsulas son fáciles de transportar, fáciles de almacenar y tienen la posibilidad de ser adicionadas a los alimentos.

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos y disoluciones.

Todos los reactivos se consideran de grado analítico a no ser que se indique expresamente otro grado de pureza.

- Metanol grado HPLC, VWR
- Etanol 96% vol, VWR
- TPTZ (2,4,6-Tri (2- piridilo)-1,3,5-triazina), Alfa Caesar
- Reactivo de Fenol de Folin-Ciocalteu, Sigma-Aldrich
- Agua purificada Tipo II, Millipore y Tipo I, MiliQ
- Ácido gálico, Sigma-Aldrich
- Ácido clorhídrico 37%, VWR
- Ácido acético glacial, VWR
- Cloruro de hierro (III), Sigma-Aldrich
- 2,2 - difenil - 1 – picrilhidracil, Aldrich
- Caseinato de sodio, ACROS
- Acetato de sodio acetato trihidrato, VWR
- Sulfato de hierro heptahidratado, Merck
- Epicatequina, Sigma
- Quercetina, Sigma
- Hidrato de florizin, Aldrich
- Ácido clorogénico, Aldrich
- Hidrato de quercitrina, Sigma

- Acetato de etilo , VWR
- Zeína , ACROS

3.2. Instrumentación analítica

- Balanza analítica AE 163, Mettler
- Balanza de precisión PG802-S, Mettler Toledo
- pH metro micropH 2002, Crison
- Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60, Agilent Technologies
- Espectrofotómetro FT-IR ATR, Varian 620-IR
- Equipo HPLC Perkin Elmer Series 200 con detector UV/VIS y columna C18 10um 15 × 0.46, Kromasil 100, dotado de un módulo de datos de software Total Chrom Navigator-LC-UV versión 6.3.1.
- Evaporador rotativo Laborota 4000, Heidolph
- Agitadores magnéticos con control de temperatura, MR Hei-Tec e IKA RCT Basic
- Estufa Heraeus Labofuge 200
- Centrífuga, Thermo
- Baños de limpieza “ultrasons-hd”, Selecta
- DLS Zetasizer, Malvern
- Batidora 14831-56 Sergi Arola 1000W, Russell Hobbs
- Envasadora vacío, Silvercrest

3.3. Utillaje de laboratorio

- Matraces aforados
- Matraces redondos
- Extractor Soxhlet
- Embudos estriados de vidrio
- Vasos de precipitados
- Micropipetas
- Pipetas desechables
- Platos de pesaje desechables
- Celdas de cuarzo para medidas espectrofotométricas.
- Cartuchos extracción celulosa (22 × 60nm)
- Tubos de centrífuga
- Espátulas y microespátulas
- Bolsas herméticas

3.4 Optimización de la extracción

La magaya utilizada para todos los ensayos del presente trabajo (Figura 9) ha sido cedida amablemente por Llagar Sidra Castañón (Villaviciosa, Asturias). Esta magaya proviene de variedades de manzana asturiana para la elaboración de sidra con D.O.P. "Sidra de Asturias". La magaya fresca se recogió en noviembre de 2016 y se almacenó en bolsas herméticas en congelador (-5°C). Inmediatamente fue deshidratada mediante calentamiento a 60°C en una estufa durante 48h. La magaya seca fue finamente molida y almacenada a -5°C hasta su uso en bolsas selladas y a vacío. (Y. Diñeiro García et al.2009).



Figura 9 Magaya de manzana fresca en el lugar de recogida de Llagar Sidra Castañón.

La extracción de antioxidantes se optimizó mediante un diseño factorial a dos niveles con dos factores, la concentración de la magaya y el tiempo de la extracción, utilizando como factor de respuesta la tasa de extracción medida mediante el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados obtenidos, fueron finalmente analizados mediante el software Minitab v17.

Puesto que el análisis factorial a dos niveles requiere la selección para cada factor de un valor grande, denominado (+), y otro pequeño, denominado (-), se decide tomar un tiempo de 2 h como factor (-) y de 5h como factor (+) para el tiempo de extracción, y 2% p/v como valor (-) y 6% como valor (+) en la relación masa/agente extractor en el sistema

Soxhlet, que en este estudio es metanol. Los diferentes niveles de los ensayos se muestran en la Tabla 1. Cada grupo se mide por triplicado, obteniendo posteriormente el valor medio.

El extracto obtenido, se centrifugó dos veces a 5000 rpm durante 5 minutos a 15°C para purificarlo. A continuación, se elimina el metanol por rotaevaporación para, finalmente, redissolver los extractos en 10 mL de etanol y guardarlos en la nevera a 4°C. En los casos en que aparecen partículas en suspensión, se repiten los pasos de centrifugado.

La Tabla 1, recoge los valores experimentales de los niveles (+) y (-) de cada uno de los dos factores optimizados.

	(+)	(-)
Tiempo	5 h	2 h
Masa / volumen	6 % p/v	2% p/v

Tabla 1 Valores (+) y (-) de los factores seleccionados para el diseño factorial

3.5 Caracterización del extracto de magaya de sidra

Para caracterizar el extracto de magaya de sidra, se pesan 6 g de magaya y se extrae mediante Soxhlet con 100 mL de metanol durante una hora. El extracto se centrifugó dos veces a 5000 rpm durante 5 minutos a 15°C. Finalmente, los extractos se almacenaron en la nevera a 4°C hasta su análisis. Las extracciones se realizan por triplicado.

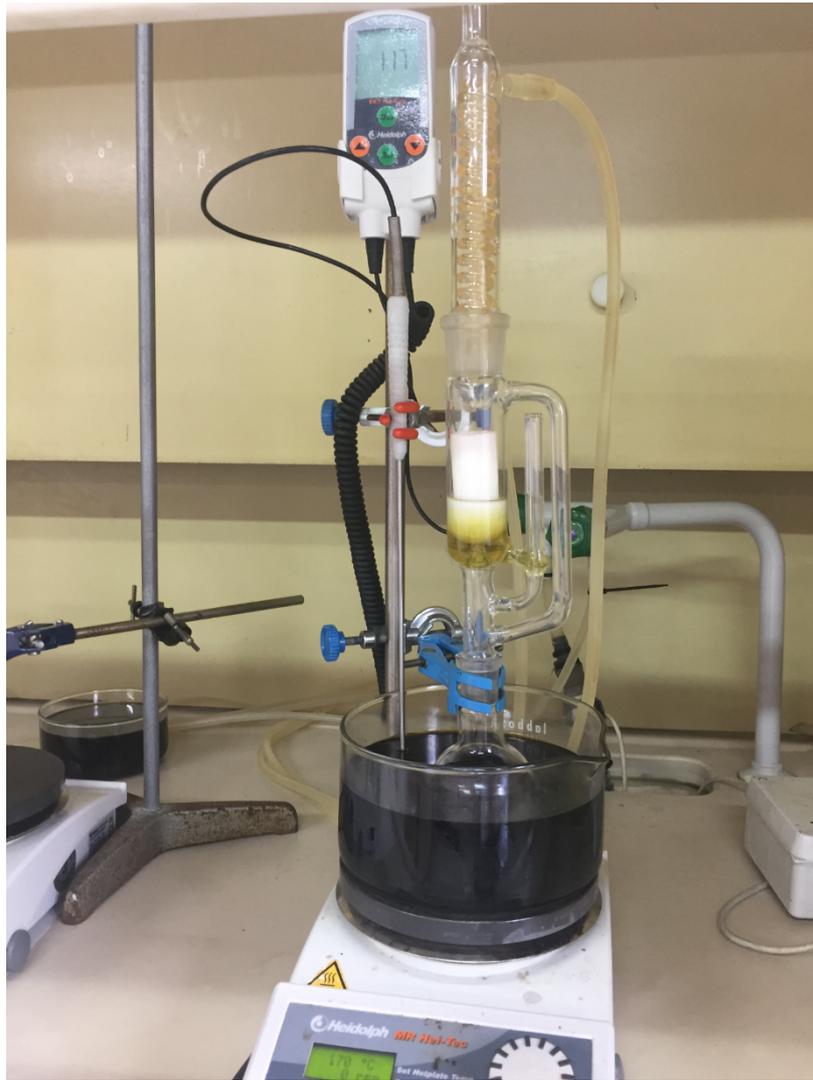


Figura 10 Extracción del antioxidante

3.5.1 Espectroscopía VIS- UV

Los extractos obtenidos por Soxhlet de la magaya se caracterizaron mediante espectrofotometría visible ultravioleta entre 200 y 800 nm sin realizar ninguna dilución. Asimismo, se registró el espectro de un blanco de reactivos (etanol).

