



CYTAL-ALACCTA 2019
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MICROEMULSIONES ALIMENTICIAS CON DISTINTAS CARACTERÍSTICAS MICROESTRUCTURALES

N. Mori Cortés¹, S. Scioli Montoto², M. E. Ruiz², A. N. Califano¹, G. Lorenzo^{1,3}

¹*Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET-CICPBA- Facultad de Ciencias Exactas, UNLP), 47 y 115, La Plata, Argentina.*

²*Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos (LIDeB, CONICET- Facultad de Ciencias Exactas, UNLP) – Cátedra de Control de Calidad de Medicamentos (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP), 47 y 115, La Plata, Argentina.*

³*Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).*

E-mail: noe89lp@hotmail.com

RESUMEN

Los alimentos funcionales se presentan como una estrategia potencial para mejorar la salud de la población y prevenir el riesgo de padecer enfermedades. Actualmente en la industria alimentaria existe un creciente interés en la utilización de sistemas coloidales para encapsular compuestos bioactivos (CB) lipófilos. Las microemulsiones resultan interesantes ya que pueden mejorar la biodisponibilidad de los CB, son ópticamente isotrópicas y termodinámicamente estables. Estas pueden ser incorporadas en productos alimenticios de base acuosa que deban ser ópticamente transparentes sin alterarse por acidez o presencia de sales. Sin embargo, las propiedades de las microemulsiones dependen fuertemente de sus ingredientes y composición. Su estructura puede variar desde gotitas de aceite dispersas en agua (microemulsiones o/w, fluidas) hasta bicapas de moléculas tensioactivas que contienen el aceite y se alternan con capas de agua (estructuras bicontinuas, tipo gel). No obstante, el efecto de la microestructura en la liberación de los CB ha sido escasamente estudiado. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue analizar la influencia de la microestructura y la viscosidad en la liberación de vitaminas de microemulsiones alimentarias. Se prepararon microemulsiones o/w conteniendo aceite de girasol, kolliphor RH40 (surfactante), etanol (cosurfactante), agua y vitaminas E y D (relación 1:1). Se evaluaron tres concentraciones de espesante (carboximetilcelulosa, CMC): 0% p/v; 3.5% p/v y 10% p/v. Asimismo, se elaboraron microemulsiones tipo gel (estructura bicontinua) con la misma viscosidad que las microemulsiones o/w con 3.5% p/v CMC. Los perfiles de liberación se determinaron empleando un equipo de disolución (USP Aparato I, canastillo), a 50 rpm y con 250 ml de buffer fosfato pH 6.8 a 37°C como medio de disolución; las formulaciones se colocaron previamente en cápsulas de gelatina rígida (dos cápsulas por vaso). Se midió el porcentaje de vitaminas liberadas durante 24 horas mediante HPLC. La microemulsión sin espesante presentó un porcentaje de liberación de más del 90% de las vitaminas luego de 30 minutos. La microemulsión con estructura bicontinua presentó una liberación del orden del 45% para todos los CB al cabo de 30

minutos, pero luego de 1 hora se logró la liberación completa de los mismos. El agregado de espesante a la microemulsión fluida condujo a una notable disminución de la velocidad de liberación de los CB. La que contenía 3.5% p/v CMC presentó una liberación inferior al 5% después de 30 minutos y solo un 90% luego de 4 horas. Si bien la microemulsión con estructura bicontinua y la que contenía 3.5% p/v de espesante tenían la misma viscosidad, presentaron diferencias en sus perfiles de liberación. Esto sugiere que la formación de una estructura bicontinua permite una mayor disponibilidad de los CB para difundir hacia el medio de liberación, mientras que en presencia de espesante las gotas de aceite quedan inmovilizadas en una red formada por las cadenas poliméricas que debe romperse para que las gotas puedan difundir al medio de liberación. El efecto se vio acentuado con 10% p/v de CMC, ya que luego de 30 minutos se liberó menos del 0.3% y solo un 75% de CB a las 10 horas de ensayo.

Palabras clave: microemulsión, liberación, vitaminas, carboximetilcelulosa.

