

### Informe técnico N°20193

**Cliente:** Alimentaria Caprina SRL

**Dirección:** Córdoba

**Tipo de muestra:** Leche de cabra en polvo. Marca La Primera “Leche La Primera”

**Identificación de las muestras:** Leche entera

**Fecha de finalización del ensayo:** 20/03/2019

**Fecha de emisión del informe:** 29/03/2019

---

#### Extracción y cuantificación de proteínas totales

50 g de leche entera fue hidratada con 250 ml de agua destilada. Las proteínas se precipitaron con HCl 20% hasta pH 4,6, previa separación de la fase lipídica en frío. El precipitado obtenido se lavó con H<sub>2</sub>O destilada y se liofilizó. La solución de proteínas a usar en los ensayos biológicos se preparó en buffer fosfato de sodio 84 mM pH 7,4. El contenido de proteínas se determinó por el método de Bradford y fue expresado como % de proteínas.

#### Extracción y cuantificación de polifenoles

Se realizó un extracto enriquecido en compuestos fenólicos a partir de la leche entera hidratada (50g en 250ml de agua destilada). Los fenólicos fueron extraídos con metanol al 50% según la técnica de Velázquez Vazquez y col. (2015). Luego se cuantificaron los Compuestos fenólicos según el método de Singleton y col. (1999). Las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresó el contenido de compuestos fenólicos totales en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de leche en polvo.

#### -Actividades biológicas

#### Actividades funcionales evaluadas

**Capacidad antioxidante de los metabolitos extraídos: proteínas y compuestos fenólicos**

1-Protección del blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno (Ordóñez y col., 2006)

2-Depuración del radical - catión ABTS (Re y col., 1999)

3- Depuración de especies reactivas de oxígeno (Actividad depuradora del radical hidroxilo) (Chobot, 2010)

4- Inhibición de la peroxidación lipídica (Ordóñez y col., 2006)

### ***Capacidad antiinflamatoria de proteínas y compuestos fenólicos***

-Capacidad inhibitoria de la enzima Lipoxigenasa (Taraporewa y Kauffman, 1990)

## **Resultados:**

### **I) Actividad antioxidante y antiinflamatoria de proteínas extraídas de leche de cabra en polvo**

Se extrajeron las proteínas por precipitación acida obteniendo valores de 10% de proteínas totales. A partir de las proteínas extraídas se prepararon soluciones de 1,4 mg de proteína/ ml de buffer fosfato de sodio 84 mM pH 7,4. Estas soluciones se utilizaron para determinar las actividades biológicas de las muestras.

A partir del extracto proteico se determinó la actividad antioxidante y antiinflamatoria. La actividad antioxidante se evaluó por tres metodologías diferentes, la primera permite analizar la capacidad que tiene la leche de proteger a los lípidos de la oxidación (ensayo del  $\beta$ -caroteno), la segunda permite evaluar el poder depurador de radicales libres estables (ensayo ABTS) y la tercera permite analizar la capacidad de las muestras de leche de depurar especies reactivas de oxígeno (ERO) como el radical hidroxilo. La actividad antioxidante se expresó en  $CI_{50}$ , que se define como la cantidad de proteínas de la leche necesaria para proteger el 50% de los lípidos de la oxidación y en  $CD_{50}$ , como la cantidad de proteínas de la leche necesarios para depurar o barrer las especies reactivas de oxígeno o el ABTS. Los valores de  $CD_{50}$  y  $CI_{50}$  también fueron expresados en cantidad de leche por mililitro.

Como puede apreciarse las proteínas de la leche presentan capacidad depuradora de radical hidroxilo, de ABTS y protegen a los lípidos de la oxidación.

Por otro lado, se analizó la capacidad de las proteínas de la leche de inhibir a la enzima lipooxigenasa (enzima mediadora de la inflamación) y se demostró que las mismas no presentan actividad inhibitoria de la enzima en el rango de concentraciones ensayadas.

Muestras	$\beta$ -Caroteno CI <sub>50</sub>	ABTS*+ CD <sub>50</sub>	Radical Hidroxilo CD <sub>50</sub>	LOX CI <sub>50</sub>
Extracto proteico obtenido a partir de leche entera	0,52±0,05	2,25±0,02	2,86±0,02	ND
	0,051±0,05	0,22±0,02	0,21±0,03	ND

ND: no se detecta inhibición hasta la máxima concentración posible de evaluar (0,2 mg de leche/mL o 0,017 mg de proteína/mL)

**CD<sub>50</sub>**=concentración de leche o de proteína que depura el 50% del radical-cation ABTS o el radical hidroxilo.