3.5.2 Espectroscopía FTIR

Se registraron los espectros FTIR de diferentes sustancias patrón presentes en la magaya de manzana y que tienen actividad antioxidante: epicatequina, ácido clorogénico, querci-

trina, quercetina y cumarina, con objeto de identificar sus bandas de absorción y, posteriormente, compararlas con las registradas para los extractos de magaya. Todas las medidas se realizaron por triplicado de muestras independientes. Todas las medidas se hicieron empleando un módulo de reflectancia total atenuada, con una resolución de 4 cm^{-1} y con una acumulación de 16 espectros.

3.5.3 HPLC

La separación de los polifenoles presentes en el extracto de magaya se llevó a cabo mediante un HPLC de Perkin Elmer con una columna C18 ($10\mu\text{m } 15\times 0.46$), en elución con gradiente. Los disolventes de elución fueron una disolución acuosa de ácido acético al 2% (disolvente A) y metanol al 100% (disolvente B)

El programa de elución se muestra en la Figura 10. Se realiza una etapa lineal de 0% a 45% de metanol (disolvente B) durante 55 min, una etapa isocrática a esa composición durante 15 min y un incremento lineal final del disolvente B hasta el 55% en 10 min. El caudal fue de $0,8\text{ mL / min}$ y el volumen de inyección fue de $10\ \mu\text{l}$ (错误! 未找到引用源。). (B. Suárez et al. 2010).

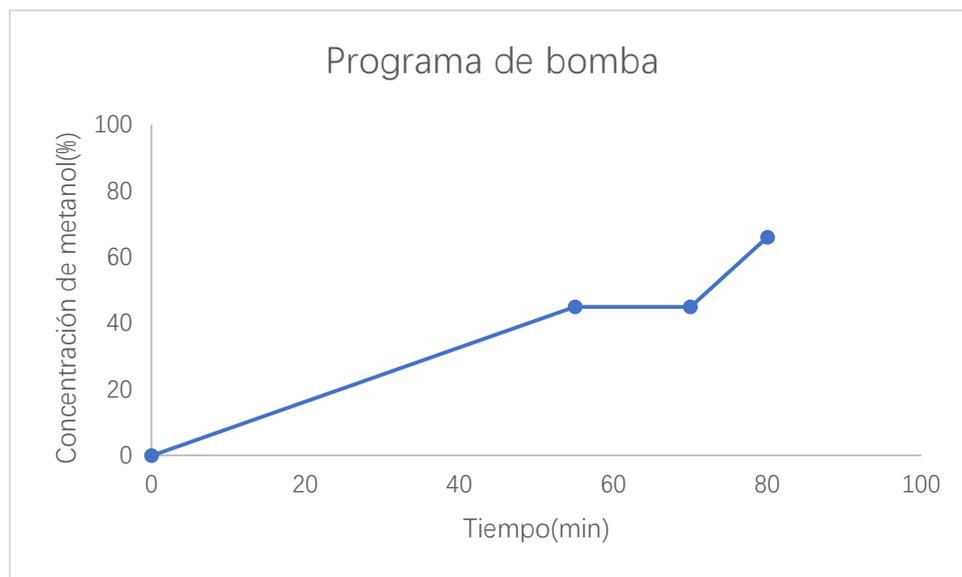


Figura 11 Programa de elución

La identificación se realizó mediante el método de estándar externo, utilizando como estándares epicatequina (flavonoides), quercetina, quercitrina (flavonoides glicosilados), ácido clorogénico (ácido cinámico) en concentración 0,1 mM. ácido gálico y cumarina medidos a una longitud de onda de 280,0 nm.

3.6 Determinación de la capacidad antioxidante

Las muestras empleadas son iguales que las desarrolladas en el apartado 3.5 *caracterización del extracto de magaya de sidra*.

3.6.1 Cuantificación de compuestos fenólicos totales (Folin-Ciocalteu)

Los compuestos fenólicos totales en extractos de magaya se determinaron usando el reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla de reacción se preparó mezclando 0.5 mL de disolución metanólica de extracto, 7 mL de agua destilada, 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 0.5 mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3 al 7.5%). Después de mantener la mezcla durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad se midió la absorbancia a 765 nm. La absorbancia se midió frente al blanco que se había preparado de una manera similar, reemplazando el extracto con agua destilada. La cuantificación se llevó a cabo empleando una curva de calibración previamente preparada para ácido gálico, sometido al mismo tratamiento que la muestra de extracto. El contenido fenólico total se calculó como mg equivalentes de ácido gálico del extracto por 100 g peso seco.

3.6.2 Método de captación de radicales (DPPH)

Se preparó una solución de trabajo de DPPH 10^{-4} M por dilución con metanol. Se añadieron 2 mL de esta disolución a 2 mL de la muestra y se mantuvo en reposo al abrigo de la luz y a temperatura ambiente durante 30 minutos, tras lo cual se midió la absorbancia A_{muestra} a 515 nm. De forma similar, se preparó la curva de calibración utilizando 2 mL de ácido gálico en el intervalo de concentraciones de 0, 100, 200, 300, 400 mg/L en agua

destilada y 2 mL de la solución de trabajo DPPH. En caso de control negativo, se mezcló DPPH con metanol en lugar de la muestra, y agua destilada en lugar del ácido gálico y se midió la absorbancia A_{standard} . Además, se añadieron 2 mL de la muestra a 2 mL de metanol y se midió la absorbancia A_{blanco} . La capacidad antioxidante total de las muestras de magaya se expresó como un equivalente de ácido gálico por 100 mg de materia seca de una muestra (mg).

3.6.3 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

El reactivo FRAP se prepara mezclando 25 mL de reguladora de acetato sódico 0,3 M a pH 3,6 con 2,5 mL de TPTZ 10^{-2} M en clorhídrico 10^{-2} M y 2,5 mL de FeCl_3 $2 \cdot 10^{-2}$ M.

La determinación de antioxidantes mediante FRAP se llevó a cabo mezclando 0,1 ml de solución de la muestra de magaya o patrón de ácido gálico, con 3 mL de reactivo FRAP, y 0,3 mL de agua destilada. La mezcla final se dejó reaccionar a 37°C durante 5 minutos, midiendo la absorbancia a 593 nm ajustando el cero con agua destilada. La actividad antioxidante de la muestra (valor FRAP) se expresó en mg de ácido gálico / 100 g de magaya seca.

3.7 Síntesis de nanocápsulas de zeína

Las nanopartículas se prepararon según el método de dispersión líquido-líquido descrito por Fangyuan Dong et al. (2016). Se pesaron 0,50 g de zeína y se disolvieron en 20 mL de una mezcla de etanol absoluto: agua (80:20 peso/peso). La mezcla se sonicó a continuación durante 15 minutos para formar una solución madre transparente.

Posteriormente, se añadieron 3 mL de la disolución etanólica de zeína gota a gota a 60 mL de agua destilada en agitación continua, agitándose durante 30 min a 1000 rpm mediante un agitador magnético. A la dispersión formada se le eliminó el etanol mediante Rotavapor, agregando el mismo volumen eliminado de agua destilada. Las disoluciones finales se almacenaron a temperatura ambiente.

