

Caracterización fisicoquímica y liberación de extractos de yerba mate encapsulados

Lipid content, fraction separation and acidic composition of a commercial mate tee (*Ilex paraguayensis*) brand

Deladino L (1), Anbinder P. (3), Navarro A. (1,2) y Martino M. (1)

(1) CIDCA, CONICET, Fac. Cs. Exactas (UNLP), 47 y 116, La Plata (1900).

(2) Fac. Ing. (UNLP), 1 y 47, La Plata (1900).

(3) INIFTA, CONICET, Fac. Cs. Exactas (UNLP), Diag. 113 y 64, La Plata (1900), Argentina.

loredeladino@gmail.com

RESUMEN

Los antioxidantes evitan cambios de sabor, aroma, así como cambios en el valor nutricional de los alimentos. Además, el consumo de antioxidantes en la dieta o como suplemento dietario es aconsejable para disminuir el riesgo de contraer aterosclerosis, cáncer y retardar el proceso de envejecimiento. La encapsulación, como mecanismo de protección de compuestos activos, amplía el rango de aplicación de compuestos lábiles a las condiciones del medio y permite una liberación controlada de los mismos. Los objetivos del presente estudio fueron analizar las condiciones de obtención de las cápsulas de alginato de calcio con y sin recubrimiento de quitosano, conteniendo extractos liofilizados de yerba mate (*Ilex paraguayensis*), caracterizar las mismas a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Además se evaluó la liberación *in-vitro* de los antioxidantes encapsulados. Respecto a la obtención de las cápsulas, se estudió el efecto de la concentración de la solución de quitosano (1; 0.5 y 0.1 % p/v en ácido acético al 1%) y del agregado de cloruro de calcio 0.055 M a la solución del quitosano. La eficiencia de la encapsulación se determinó mediante la destrucción de la matriz con citrato de sodio (5% p/v) y posterior cuantificación de los polifenoles totales mediante la técnica de Folin Ciocalteau. Se seleccionó una concentración de quitosano de 0.5% p/v, observándose que el cloruro de calcio no tuvo efecto en la cantidad del compuesto activo encapsulado. En la caracterización mediante DSC se observó el pico característico del extracto de yerba mate (85°C) en ambos tipos de cápsulas, con y sin recubrimiento. En el estudio mediante FTIR se observaron bandas características del alginato y del quitosano, y nuevas bandas que indicarían la interacción entre ambos hidrocoloides y el extracto. La simulación de la digestión *in vitro* de los encapsulados mostró que la mayor parte de los antioxidantes se liberaban en el estómago.

ABSTRACT

Food antioxidants prevent changes in flavour, taste and nutritional value. Natural antioxidants intake in diet or as dietary supplement is highly recommended to decrease the risk of atherosclerosis, cancer and delay aging process. Encapsulation protects active compounds, broadens labile compounds application and allows their controlled release. Lyophilized yerba mate (*Ilex paraguayensis*) extracts were encapsulated in calcium alginate, with and without chitosan external layer. The objectives of this work were to analyze the effect of chitosan solution concentration (1; 0.5 and 0.1 % w/v in acetic acid 1%) and the effect of calcium chloride incorporation in chitosan solution, on encapsulation efficiency. To characterize the capsules by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Infrared Spectroscopy (FT-IR) and to quantify the *in vitro* release of encapsulated antioxidants. The encapsulation efficiency was quantified by destroying the matrix with sodium citrate (5% w/v) and measuring total polyphenol content. The presence of CaCl₂ in chitosan solution did not increase the encapsulation efficiency. The concentration of 0.5% of chitosan was selected. Yerba mate extract showed a broad peak at 85°C by DSC. This peak was also observed in thermograms of both types of capsules, with or without external layer. In FT-IR spectra, characteristic bands of alginate and chitosan were observed and new ones appeared denoting the interaction between both hydrocolloids. *In vitro* digestion of capsules showed that antioxidants released mainly in stomach.