1. Introducción

En los últimos años, la demanda de alimentos funcionales se ha incrementado considerablemente debido a que los consumidores han tomado consciencia de sus efectos beneficiosos para la salud. Numerosos estudios revelan que el consumo de ciertos bioactivos tales como vitaminas reducen el riesgo de padecer diversas enfermedades. La ingesta adecuada de vitamina D aumenta la absorción intestinal de calcio y promueve la formación normal del hueso y mineralización (Park y col, 2017). Mientras que la vitamina E proporciona beneficios para la salud como la reducción de enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer (Yang y McClementes, 2013). El desarrollo de microemulsiones resulta novedoso ya que permite la incorporación de bioactivos en matrices alimentarias que deben conservar su aspecto transparente como las aguas saborizadas, bebidas a base de hierbas, bebidas isotónicas, gelatinas, gomitas frutales, etc. Asimismo, estos sistemas de vehiculización son altamente estables frente al agregado de grandes concentraciones de sales, variaciones de acidez y temperatura (Mori Cortés, Lorenzo y Califano, 2019). Las microemulsiones pueden estar constituidas por partículas discretas de una fase dispersa en otra (gotas de agua en aceite o viceversa) o estructuras bicontinuas que constan de dos subfases iguales, es decir, lipídica y acuosa (Magno y col., 2009). Estas diversas estructuras coloidales confieren distintos comportamientos reológicos tales como microemulsiones muy fluidas (líquidas, con viscosidades comparables a la del agua) o muy viscosas (geles). En base a esto se planteó como objetivo del presente trabajo analizar el efecto de la microestructura y la viscosidad en la liberación de vitaminas de microemulsiones alimentarias.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

Se empleó emulsificante derivado del aceite de ricino provisto por BASF (BASF Argentina S.A.): hidroxiestearato de macroglicerol (kolliphor RH40). También se utilizó aceite de girasol (Molinos Cañuelas SACIFIA, Argentina), etanol absoluto como cosurfactante (> 99.5%, Soria, Argentina), vitaminas E y D (Laboratorios Bagó S.A., Argentina), carboximetilcelulosa como espesante (Saporiti SACIFIA, Argentina), BHT (Sigma Aldrich, Argentina) y agua destilada y desionizada.

2.2 Preparación de las microemulsiones

La elaboración de las microemulsiones se realizó mediante agitación a baja velocidad y manteniendo una temperatura controlada de 40°C durante todo el proceso. Inicialmente las vitaminas E y D (relación 1:1) junto con el BHT fueron disueltas en aceite de girasol. Luego, se elaboró la fase dispersa constituida por una mezcla de emulsificante (kolliphor RH40), aceite de girasol y etanol absoluto (cosurfactante). Seguidamente, las microemulsiones se prepararon agregando lentamente agua destilada sobre la fase lipídica y manteniendo una velocidad de agitación constante. De este modo se obtuvo una formulación denominada “microemulsión gel” (estructura bicontinua) compuesta por 40% p/p de agua destilada, 54% p/p de emulsificante, 2% p/p de etanol absoluto, 3.34% p/p de aceite, 0.66% p/p de vitaminas y 4×10^{-4} % p/p de BHT. Asimismo, se preparó una formulación denominada “microemulsión o/w” (fluida) con 80% p/p de agua destilada, 18% p/p de emulsificante, 0.66% p/p de etanol absoluto, 0.66% p/p de aceite de girasol, 0.66% p/p de vitaminas y 1.33×10^{-4} % p/p de BHT. A esta microemulsión se le adicionó carboximetilcelulosa (CMC) como espesante en dos concentraciones 3.5% p/v y 10% p/v. De este modo, la microemulsión o/w con 3.5% p/v de CMC adquirió una viscosidad similar a la microemulsión gel. La Figura 1 muestra una imagen donde se pueden apreciar las características estructurales de las microemulsiones analizadas.