Para preparar las nanopartículas de zeína y caseinato sódico se sintetizaron siguiendo el mismo protocolo, con la única diferencia de disolver 0,45 g de caseinato sódico en los 60 mL de agua iniciales (Ashok R. Patel. et al.,2010).



Figura 12 Nanocapsulas de zeína + caseinato (izquierda) y de zeína (derecha)

3.8 Encapsulación de antioxidantes

Para encapsular antioxidantes se siguió el procedimiento descrito anteriormente, pero agregando 3 mL del extracto de magaya gota a gota a continuación de la disolución etanólica de zeína.

Para poder evaluar el grado de eficiencia del encapsulado de antioxidantes, se emplearon como blanco disoluciones de extracto de magaya no encapsulada preparadas de forma similar. En concreto, a 60 mL de agua (o disolución acuosa de caseinato sódico) se agregaron gota a gota 3 mL de etanol: agua 80:20 en peso y, posteriormente, 3 mL de extracto etanólico de magaya (Y Luo et al. 2010).

Las disoluciones de extracto de magaya encapsuladas en zeína se denominarán Z, las encapsuladas en zeína-caseinato se denominarán ZC y sus respectivos blancos serán B_Z y B_{ZC}.

Las cuatro mezclas finales (encapsulado en zeína, encapsulado en zeína-caseinato y sus respectivos blancos) se extrajeron en un embudo de decantación con 10mL de acetato de etilo. Tras la agitación de ambas fases, el embudo se dejó reposar en el soporte hasta la separación completa de las dos fases. Al ser más densa la fase acuosa se corresponde con la fase inferior, mientras que la fase orgánica al ser la menos densa, es la fase superior. En la fase orgánica, se evaluará la eficacia de la encapsulación, mientras que la fase acuosa se empleará para determinar el tamaño de las nanocápsulas mediante DLS.

Los antioxidantes presentes en la fracción de acetato de etilo se determinaron mediante el método Folin-Ciocalteu, expresando los resultados como mg de ácido gálico / 100 g de extracto.

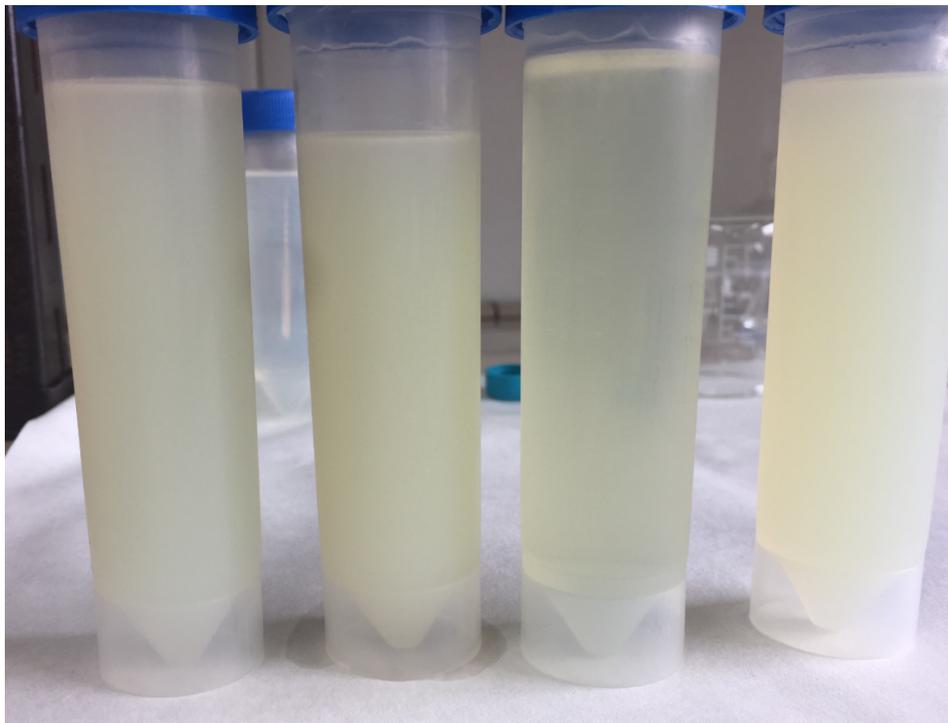


Figura 13 De izquierda a derecha, disoluciones Z, ZC, B_Z y B_{ZC}.

El porcentaje de encapsulación se calculó según la fórmula:

$$F = \frac{A_{Blanco} - A_{Encapsulado}}{A_{Blanco}}$$

Ecuación 1 Cálculo del porcentaje de encapsulación.

Donde F es la fracción de antioxidantes encapsulados, A_{Blanco} es el valor de antioxidantes obtenido en el extracto de acetato de etilo de la disolución B_Z o B_{ZC} y $A_{Encapsulado}$ es el valor de antioxidantes obtenido en el extracto de acetato de etilo en la disolución Z o ZC (Chan-Eun Park, Dong-June Park, and Bum-Keun Kim. 2015).

4. Resultados y discusión

4.1 Optimización de la extracción

El contenido de los fenoles totales se determinó usando el método de Folin-Ciocalteu, empleando una curva de calibración de ácido gálico entre 0 y 500 mg / L, mostrada en la Figura 14.

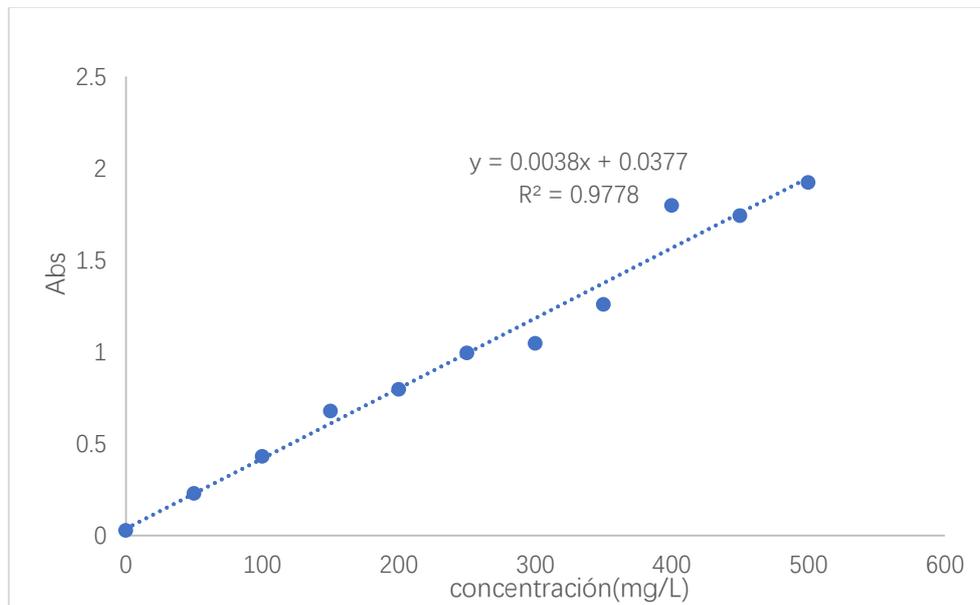


Figura 14 Curva de calibrado para la metodología Folin-Ciocalteu

tiempo(h)	masa de ma- gaya/metanol (g/100ml)	Folin-Ciocalteu(mg/l)			
		I	II	III	\bar{x}
2	2	139.5	130.2	147.4	139.0
5	2	166.9	175.6	185.4	175.9
2	6	464.6	337.2	502.7	434.8
5	6	319.5	465.9	579.1	454.8

Tabla 2 Datos de la optimización

El análisis estadístico de los resultados obtenidos y mostrados en la Tabla 2 permite determinar cuál de los factores tiene una mayor influencia en el proceso de extracción, como

se refleja claramente en el diagrama de Pareto mostrado en la Figura 15. En dicho diagrama, se muestran los valores absolutos de los efectos estandarizados; organizando las barras, que representan a los factores, se puede determinar la importancia de los mismos por su tamaño. En caso de que alguno de los factores superase la línea calculada, indicaría un efecto significativo estadísticamente con $p < 0,05$.