PALABRAS CLAVE: *encapsulación-antioxidantes-yerba mate.*

KEYWORDS: *encapsulation-antioxidants-yerba mate.*

INTRODUCCIÓN

La yerba mate (*Ilex paraguariensis Saint Hilare*) es una planta originaria del bosque subtropical de Sud América. La zona de distribución en nuestro país comprende la provincia de Misiones y el nordeste de la provincia de Corrientes. Una de las características distintivas de este cultivo, es la abundante concentración de sustancias antioxidantes, flavonoides, muy importantes en la búsqueda y mantenimiento de la salud. Estas sustancias combaten la acción oxidante de radicales libres que, al atacar a las células del organismo, son responsables de la producción de enfermedades y del envejecimiento temprano. Los antioxidantes retrasan o previenen la oxidación del sustrato, cuando están presentes en los alimentos o en el cuerpo a bajas concentraciones en comparación al sustrato oxidable. La industria alimenticia emplea antioxidantes de grado alimenticio, principalmente fenoles, para prevenir el deterioro de los productos y mantener su valor nutricional. Los antioxidantes también han sido de interés para los profesionales de la salud, ya que ayudan al cuerpo a protegerse del daño causado por las especies reactivas al oxígeno, nitrógeno y cloro, asociadas con enfermedades degenerativas (Shahidi y Nacz, 2004).

La encapsulación es una tecnología que permite incluir materiales sólidos, líquidos y gaseosos en pequeñas cápsulas que liberan su contenido a velocidades controladas durante períodos de tiempo prolongados. Además, la encapsulación en el área de los alimentos puede ser empleada para solucionar problemas de formulación causados por baja estabilidad química o física del ingrediente activo, incompatibilidad entre el ingrediente activo y la matriz del alimento o para controlar la liberación de un ingrediente sensorialmente activo o la biodisponibilidad de un nutriente (Champagne, 2007).

El amplio interés en el reemplazo de antioxidantes sintéticos por otros de origen natural, sobre todo en el campo de los alimentos, es mundialmente conocido. En nuestro laboratorio se obtuvo un extracto liofilizado de yerba mate (Deladino y col., 2008), el cual posee una elevada actividad antioxidante debido a su elevado contenido en polifenoles. Sin embargo, este polvo tiene una limitación en cuanto a su higroscopicidad, lo cual hace necesaria su protección a fin de conservarlo para su posterior aplicación.

Los objetivos de este trabajo fueron encapsular un extracto liofilizado de yerba mate en un sistema de alginato de calcio con y sin recubrimiento de quitosano y analizar las condiciones de obtención de las cápsulas; por otro lado, caracterizar las cápsulas obtenidas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) y estudiar la liberación *in-vitro* de los antioxidantes encapsulados.

MATERIALES Y MÉTODOS

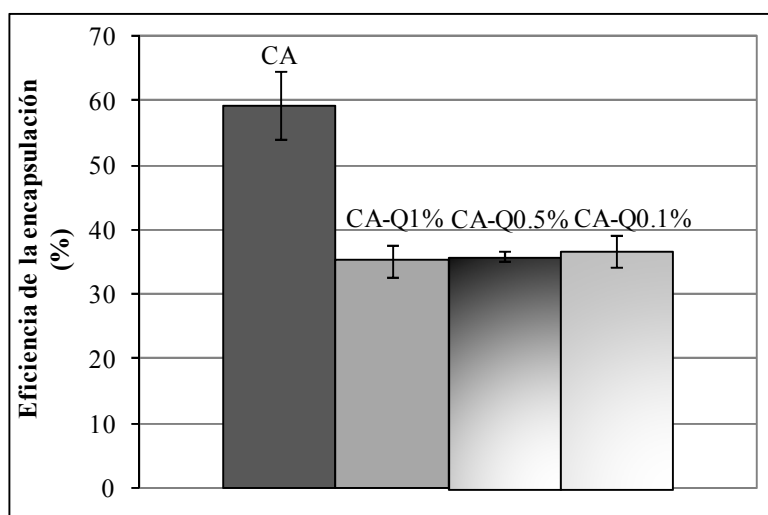
Para obtener los encapsulados se mezcló el compuesto activo (1% p/v) con una solución de alginato de sodio 2% (p/v) la cual se dejó gotear a través de una aguja conectada a una bomba peristáltica, en una solución de cloruro de calcio (0.05M). Las cápsulas obtenidas fueron mantenidas en la solución gelificante durante 15 min. Luego, fueron filtradas y enjuagadas con una solución buffer (acético-acetato, pH 5.5) y se dejaron estabilizar al aire durante otros 15 min para permitir la total difusión del calcio dentro de la cápsula. Los encapsulados así obtenidos se denominaron “cápsulas alginato”. A continuación, un grupo de cápsulas alginato fueron sumergidas en una solución de quitosano. El efecto del agregado de quitosano como capa externa se estudió ensayando tres soluciones de quitosano: 1%, 0.5% y 0.1% en ácido acético glacial al 1%. Para este experimento se empleó un diseño en bloques completos aleatorizados, ya que existía la posibilidad de que las diferentes tandas de cápsulas, obtenidas en días distintos, introduzcan cierta variabilidad en el ensayo. El ensayo se realizó por quintuplicado. Las cápsulas permanecieron durante 30 minutos en la solución de quitosano; a estos encapsulados se los denominó “cápsulas alginato-quitosano”.