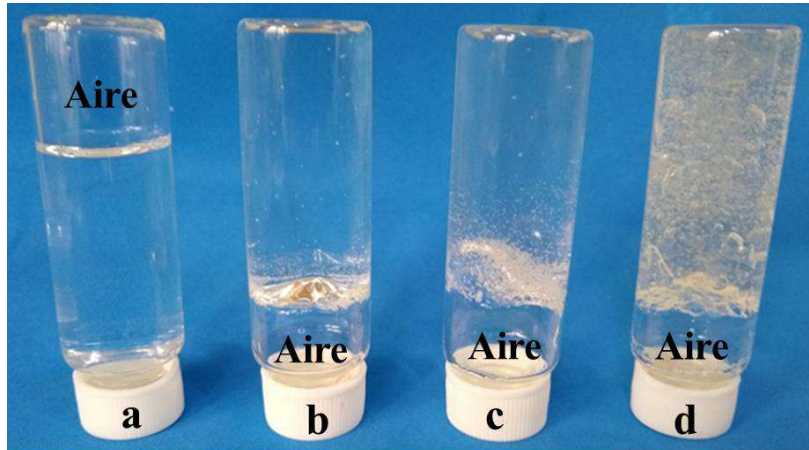


Figura 1. Imágenes de las distintas microemulsiones (ME) analizadas como vehículos de vitaminas E y D. a) ME o/w (fluida), b) ME tipo gel, c) ME con 3.5% p/v CMC, d) ME con 10% p/v CMC.

2.3 Estudio de liberación

Los perfiles de liberación se determinaron empleando un equipo de disolución (USP Aparato I, canastillo). Como medio de disolución se utilizó 250 ml de buffer fosfato a pH 6.8 manteniendo una temperatura controlada de 37°C y mediante agitación continua a 50 rpm. Las formulaciones se colocaron previamente en cápsulas de gelatina rígida (dos cápsulas por vaso). Se retiraron muestras de 1 ml en intervalos de tiempo predeterminados (0.5, 1, 2, 4, 6, 10 y 24 horas) y se reemplazaron con medio de liberación nuevo. El porcentaje de vitaminas liberadas se determinó mediante HPLC. Se seleccionaron dos longitudes de onda (λ) para la determinación de las vitaminas de manera tal de obtener mayor sensibilidad para la detección de cada una: se optó por $\lambda=265$ nm para la vitamina D y $\lambda=284$ nm para la vitamina E.

3. Resultados y discusión

En la Figura 2 se muestra el cromatograma obtenido para la microemulsión con 10% p/v de CMC luego de 24 horas de iniciado el ensayo de liberación, a modo de ejemplo. Previamente a los ensayos de liberación, se analizaron mediante HPLC cada uno de los componentes de la muestra por separado (emulsificante, aceite de girasol, BHT y CMC) para detectar posibles interferencias (solapamiento de picos) con los bioactivos. Como se observa en la figura, el BHT presentó un pico cromatográfico a tiempos de retención marcadamente distintos a los tiempos de retención correspondientes a los bioactivos de modo que no interfirieron en su determinación. Por otra parte, el emulsificante, aceite de

girasol y CMC no pudieron ser detectados en las condiciones cromatográficas ensayadas. Esto demuestra que las concentraciones habituales de alfa-tocoferol provenientes del aceite de girasol no presentan picos de absorción detectables, que puedan superponerse e interferir con la detección de la vitamina E incorporada en la microemulsión.