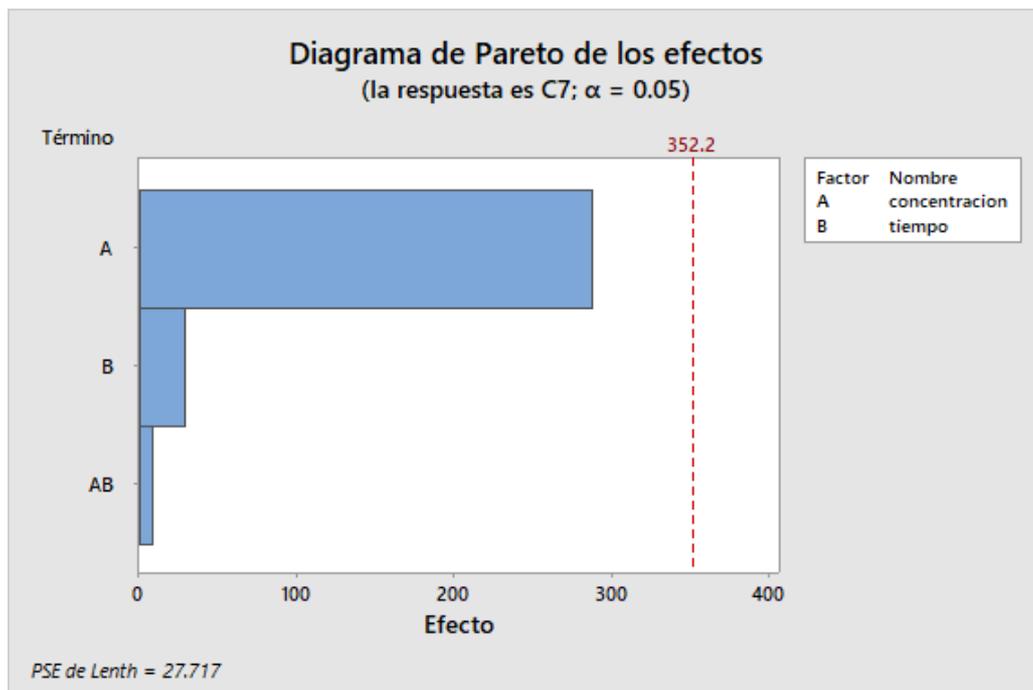


Figura 15 Diagrama de Pareto de los efectos

Como puede apreciarse en la Figura 15, ninguno de los factores, ni su combinación, resulta estadísticamente significativo en el proceso de extracción de antioxidantes de la magaya. No obstante, el factor “concentración” es el más influyente ya que es el que más se aproxima al límite crítico estadístico.

La gráfica de interacción de efectos se realiza representando la respuesta en el eje de ordenadas y el factor “concentración” en abscisas, generando una recta para cada uno de los dos tiempos estudiados. Si ambas rectas se cruzan, se puede considerar que la interacción entre ambos factores es significativa. Como puede verse en la Figura 16, los dos factores estudiados son independientes, como también se podía ver reflejado en la gráfica de Pareto.

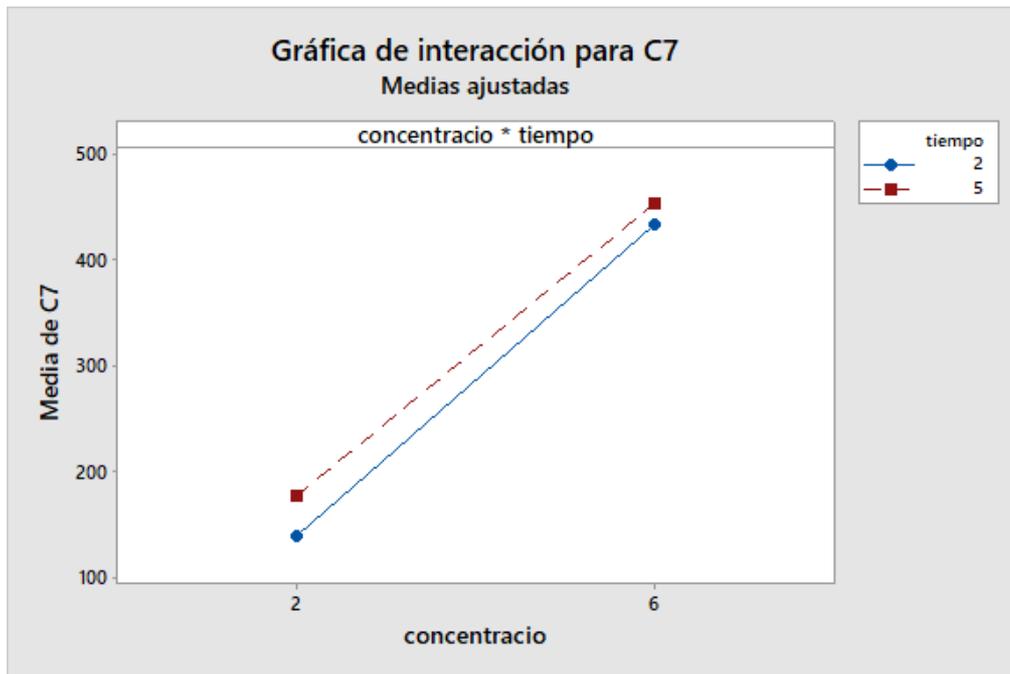


Figura 16 Gráfica de interacción

Dado que no hay ningún factor estadísticamente significativo, se utilizó una relación de magaya/metanol de 6% p/v, dado que proporcionaba mayor cantidad de antioxidantes, y un tiempo de 1 hora para minimizar el tiempo experimental.

4.2 Caracterización del extracto de magaya de sidra

4.2.1 Espectroscopía VIS- UV

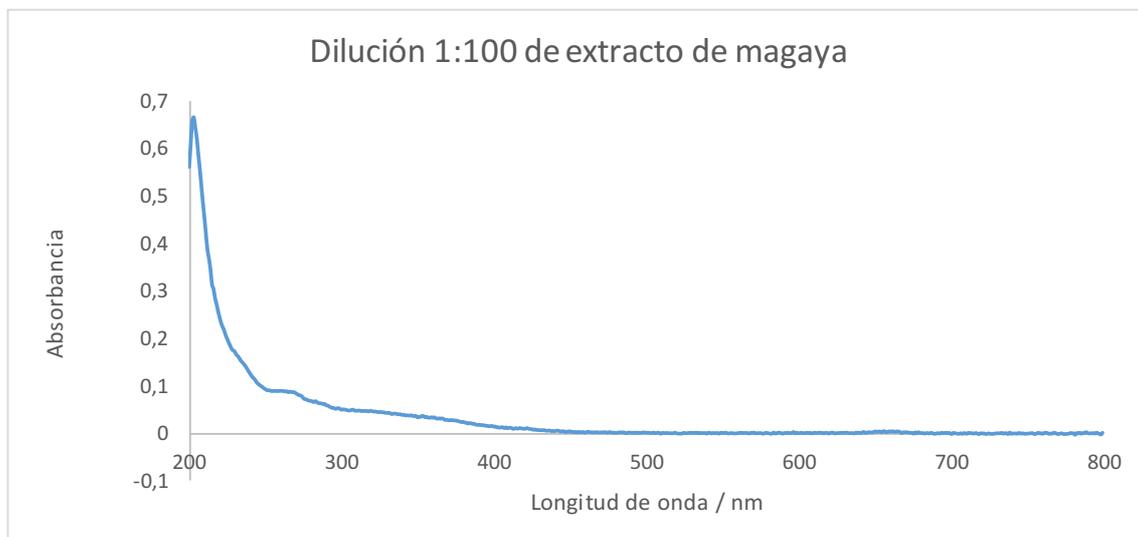


Figura 17 Espectro UV-Vis del extracto alcohólico de magaya, diluido 1:100.