Además, en el caso de los encapsulados recubiertos con quitosano, se estudió el efecto del agregado de iones calcio en la solución de quitosano, con el objetivo de evaluar si se retenían más cantidad de polifenoles con respecto al quitosano sin CaCl₂ debido a una diferencia de presión osmótica. Para ello, a cada una de las soluciones de quitosano preparadas, se le adicionó cloruro de calcio 0,05M. Ambos

tipos de cápsulas se secaron en estufa de convección a 65°C durante 3 h. La eficiencia de la encapsulación en todos los casos mencionados se determinó mediante la destrucción de la matriz con citrato de sodio 5% p/v y la posterior determinación de polifenoles totales mediante Folin-Ciocalteu (Schelesier, 2002). La liberación *in vitro* del extracto encapsulado se realizó empleando HCl 0,1 M (pH ≈ 2) como Fluido gástrico simulado (FGS) y Buffer Sorensen's fosfato (pH=7.4) como Fluido intestinal simulado (FIS). Para el ensayo se colocaron en un erlenmeyer 40 cápsulas en 100 ml de FGS, en un agitador orbital a 37°C y 180 rpm durante 3 h. Luego de este período, se filtraron las cápsulas (aún íntegras) y se trasvasaron a otro erlenmeyer con 100 ml de fluido intestinal simulado, donde también permanecieron un tiempo de 3 h. Se cuantificó la masa de polifenoles totales en ambos medios simulados. La sumatoria de la masa de polifenoles en ambos medios se tomó como el contenido total liberado durante la digestión *in vitro*. Para el estudio mediante FT-IR se utilizaron muestras liofilizadas del extracto y de las cápsulas con y sin compuesto activo. Las mismas fueron mezcladas y trituradas con KBr para luego obtener pastillas y ser caracterizadas por transmisión. Se usó un equipo Nicolet 380 FT-IR, obteniendo 64 escaneos por ensayo, con una resolución de 4 cm⁻¹. Las muestras también fueron analizadas en un calorímetro diferencial de barrido (DSC Q100, TA Instruments). La velocidad de calentamiento fue de 10°C/min. Los análisis se realizaron por triplicado. Se analizó el extracto liofilizado sin encapsular, cápsulas control (sin extracto) y las cápsulas (alginato y alginato-quitosano) con extracto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la **Figura 1**, todas las cápsulas recubiertas con quitosano presentaron diferencias significativas con respecto a las cápsulas control ($p < 0.05$), siendo las últimas las que más compuesto activo retuvieron. Entre las cápsulas con diferente concentración de quitosano en la capa externa, las cápsulas con quitosano al 0.5% obtuvieron porcentajes de encapsulación iguales a las otras dos concentraciones del polication ($p > 0.05$), en tanto las concentraciones de quitosano de 0.1 y 1 % presentaron porcentajes de retención significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$). La concentración del 1% fue la que mayor porcentaje de encapsulación mostró, por lo tanto, como el quitosano al 0.5% no presentó diferencias significativas con ésta, se decidió continuar empleando una concentración del 0.5% en ensayos posteriores. Con el objetivo de incrementar el porcentaje de extracto retenido en las cápsulas cubiertas de quitosano, se agregaron iones calcio a la solución del polication, pero su incorporación no se tradujo en un aumento de retención del extracto liofilizado, sin embargo, varios autores (Bartkowiak y Hunkeler 1999, 2000; George et al. 2006) estudiaron cápsulas de complejos de quitosano–alginato y concluyeron que la adición de calcio mejoraba la estabilidad de la estructura.



CA: Cápsulas alginato, CA-Q1%: Cápsulas alginato-quitosano 1%, CA-Q0.5%:Cápsulas alginato-quitosano 0.5%, CA-Q0.1%:Cápsulas alginato-quitosano 0.1%.