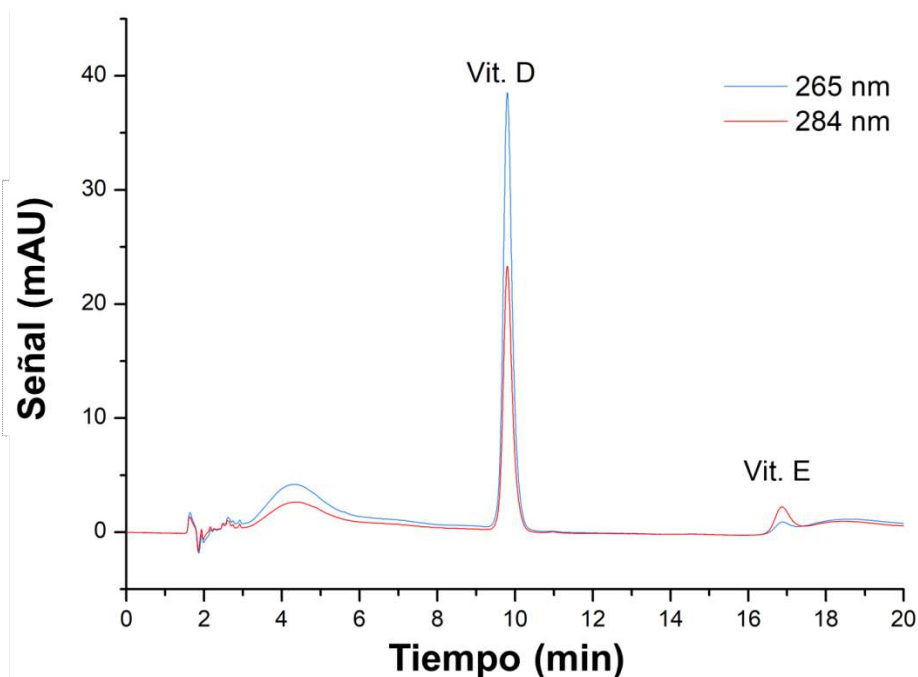


Figura 2. Cromatograma de las vitaminas liberadas a partir de la microemulsión o/w con 10% p/v de CMC luego de 24 horas de ensayo.

La Figura 3 muestra los perfiles de liberación de las vitaminas E y D en función del tiempo para las formulaciones estudiadas. Se puede observar que las vitaminas E y D poseen una velocidad de liberación similar independientemente del tipo de estructura o viscosidad de la microemulsión en estudio.