Como puede verse en la Figura 17, el extracto de magaya diluido 100 veces presenta una ligera absorción en la zona del violeta del espectro, por debajo de los 400 nm, que es la que le proporciona su característico color amarillo. No obstante, la zona de mayor absorción se da en el ultravioleta. Para apreciar más claramente el espectro de absorción en la zona del visible (Figura 18), se hizo un segundo espectro a mayor concentración, empleando una dilución 1:20.

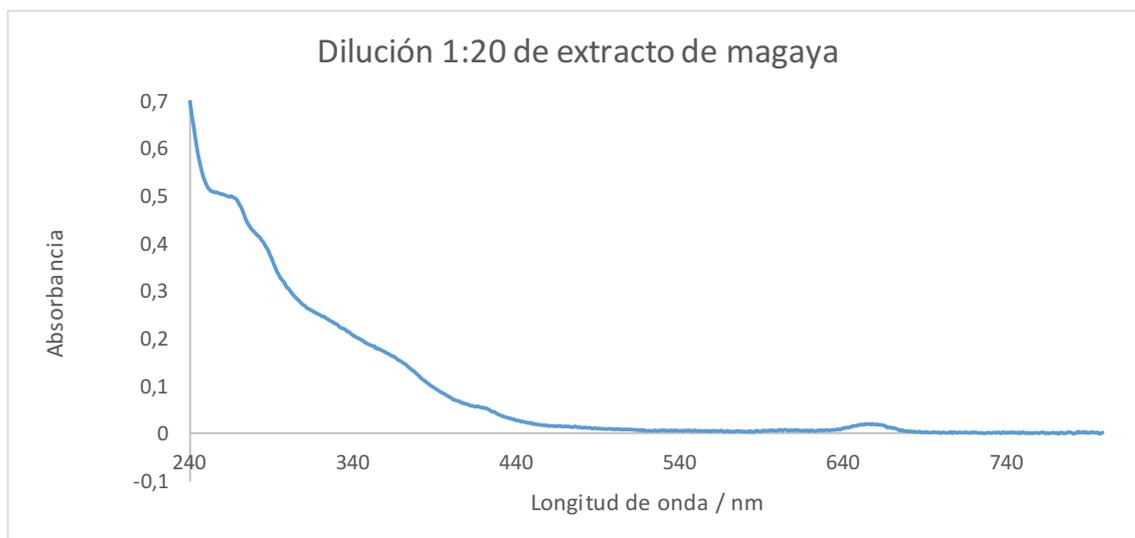


Figura 18 Espectro UV-Vis del extracto alcohólico de magaya, diluido 1:20.

4.2.2 Espectroscopía FTIR

Las tres réplicas del extracto se comparan con cinco estándares de epicatequina, ácido clorogénico, quercitrina, quercetina y cumarina. Los espectros de FTIR obtenidos, se muestran en la Figura 19.

Como puede verse en la Figura 19, los extractos de magaya presentan bandas anchas, especialmente en la zona entre 600 cm^{-1} y 2000 cm^{-1} , lo que dificulta la identificación de posibles compuestos. No obstante, la presencia de una banda muy ancha en torno a los 3200 cm^{-1} puede ser indicativa de la presencia de compuestos fenólicos.

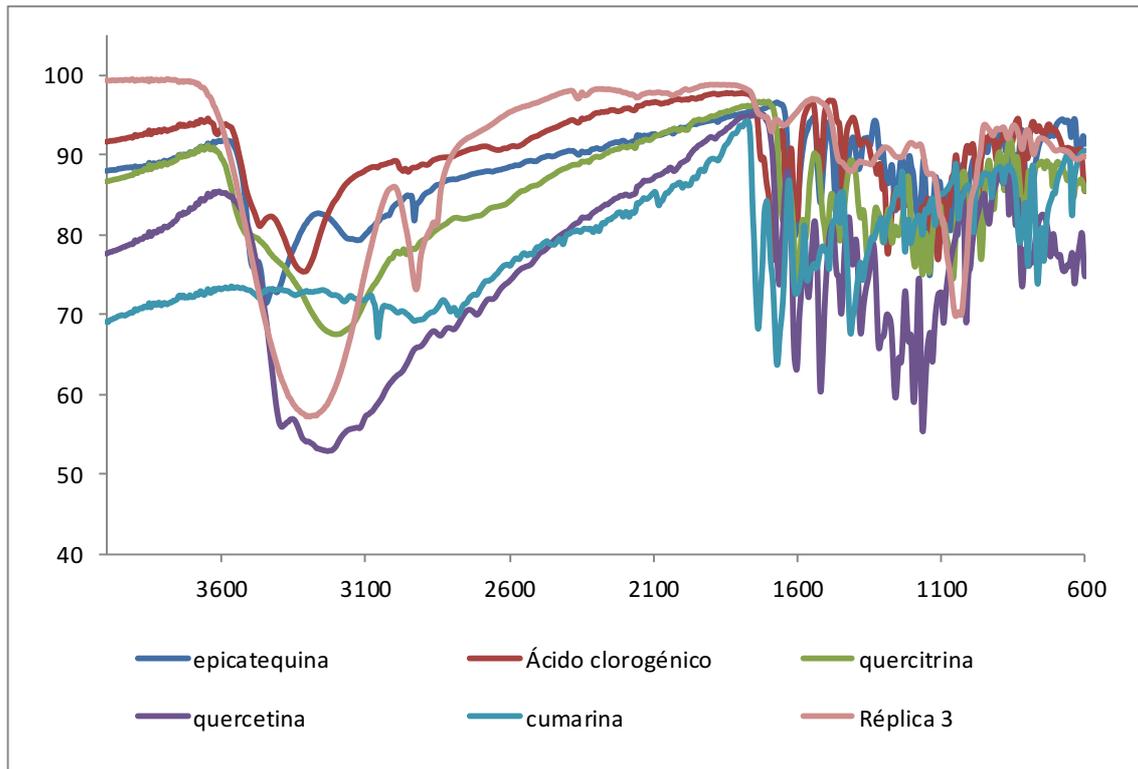


Figura 19 Espectros FTIR-ATR de patrones y extracto de magaya

4.2.3 HPLC

Para tratar de identificar algunos de los compuestos fenólicos del extracto, se recurrió a la inyección de patrones en el HPLC. Se utilizaron ácido gálico, ácido clorogénico, quercitrina, epicatequina, cumarina y quercetina.

Se determinaron los tiempos de retención de cada uno de los compuestos por separado para poder identificarlos en el extracto. En la Figura 20, no obstante, se muestra el cromatograma obtenido para una mezcla equimolecular de los seis patrones considerados.

Los tres extractos preparados mostraron un perfil de HPLC idéntico, recogido en la Figura 21. En dicho cromatograma, se aprecian picos de baja intensidad para los tiempos de retención del ácido gálico y del ácido clorogénico, siendo el pico correspondiente al tiempo de retención de la cumarina el más intenso.