Figura 1. Efecto de la concentración de quitosano sobre la eficiencia de la encapsulación.

La eficiencia de la encapsulación fue menor para las cápsulas con quitosano, lo cual fue atribuido a una posible interacción entre el quitosano y los polifenoles del extracto lo cual no permitiría su detección (Popa et al. 2000). Con respecto a la liberación *in-vitro* de los extractos la mayor parte del mismo se liberó en el fluido gástrico simulado (FGS) a lo largo de un tiempo total de 3 h (**Figura 2**), quedando solo alrededor de un 10 % en el fluido intestinal simulado. Este ensayo permitió corroborar la eficiencia de la encapsulación, ya que si bien los porcentajes finales no son idénticos, se mantiene la relación entre cápsulas alginato/cápsulas alginato-quitosano. Sin embargo, las cápsulas recubiertas con quitosano protegieron mejor al compuesto activo durante su pasaje por el FGS, ya que retuvieron un 20% del total encapsulado, con respecto a un 10% retenido en cápsulas de alginato (**Figura 2**). De acuerdo a George y Abraham (2006) este resultado puede ser atribuido a que si bien el quitosano es soluble a bajos pHs como el del estómago, al estar formando un complejo o membrana con el alginato que es insoluble en esta condición, las cápsulas recubiertas con el policación son más resistentes que las cápsulas alginato durante su pasaje por el fluido gástrico simulado.

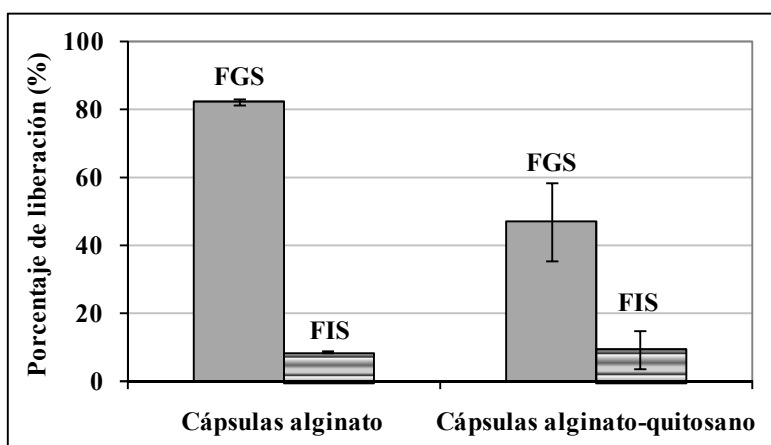


Figura 2. Porcentaje de extracto de yerba mate liberado *in-vitro*: FGS: Fluido Gástrico Simulado; FIS: Fluido Intestinal Simulado.

Con respecto a la caracterización de los encapsulados, se puede observar en la **Figura 3** que el espectro FT-IR del extracto de yerba mate liofilizado presenta bandas características de polifenoles, con una amplia banda centrada a 3400 cm^{-1} asignada a los grupos OH, también se observan picos a 1606 y 1520 cm^{-1} atribuidos a la vibración C=C del anillo aromático y a los grupos hidroxilos fenólicos respectivamente, así como una banda de estiramiento del grupo C=O a 1270 cm^{-1} (Tanizawa et al. 2007 y Ma et al. 2009)

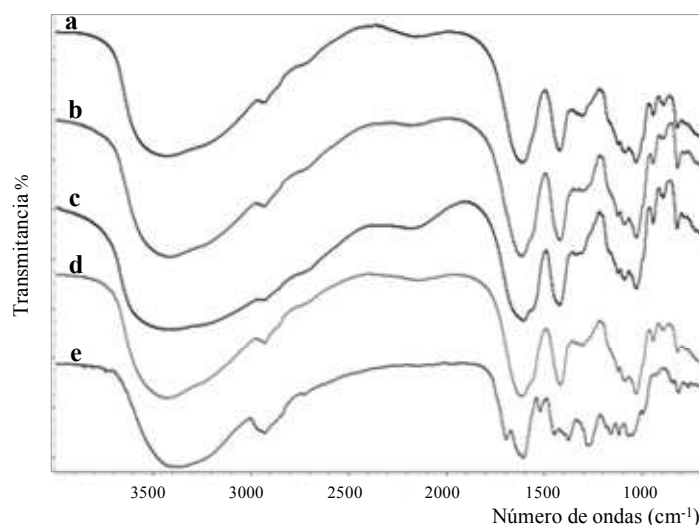


Figura 3. Espectros FT-IR a) Cápsulas alginato sin extracto, b) Cápsulas alginato-quitosano sin extracto, c) Cápsulas alginato, d) Cápsulas alginato-quitosano y e) Extracto liofilizado.