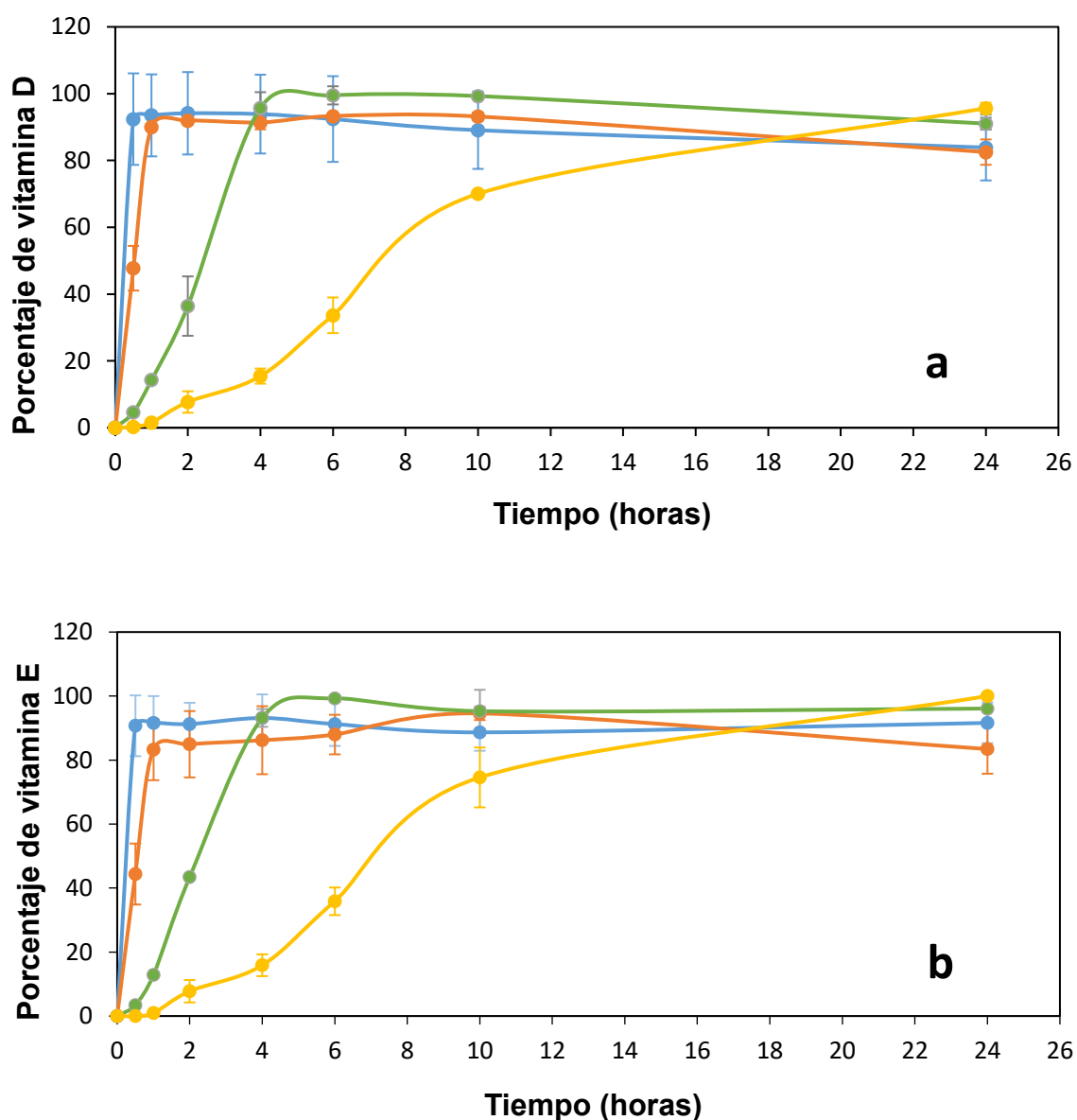


Figura 3. Porcentaje de liberación de vitaminas D (a) y E (b) en función del tiempo para las distintas microemulsiones (ME): (●) ME o/w, (●) ME tipo gel, (●) ME con 3.5% p/v de CMC y (●) ME con 10% p/v de CMC.

La Figura 3 muestra que en un principio existe una marcada diferencia en el perfil de liberación de la microemulsión o/w fluida y aquella con estructura bicontinua. Luego de 30 minutos, la microemulsión o/w fluida presentó un porcentaje de liberación de vitaminas superior al 90% mientras que la microemulsión con estructura bicontinua mostró una liberación del orden del 45% para todos los componentes bioactivos. Sin embargo, al transcurrir 1 hora de ensayo no se observaron diferencias significativas entre los perfiles de liberación de ambas microemulsiones debido a la liberación de aproximadamente el 90% de las vitaminas en la microemulsión con estructura

bicontinua. Feng y col. (2009) encontraron resultados similares al estudiar la velocidad de liberación de vitamina E en microemulsiones o/w elaboradas con un emulsificante no iónico. En las microemulsiones o/w la velocidad de liberación de los bioactivos está afectada principalmente por el gradiente de concentración. En estos sistemas las gotas de aceite que contienen los bioactivos están dispersas en un medio acuoso de baja viscosidad por lo cual pueden difundir fácilmente hacia el medio de liberación. Por otro lado, la microemulsión gelificada al poseer mayor viscosidad presenta menor coeficiente de difusión y en consecuencia menor velocidad de liberación.

Sin embargo, el estudio permitió observar que los cambios en la viscosidad no son la única variable que afecta la velocidad de liberación. La microemulsión con estructura bicontinua y la microemulsión con 3.5% p/v de espesante fueron formuladas con valores similares de viscosidad de reposo a la temperatura de ensayo ($\eta \sim 1 \times 10^3$ Pa.s para $\dot{\gamma} < 0.01$ s⁻¹) y de todas formas exhibieron diferencias notables en sus perfiles de liberación. Esto sugiere que la formación de una estructura bicontinua donde existen bicapas de moléculas tensioactivas que contienen el aceite y se alternan con capas de agua permite una mayor disponibilidad de los bioactivos para difundir hacia el medio de liberación. Por el contrario, en la microemulsión con espesante las gotas de aceite con bioactivos quedan inmovilizadas en una red formada por las cadenas poliméricas del espesante que debe hincharse para que las gotas luego puedan difundir al medio de liberación. El agregado de espesante a la microemulsión o/w fluida condujo a una notable disminución de la velocidad de liberación de los bioactivos. La microemulsión con 3.5% p/v de CMC presentó una liberación inferior al 5% después de 30 minutos y solo se pudo alcanzar un porcentaje de liberación de más del 90% al transcurrir 4 horas de ensayo. El efecto del espesante se vio acentuado al incrementar su concentración al 10% p/v ya que al pasar 30 minutos se observó un porcentaje de liberación inferior al 0.3% y solo se liberó alrededor de un 75% de bioactivos al transcurrir 10 horas de ensayo. Feng y col. (2009) han reportado que el agregado de un gelificante a la fase continua de una microemulsión w/o disminuyó la velocidad de liberación de los bioactivos contenidos en la fase dispersa.