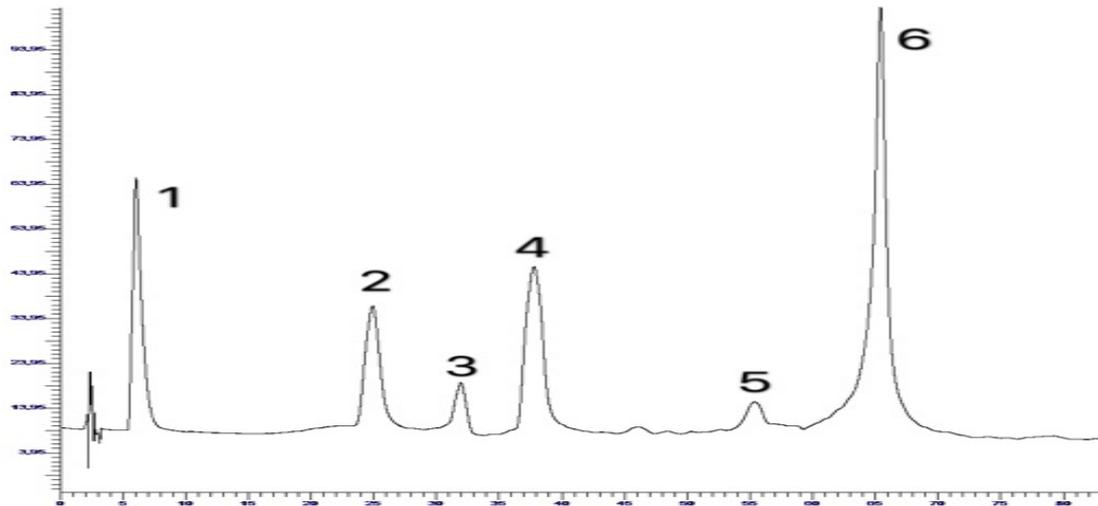


Figura 20 Cromatograma de los patrones a 280nm. 1 ácido gálico, 2 ácido clorogénico, 3 quercitrina, 4 epicatequina, 5 cumarina y 6 quercetina

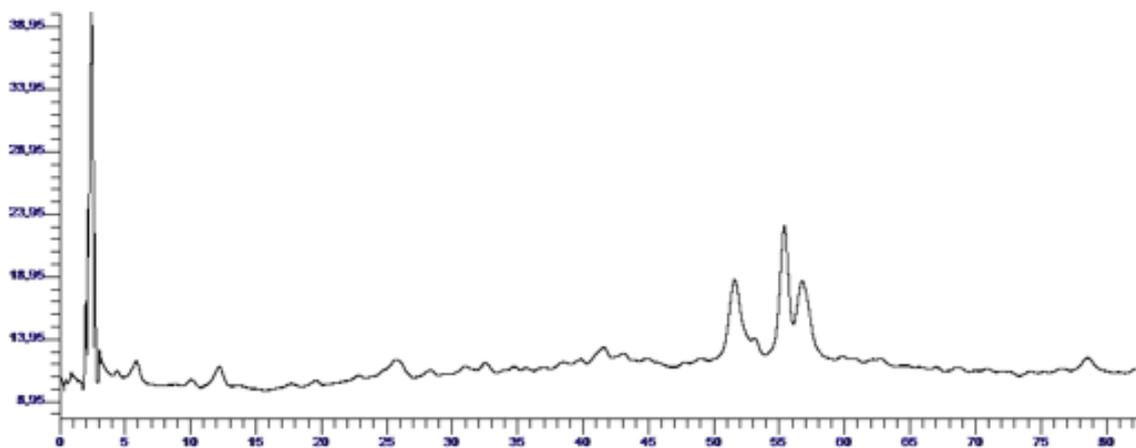


Figura 21 Cromatograma de la muestra 2 a 280nm

4.3 Determinación de la capacidad antioxidante

4.3.1 Cuantificación de compuestos fenólicos totales (Folin-Ciocalteu)

El contenido de fenoles totales de los extractos de magaya obtenidos en las condiciones optimizadas según el apartado 4.1 se analizaron por el método Folin-Ciocalteu por triplicado, obteniendo un resultado final de 250 ± 20 mg equivalente de ácido gálico/100 g magaya.

Es importante destacar que el reactivo Folin-Ciocalteu es activo frente a muchos compuestos diferentes presentes en los extractos de las plantas, además de los fenólicos, tales como proteínas, tioles, derivados vitamínicos, aniones inorgánicos, como el yoduro o el sulfito, o algunos iones metálicos como Fe (II), Mn (II) etc. (Everette et al. Al., 2010).

El método con el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu para determinar el contenido total de compuestos fenólicos se aplica comúnmente, pero es difícil comparar los resultados obtenidos por varios autores. Esto se debe a una metodología diferente (cantidad variable de reactivos, tiempo y temperatura de incubación de la muestra) y el valor expresado de los compuestos fenólicos, que puede estar referido a distintos patrones tales como ácido gálico o ácido clorogénico entre otros.

4.3.2 Método de captación de radicales (DPPH)

Las tres réplicas del extracto se analizaron también mediante el método DPPH, cuya recta de calibración se muestra en la Figura 22.

El resultado obtenido mediante esta metodología es de 84 ± 5 mg ácido gálico / 100 g de magaya seca. Los valores obtenidos por esta metodología son significativamente más bajos que los obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu. Esto se debe a que las reacciones de los antioxidantes a los radicales libres con DPPH son diferentes de sus reacciones con el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo de Folin-Ciocalteu es sensible a una amplia gama de substratos, que se oxidan fácilmente, pero los radicales libres de DPPH presentan una diferente sensibilidad a diversos antioxidantes, que indican reacciones cinéticas rápidas, intermedias o lentas a los radicales libres DPPH (Yang, Paulino, Janke-Stedronsky y Abawi, 2007). Además, algunos antioxidantes fenólicos que reaccionan fuertemente al reactivo de Folin-Ciocalteu pueden no reaccionar a los radicales libres DPPH.

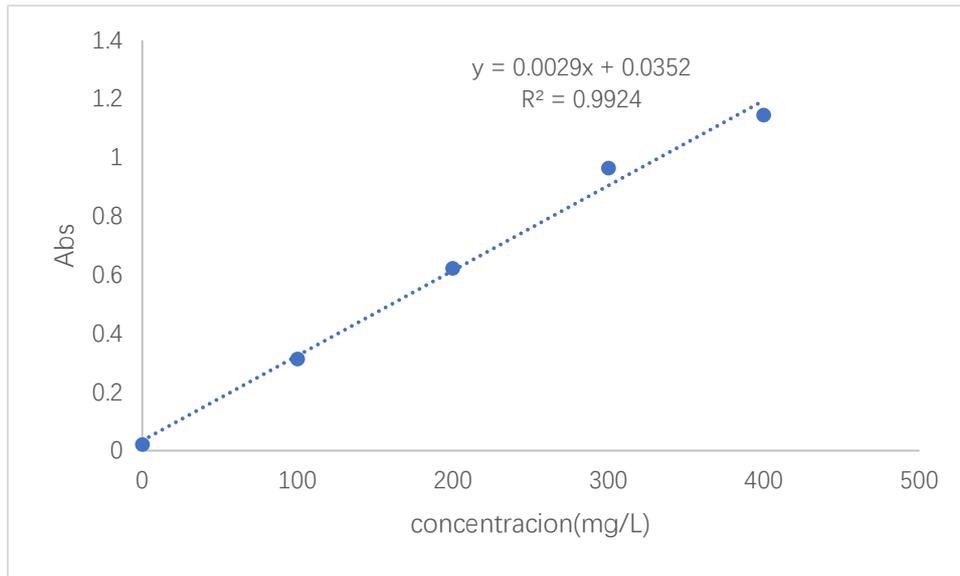


Figura 22 La curva de calibración del método de DPPH

Se puede deducir de los resultados que estas fracciones tienen potencial en la aplicación de alimentos como fibra dietética con propiedades antioxidantes.

4.3.3 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

Por último, el poder antioxidante del extracto de magaya se analizó también mediante el método FRAP. Esta metodología arroja un resultado de 126 ± 9 mg ácido gálico / 100 g magaya seca. Como en el caso anterior, el valor obtenido mediante FRAP es menor al obtenido mediante el método Folin-Ciocalteu debido a las diferencias de reactividad.

En la Figura 23 se muestra la comparativa de los resultados obtenidos por las tres metodologías.