Las cápsulas presentan bandas características relacionadas con las unidades de sacáridos que tienen en común en su estructura (**Figura 3**). Entre 3450 y 3490 cm^{-1} los espectros muestran una banda atribuida a los grupos -OH, el anillo de glucosa aparece entre 1060 y 1150 cm^{-1} (Jansson Charrier et al, 1995). En aquellas cápsulas que contienen el antioxidante se puede observar las contribuciones de la yerba a 1270 cm^{-1} y la presencia de un hombro a 1560 cm^{-1} . Corrimientos en la frecuencia de los picos a 820 y 1420 cm^{-1} podrían estar asociados a interacciones no covalentes entre la matriz de alginato y algún componente del extracto liofilizado.

En la caracterización mediante DSC se observó un único pico para el extracto de yerba mate cercano a los 85°C (**Figuras 4 y 5**), este pico es muy amplio posiblemente debido a la gran cantidad de compuestos presentes en el extracto. En ambos tipos de cápsulas, se observa que la línea de base se encuentra ligeramente afectada por la presencia del extracto en comparación con el placebo cuya línea de base es recta. En el caso de las cápsulas de alginato de calcio, se observan en el placebo dos picos característicos uno endotérmico ($\approx 205^\circ\text{C}$), y otro exotérmico ($\approx 260^\circ\text{C}$). Estos resultados concuerdan con los hallados por Sarmiento et al. (2006), Wong et al. (2002) y Ribeiro et al. (2005).

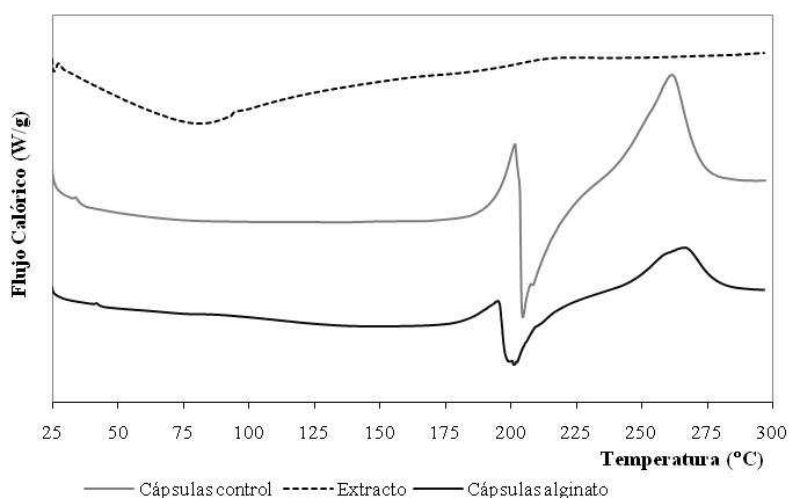


Figura 4. Endotermas obtenidas para el extracto liofilizado y cápsulas de alginato de calcio con y sin antioxidante.

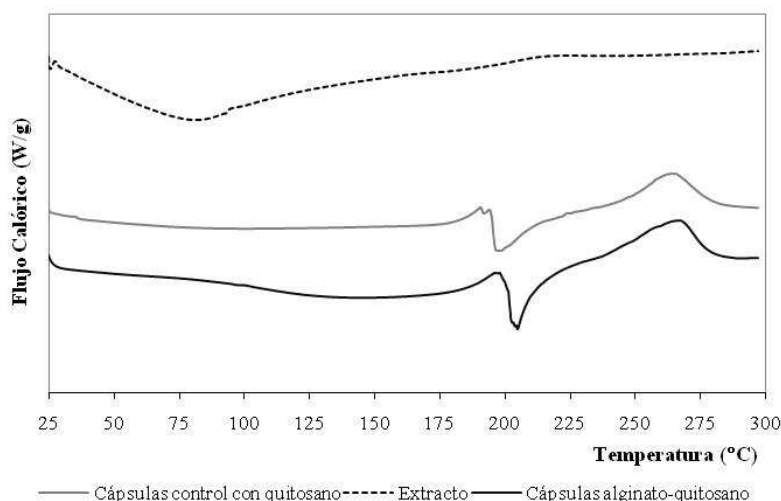


Figura 5. Endotermas obtenidas para el extracto liofilizado y cápsulas de alginato de calcio-quitosano, con y sin antioxidante.