**CI<sub>50</sub>**= concentración de leche o de proteína que inhibe el 50% de la actividad de la enzima LOX o la que inhibe el 50% de la peroxidacion

## II) Actividad antioxidante y antiinflamatoria de polifenoles extraídos de leche en polvo de cabra

A partir del extracto enriquecido en polifenoles se determinó la actividad antioxidante y antiinflamatoria. La actividad antioxidante se determinó por tres metodologías diferentes, la primera permite analizar la capacidad que tiene la leche de proteger a los lípidos de la oxidación (ensayo de  $\beta$ -caroteno), la segunda permite evaluar el poder depurador de radicales libres estables (ensayo ABTS) y la tercera permite analizar la capacidad de las muestras de leche de depurar especies reactivas de oxígeno (ERO) como el radical hidroxilo. La actividad antioxidante se expresó en CI<sub>50</sub> que se define como la cantidad de compuestos fenólicos de la leche necesarios para proteger el 50% de los lípidos de la oxidación y en CD<sub>50</sub>, como la cantidad de compuestos fenólicos de la leche necesarios para depurar o barrer las especies reactivas de oxígeno.

En todos los casos, para cada ensayo se escogió un compuesto de referencia para comparar la potencia antioxidante. Así para el ensayo de  $\beta$ -caroteno, ABTS y el de depuración de radical hidroxilo se usó como compuesto de referencia a un flavonoide comercial (quercetina) antioxidante encontrado en numerosos alimentos de origen vegetal, también se usó un antioxidante natural: vitamina C o ácido ascórbico y Butil hidroxil tolueno (BHT), un antioxidante sintético. En la tabla se observa que los polifenoles de leche de cabra entera tienen muy buena potencia antioxidante en los tres ensayos.

Por otro lado, se analizó la capacidad de los polifenoles de la leche de inhibir a la enzima lipooxigenasa y se demostró que las mismas presentan muy buena actividad inhibidora de la enzima lipooxigenasa comparado a un flavonoide comercial como la quercetina ya que los valores de  $CI_{50}$  son menores.

Muestras	$\beta$ -Caroteno $CI_{50}$	ABTS*+ $CD_{50}$	Radical hidroxilo $CD_{50}$	LOX $CI_{50}$
Extracto polifenolico obtenido a partir de leche entera		mg de leche/mL		
	1,65±0,07	0,80±0,02	27,9±0,2	0,03±0,003
		$\mu$ g EAG/mL		
	12,7±0,15	6,3±0,1	214±11	0,237±0,01
Quercetina	7,3 ± 0,2	3,6±0,4		14 ± 0,1
Ácido Ascórbico			1,7±0,4	
BHT	3,5±0,21			

Los resultados indicarían que polifenoles y proteínas aportan a la capacidad antioxidante de la leche de cabra y solamente los polifenoles presentes en la leche son los responsables de la capacidad antiinflamatoria detectada en la leche de cabra

#### Referencias:

AACC (2000). Basic method 08-01 ash, crude protein-improved method Kjeldahl method 46-10. In International approved methods of American association of cereal chemists. St Paul, MN.

AOCS. (1989). Official methods and recommended practices of American Oil Chemist's Society. Champaign: American Oil Chemist's Society, Method Ce-66

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(12), 248–254.

Chobot V. 2010. Simoultaneous detection of pro- and antioxidative effect in the variants of the deoxyribose degradation assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 2088- 2094.

-Ordoñez, A., Vattuone, M.A, Isla, M.I., (2006) Antioxidant activities of Sechiumedule (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem* 97, 452-458.

Prieto, M.A., Vazquez, J.A., Murado M.A.2012.  $\beta$ -carotene assay revisited. Aplication to characterize and quantify antioxidant and pro-oxidant activities in microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 8983-8993.

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

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Method inEnzymology*, 299, 152-178.

Taraparewala, I. B. and Kauffman, J. M. (1990). Synthesis and structure-activity relationships of anti-inflammatory 9, 10-dihydro-9-oxo-2-acridine-alkanoic acid and 4(2-carboxyphenyl) aminobenzenealkanoic acids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 79, 173.

Velázquez Vázquez C.; Villa Rojas, M.G.; Alvarez Ramírez C.;Chávez-Servín J. L.; García-Gasca T; Ferriz Martínez R. A.; García O.P.;Rosado J. L., Carmen M. López-Sabater; Castellote A. I.; Andrade Montemayor H. M.; de la Torre Carbot K. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. *Food Chemistry* 176 (2015) 480–486