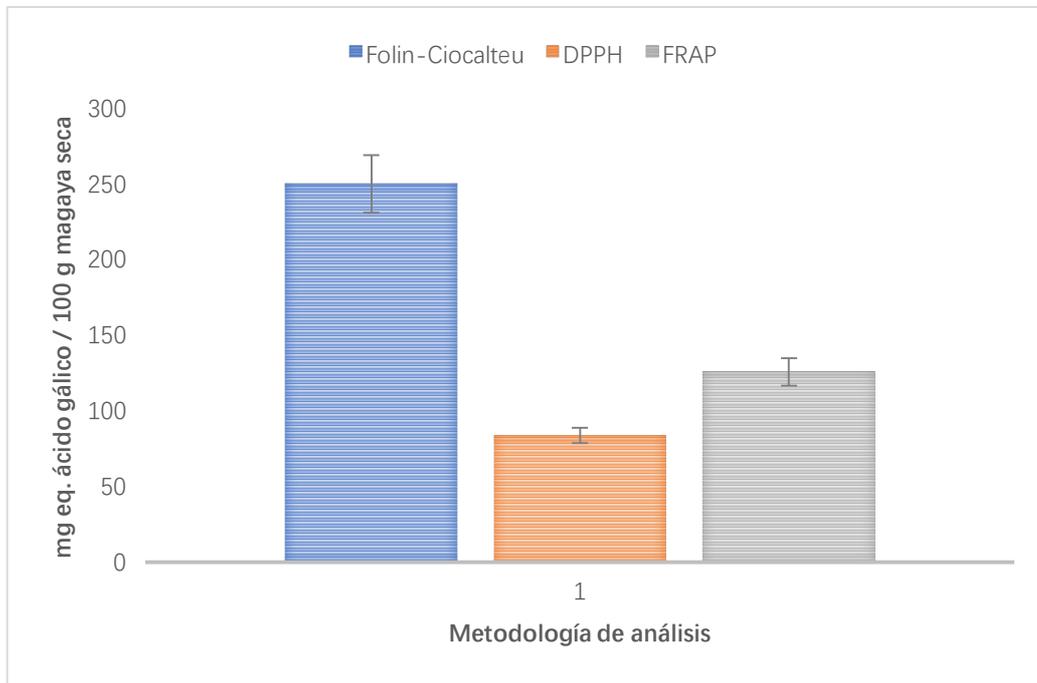


Figura 23 Comparación de los resultados obtenidos para la cantidad de antioxidantes por las tres metodologías de análisis

4.4 Síntesis de nanocápsulas de zeína

En la Tabla 3 se recogen los valores de diámetro hidrodinámico para las nanopartículas de zeína y zeína-caseinato en presencia y ausencia de extracto de magaya. También se recoge el valor de PdI. Como se puede deducir de los valores mostrados, todas las nanopartículas muestran una distribución de tamaños bastante homogénea, ya que los valores de PdI son bajos y, en todo caso, menores de 0,2.

Respecto al tamaño, se puede observar que tanto las nanopartículas de zeína como las de zeína-caseinato son más pequeñas que sus respectivas síntesis en presencia de magaya. Esto puede deberse a un aumento del volumen de las mismas al incorporar los compuestos antioxidantes.

	Diámetro / nm	PdI
Z	88 ± 1	0,19 ± 0,01
ZC	145 ± 1	0,13 ± 0,02
Z + magaya	169 ± 2	0,165 ± 0,002
ZC + magaya	163 ± 2	0,18 ± 0,02

Tabla 3 Diámetros hidrodinámicos y PdI para los cuatro tipos de nanocápsulas sintetizadas.

La Figura 24 muestra la distribución de tamaños de las nanopartículas de zeína y zeína con magaya encapsulada.

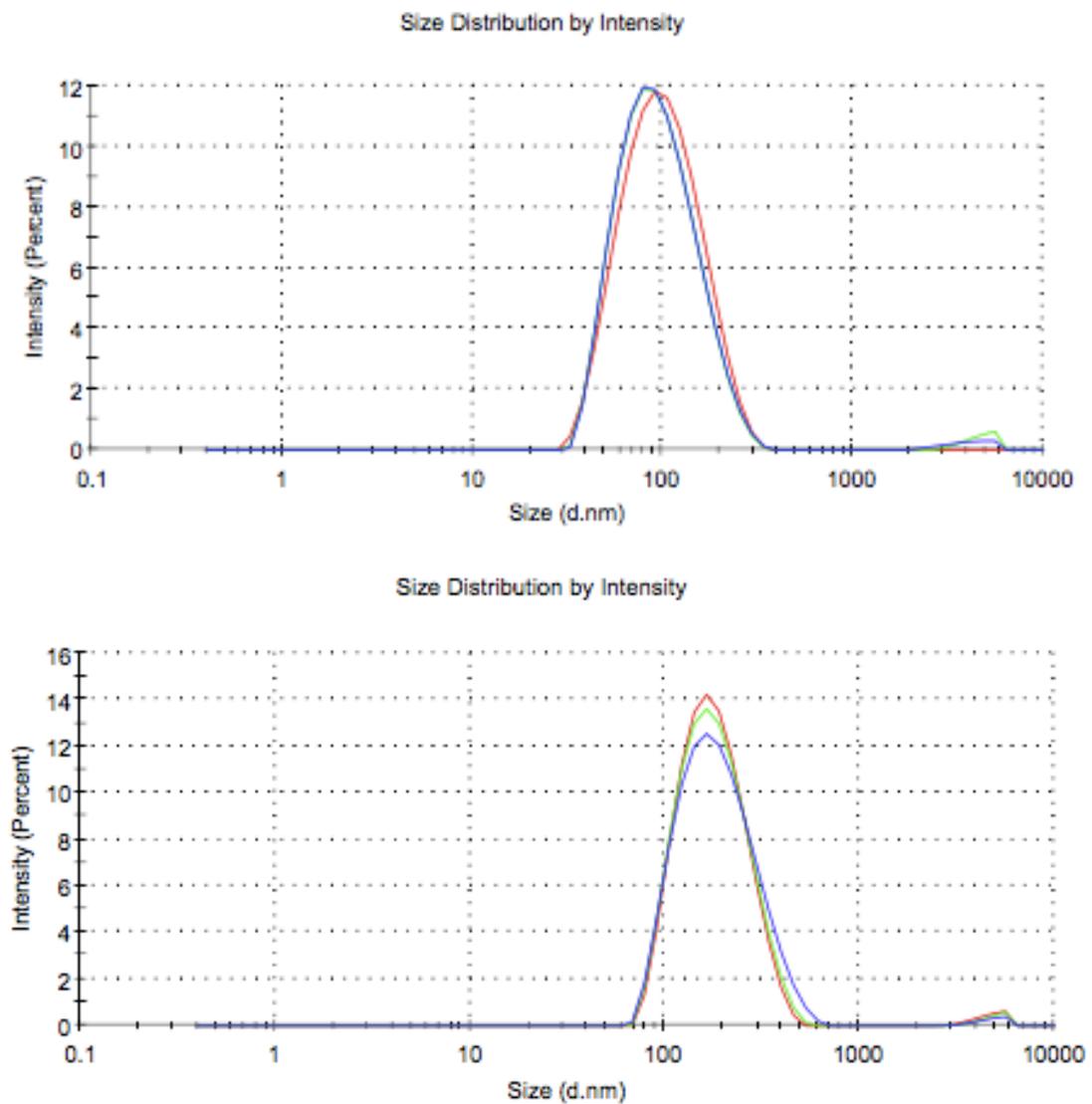


Figura 24 Distribución de diámetro obtenida por DLS de nanopartículas de zeína (arriba) y nanopartículas de zeína con magaya (abajo)

Durante el cálculo de los factores de encapsulación según la Ecuación 1, presentada en la sección 3.8, se encontró que los valores de absorbancia para la fase de acetato de etilo eran mayores para las extracciones de los antioxidantes nanoencapsulados que para las extracciones de los antioxidantes sin encapsular, dando valores negativos de F tanto para las nanocápsulas de zeína como para las de zeína-caseinato. Sin embargo, los extractos de acetato de etilo de las nanocápsulas aparecían turbios en ambos casos, lo que falsea las mediciones.

Además, la turbidez sugiere que parte de las nanocápsulas migran a la fase orgánica arrastrando consigo, posiblemente, a los antioxidantes, lo que incrementa la absorbancia sin corresponderse realmente con antioxidantes libres no encapsulados. Por esta razón, esta metodología para determinar el grado de encapsulación de los antioxidantes requiere una mayor optimización.