En el caso de las cápsulas recubiertas con quitosano, no se evidenció el pico característico del quitosano ($\approx 120^\circ\text{C}$), en los encapsulados probablemente debido a la baja masa que el hidrocoloide representa en los mismos, aunque los picos representativos de las cápsulas de alginato de calcio se

vieron modificados por el agregado de quitosano, las entalpías puestas en juego (ΔH) son menores, las temperaturas de pico están desplazadas a temperaturas menores y surgió un nuevo pico de muy bajo ΔH alrededor de 190°C. Smitha et al. (2005) encontraron resultados similares, un pico endotérmico alrededor de 200°C al estudiar el complejo alginato-quitosano. Wong et al. (2002) también encontraron este pico en encapsulados de alginato y quitosano sin incorporación del compuesto activo.

CONCLUSIONES

La concentración de la solución de quitosano tuvo efecto sobre la eficiencia de la encapsulación, en cambio, el agregado de iones calcio a la solución de quitosano no influyó sobre la misma. La digestión *in-vitro* mostró que ambas cápsulas liberan la mayoría de su contenido en el estómago y que las cápsulas recubiertas con quitosano protegen mejor al extracto durante su paso por el estómago. Las técnicas empleadas en la caracterización de los encapsulados, DSC y FT-IR permitieron conocer algunas de las interacciones entre los hidrocoloides entre sí y con el extracto de yerba mate.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de la Yerba Mate por el financiamiento otorgado en el marco de los subsidios PRASY.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bartkowiak A. y Hunkeler D. 1999. Alginate-Oligochitosan Microcapsules: A Mechanistic Study Relating Membrane and Capsule Properties to Reaction Conditions. *Chemical Materials*, 11: 2486-2492.

Bartkowiak A. y Hunkeler D. 2000. Alginate-Oligochitosan Microcapsules II. Control of Mechanical Resistance and Permeability of the Membrane. *Chemical Materials*, 12: 206-212.

Champagne C.P. y Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion on Biotechnology*, 18: 184-190.

Deladino L., Anbinder P. S., Navarro A. S. y Martino M. N. 2008. [Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*](#). *Carbohydrate Polymers*, 71: 126-134.

George M., Abraham E. 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan-a review. *Journal of Controlled Release*, 114: 1-14.

Ma H.L., Kermasha S., Gao J.M., Morales Borges R., Yu X.Z. 2009. [Laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds in organic media](#). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57:Pages 89-95.

Jansson Charrier M., Saucedo I., Guibal E. y Le Cloirec P. 1995. Approach of uranium sorptions on chitosan and glutamate glucan by IR and C-NMR analysis. *Reactive and Functional Polymers*, 27: 209-221.

Popa M., Aelenei N., Popa V. y Andrei D. 2000. Study of the interaction between polyphenolic compounds and chitosan. *Reactive and Functional Polymers*, 45: 35-43.

Ribeiro A. J., Neufeld R. J., Arnaud P. y Chaumeil J. C. 1999. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 187: 115–123.

Sarmiento B., Ferreira D., Veiga F. y Ribeiro A. 2006. [Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies](#). *Carbohydrate Polymers*, 66:1-7.

Schlesier K., Harwat M., Bořhm V. y Bitsch R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36: 177-187.

Shahidi F y Naczk M. 2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals. 1^{era} ed. Boca Ratón, Florida: CRC Press LLC.

Smitha B., Sridhar S. y Khan A.A. 2005. Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. European Polymer Journal, 41: 1859-1866.

Tanizawa Y., Abe T. y Yamada K. 2007. [Black tea stain formed on the surface of teacups and pots. Part 1 – Study on the chemical composition and structure.](#) Food Chemistry, 103:1-7.

Wong T. W., Chan L. W., Kho S. B. y Sia Heng P. W. 2002. [Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave.](#) Journal of Controlled Release, 84: 99-114.