La adición de carboximetilcelulosa a la microemulsión o/w genera una matriz polimérica donde las gotas de aceite con bioactivos se encuentran dispersas homogéneamente. Cuando el sistema se pone en contacto con el medio de disolución, se

genera una interface buffer /matriz polimérica donde existe un gradiente de concentración. Esto induce la absorción de buffer en la interface provocando el hinchamiento de la matriz y por ende un incremento en las dimensiones del sistema. De este modo, se produce un aumento de la movilidad de las cadenas poliméricas que permite que las gotas de la microemulsión entren en contacto con el medio circundante y difundan fuera de la matriz expandida (Andreetta, 2003). En estos tipos de sistemas donde la matriz tiene una fuerte interacción con el fluido que ingresa, la expansión del mismo dependerá de sus propiedades fisicoquímicas, como la viscosidad (Andreetta, 2003). Es por esto que se observa una disminución de la velocidad de liberación al incrementar la concentración de hidrocoloide. En este tipo de microemulsiones, la velocidad de liberación de los bioactivos no solo depende de la velocidad de disolución de la misma sino también de los fenómenos de relajación que afectan a las cadenas poliméricas.

4. Conclusiones

La adición de fase dispersa a la microemulsión o/w fluida generó sistemas tipo gel (estructura bicontinua) permitiendo su aplicación en distintas matrices sin alterar significativamente la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos. Mientras que el agregado de carboximetilcelulosa condujo a sistemas con viscosidades comparables a la microemulsión gel pero con menor velocidad de liberación de bioactivos y con potencial aplicación en sistemas con liberación controlada.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa BASF S.A. por proveer el emulsificante utilizado y la financiación de UNLP, CONICET y ANPCYT. En memoria de la Dra Alicia N. Califano (1951-2019), investigadora (CIDCA-CONICET, Argentina) altamente respetada y compañera a quien extrañamos profundamente.

6. Referencias

- Andreetta H.A. (2003) Fármacos de acción prolongada: mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos. *Latin American Journal of Pharmacy*. 22(4), 355–364.
- Feng, G., Xiong, Y., Wang, H., Yang, Y. (2009). Gelation of microemulsions and release behavior of sodium salicylate from gelled microemulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71, 297-302.
- Feng, JL., Wang, ZW., Zhang, J., Wang, Z-N., Feng, L. Study on food-grade vitamin E microemulsions based on nonionic emulsifiers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 339,1-6.

- Magno, M., Tessendorf, R., Medronho, B., Miguel, M. G., Stubenrauch, C. (2009). Gelled polymerizable microemulsions. Part 3 Rheology. *Soft Matter*, 5, 4763-4772.
- Mori Cortés, N., Califano, A. N., Lorenzo, G. (2019). Physical and chemical stability under environmental stress of microemulsions formulated with fish oil. *Food Research International*, 119, 283-290.
- Park, S. J., Garcia, C.V., Shin, G.H., Kim, J.T. (2017). Development of nanostructured lipid carriers for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Food Chemistry*, 225, 213-219.
- Yang, Y., McClements, D. J. (2013). Vitamin E and Vitamin E acetate solubilization in mixed micelles: Physicochemical basis of bioaccessibility. *Journal of Colloid and Interface Science*, 405, 312-321.