5. Conclusiones

- Se determinó mediante análisis factorial que ni relación masa / volumen ni el tiempo de extracción, tienen influencia significativa en la extracción Soxhlet de compuestos antioxidantes fenólicos de magaya de manzana de sidra.
- Se caracterizaron los extractos de magaya de sidra por distintas técnicas analíticas, identificando la presencia de cumarina, ácido gálico y ácido clorogénico mediante HPLC.
- El contenido total de fenoles en los extractos medida mediante Folin-Ciocalteu es superior al determinado por DPPH o FRAP.
- Se lograron sintetizar nanopartículas de proteínas de origen vegetal para encapsular los antioxidantes. Sin embargo, el método propuesto para determinar el grado de encapsulación no es válido debido a la extracción parcial de las nanocápsulas, por lo que es necesario más trabajo en este aspecto.

6. Abreviaturas y símbolos

°C	Grado(s) Celsius
%	Por ciento
±	Más o menos
Abs	Absorbancia
cm	Centímetro(s)
DLS	Dispersión dinámica de luz
DOP	Denominación de Origen Protegida
DPO	Diferencia de paso óptico
DPPH	Di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FRAP	Capacidad de reducción férrica del plasma
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
g	Gramo(s)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IR	Infrarrojo(s)
L	Litro(s)
mL	Mililitro(s)
nm	Nanómetro(s)
PdI	Índice de polidispersión
rpm	Revoluciones por minuto
TPTZ	2,4,6-Tri (2- piridilo)-1,3,5-triazina
UV-VIS	Espectrofotometría de visible ultravioleta

7. Bibliografía

Association of the Cider and Fruit Wine Industry of the European Union <<http://www.aicv.org>>.

Ashok R. Patel, Elisabeth C. M. Bouwens, and Krassimir P. Velikov. 2010. Sodium Caseinate Stabilized Zein Colloidal Particles. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 12497–12503.

B. Suárez et al. 2010. Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry* 117 (2009) 731–738.

Berovic, M., Ostroversnik, H., 1997. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. *Journal of Biotechnology* 53 (1997) 47–53.

Bhushan, S., Kalia, K., Sharma, M., Singh, B., Ahuja, P.S., 2008. Processing of apple pomace for bioactive molecules. *Critical Reviews in Biotechnology* 28 (2008) 285–296.

Brigida D’Abrosca, Severina Pacifico *, Giuseppe Cefarelli, Claudio Mastellone, Antonio Fiorentino. 2007. ‘Limoncella’ apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chemistry* 104 (2007) 1333–1337.

Chan-Eun Park, Dong-June Park, and Bum-Keun Kim. 2015. Effects of a Chitosan Coating on Properties of Retinol-Encapsulated Zein Nanoparticles. *Food Sci. Biotechnol.* 24(5) (2015)1725-1733.

Chinnici, F., Bendini, A., Gaiani, A., & Riponi, C. 2004. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. golden delicious apples as related to their phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15) (2004) 4684–4689.

Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. *Principios de análisis instrumental*, 6ta Edición 2009 EDICIONES PARANINFO.

Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. 2010. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *J Agric Food Chem.* ;58(14) (2010) 8139-44.

Fangyuan Dong, et al.2016. Doxorubicin-loaded biodegradable self-assembly zein nanoparticle and its anti-cancer effect: Preparation, in vitro evaluation, and cellular uptake. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 140 (2016) 324–331.

Favela-Torres, E., Volke, S.T., Viniegra, G.G., 2006. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technology and Biotechnology* 44 (2006) 221–227.

Folts, J. D., 2002. Potential health benefits from the flavonoids in grape products in vascular disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 505 (2002) 95–111.

Hang, Y.D., Lee, C.Y., Woodams, E.E., Cooley, H.J., 1981. Production of alcohol from apple pomace. *Applied and Environmental Microbiology* 42(1981) 1128–1129.

Hilde Henny Wijngaard *, Nigel Brunton. 2010. The optimisation of solid–liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 96 (2010) 134–140

Joshi, V.K., Gupta, K., Devrajan, A., Lal, B.B., Arya, S.P., 2000. Production and evaluation of fermented apple pomace in the feed of broilers. *Journal of Food Science and Technology* 37 (2000) 609–612.

Julieta Leyva-Corral, Armando Quintero-Ramos, Alejandro Camacho-Da vila. 2016. Polyphenolic compound stability and antioxidant capacity of apple pomace in an extruded cereal. *LWT - Food Science and Technology* 65 (2016) 228e236

Khoshrooz Kazemi, Baiyu Zhang, Leonard M. Lye, Qinghong Cai, Tong Cao. 2016. Design of experiment (DOE) based screening of factors affecting municipal solid waste (MSW) composting. *Waste Management* 5 (2016), 107–117.

Leborgne, L., Maziere, J. C., Maziere, C., & Andrejak, M., 2002. Oxidative stress, atherogenesis and cardiovascular risk factors. *Archives des Maladies du C ur et des Vaisseaux*, 95(9) (2002) 805–814.

Md. Nur Alam *, Nusrat Jahan Bristi, Md. Rafiquzzaman, 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* (2013) 21, 143–152

Osman Sagdic, Ismet Ozturk, Gulcan Ozkan, Hasan Yetim, Lutfiye Ekici, Mustafa Tahsin Yilmaz. 2011. RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food Chemistry* 126 (2011) 1749–1758.

Pedro, D., Aangela, M. 2011. Análisis crítico del diseño factorial 2k sobre casos aplicados. *Scientia et Technica*, 47 (2011) 0122-1701.

Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle. 2005. Spectrometric identification of organic compounds. Seventh Edition.

Sadeghi Ekbatan S, Sleno L, Sabally K, Khairallah J, Azadi B, Rodes L, Prakash S, Donnelly DJ, Kubow S. 2016. Biotransformation of polyphenols in a dynamic multistage gastrointestinal model. *Food Chemistry*, 204 (2016) 453-62.

Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L. & Jacobo-Velázquez, D. A., 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods* 5 (2013) 5990-5999.

Schieber, A., Hilt, P., Streker, P., Endress, H.U., Rentschler, C., Carle, R., 2003. A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4 (2003) 99– 107.

Sehm, J., Lindermayer, H., Dummer, C., Treutter, D., Pfaffl, M.W., 2007. The influence of polyphenol rich apple pomace or red-wine pomace diet on the gut morphology in weaning piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 91 (2007) 289–296.

Sofia F. Reis, Dilip K. Rai, Nissreen Abu-Ghannam. 2014. Apple pomace as a potential ingredient for the development of new functional foods. *International journal of food science & technology* 49.7 (2014): 1743-1750.

Tsuda, T., Watanabe, M., Oshima, K., Norinobu, S., Choi, S. W., Kawakishi, S., et al. 1994. Antioxidative activity of anthocyanin pigments cyanidin 3-O-b-D-glucoside and cyanidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(11) (1994) 2407–2410.

Vendruscolo, F., Albuquerque, P.C.M., Streit, F., Esposito, E., Ninow, J.L., 2008. Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 28 (2008) 1–12.

Vít Marecek, Alexandr Mikyska, David Hampel, Pavel Cejka, Jana Neuwirthova, Alexandra Malachova, Radim Cerkal. 2017. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science* 73 (2017) 40–45.

Y. Luo et al. 2011. Preparation and Characterization of Zein/Chitosan Complex for Encapsulation of α -Tocopherol, and it's in Vitro Controlled Release Study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85 (2011) 145–152.

Yang, J., Paulino, R., Janke-Stedronsky, S., & Abawi, F., 2007. Free-radical- scavenging activity and total phenols of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder in processing and storage. *Food Chemistry*, 102 (2007) 302–308.

Yolanda Diñeiro García, Belén Suárez, and Anna Picinelli-Lobo. 2009. Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace. *Food Chemistry* 117 (2009)731–738.