

## 30TCA. DESARROLLO DE SISTEMAS DE ENCAPSULACION COMPUESTOS PARA LA PROTECCION DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES NATURALES

LÓPEZ A.F.\*, DELADINO L.\* Y MARTINO M.N.\*

\*Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Fac. Ciencias Exactas, UNLP, 47 y 116 - 1900 La Plata - Buenos Aires – Argentina – [alexlcordoba@gmail.com](mailto:alexlcordoba@gmail.com)

**Resumen:** El alginato es una de las matrices encapsulantes más usadas, permitiendo la formación de geles estables y biocompatibles. No obstante, debido a la porosidad de las cápsulas de alginato de calcio, la combinación de diversas sustancias puede dar lugar a sinergias importantes que mejoren las características morfológicas de estas. Por lo anterior, en este trabajo, se estudió el efecto de la adición de almidón como material de relleno en cápsulas de alginato, para la encapsulación de un extracto de yerba mate (*Ilex paraguayensis*) con elevado contenido de antioxidantes naturales. Se prepararon formulaciones simples de alginato de calcio y sistemas compuestos donde se adicionó al alginato almidón de maíz en diferentes concentraciones. Se determinaron los porcentajes de eficiencia de carga de los diferentes sistemas de encapsulación, obteniéndose valores de alrededor del 56%, sin encontrarse diferencias significativas según la concentración de almidón empleada. Se analizaron las características morfológicas de los sistemas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), observando la disposición de los gránulos de almidón en el sistema compuesto. Se estudió la digestión *in-vitro* en fluidos simulados y dado que la totalidad de los polifenoles se liberó en el fluido gástrico (HCl 0,1 M), se determinó la cinética de liberación en este medio.

### 1. Introducción

La vehiculización y liberación controlada de compuestos activos alimentarios constituye una alternativa importante en la formulación y desarrollo de alimentos con propiedades funcionales, logrando solucionar problemas que pueden surgir ya sea por inestabilidad física o química del ingrediente activo o por incompatibilidad entre el ingrediente activo y la matriz del alimento, enmascarar sabores desagradables, asegurar la dosis y la biodisponibilidad de un nutriente, y mejorar a su vez la relación costo/beneficio para el fabricante. Las cápsulas de alginato de calcio son fáciles de preparar a escala laboratorio, el proceso es muy sencillo y cualquier compuesto puede ser encapsulado, ya sea hidrofóbico o hidrofílico, sensible a la temperatura, líquido o viscoso, un aceite o un sólido, etc (Champagne and Fustier, 2007; Sébastien, 2004). Algunos de los compuestos activos encapsulados con alginato son células microbianas, fármacos, extractos de antioxidantes naturales, entre otros.(Chan et al., 2011; Das et al., 2011; Deladino et al., 2008).

La yerba mate (*Ilex paraguayensis*), constituye una fuente importante para la extracción de antioxidantes usados como ingredientes alimentarios, ya que poseen múltiples funcionalidades que incluyen su actividad anti radical, anti cancerígena, son reductores de reacciones de estrés oxidativo, antiinflamatorios y cardioprotectores (Dugo et al., 2009; Silva et al., 2011). En algunos trabajos se han logrado altos valores de eficiencia de retención de este tipo de compuesto activo (> 85%), su liberación controlada en matrices alimentarias, extender su vida útil, separarlos de componentes incompatibles y mejorar la calidad final de producto (Deladino et al., 2008; Harris et al., 2011)

Otros autores han utilizado almidón nativo como material de relleno en la elaboración de cápsulas de alginato. Así, lograron mejorar la esfericidad, fluidez, densidad, apariencia y

rigidez de la cápsulas, este efecto se atribuyó a la capacidad del almidón de reforzar la red hidrogel (Chan et al., 2011; Wang et al., 2010).

## 2. Objetivo

El objetivo de este trabajo fue desarrollar sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes naturales, con agregado de diferentes concentraciones de almidón de maíz como material de relleno.

## 3. Materiales y métodos

### 1.1. Extracción y cuantificación de polifenoles de yerba mate

#### 1.1.1. Preparación del extracto de polifenoles de yerba mate

Diferentes cantidades de yerba mate comercial (entre 1 y 10 g), (La Merced, Misiones, Argentina) fueron mezcladas con 100 ml de agua destilada y llevada a ebullición en un baño termostático (Viking, Argentina) durante 40 min. Posteriormente se filtraron para separar la yerba y el líquido obtenido se volvió a filtrar (0,45  $\mu\text{m}$ ).

#### 1.1.2. Determinación del contenido de polifenoles totales (PT) de las diferentes concentraciones de los extractos de yerba mate

El contenido de PT fue determinando, usando el reactivo de Folin- Ciocalteu, midiendo la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu Double Bean Spectrophotometer UV-150-02, Seisakusho Ltd., Kyoto, Japón), tras 30 min de reacción (Schlesier y col., 2002). Se usó como patrón ácido clorogénico (AcCl).

#### 1.1.3. Cálculo del rendimiento de la extracción de PT

El rendimiento de la extracción de PT, se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{Rendimiento} = \left( \frac{m_p}{m_y} \right) * 100 \quad (1)$$

Donde  $m_p$ , corresponde a la masa de PT expresada como mg equivalente de AcCl determinada de acuerdo al inciso 1.1.2. y  $m_y$  a la masa de yerba mate utilizada en la preparación del extracto en gramos.

### 1.2. Encapsulación del extracto de yerba mate

#### 1.2.1. Preparación de cápsulas

Como material encapsulante se utilizó alginato de sodio al 2% m/v (Sigma–Aldrich, USA), el cual fue disuelto en el extracto de yerba obtenido. Se llevó a cabo la gelificación por goteo en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 0,05 M usando una bomba peristáltica Miniplus 3 (Gilson ®, Francia) a 45 rpm. Las cápsulas permanecieron en la solución de cloruro de calcio 15 min, se filtraron y fueron lavadas con solución Buffer acético/Acetato pH 5,5 (Deladino et al., 2008). A estas cápsulas se las denominó *Sistemas simples* (SS). Los *Sistemas compuestos* (SC) se obtuvieron a partir de mezclas de la solución de alginato descrita con almidón de maíz comercial (Maizena®) en diferentes concentraciones (0,1; 0,5; 1; 2, 5 y 10% m/v).

### 1.2.2. Eficiencia de encapsulación (%EE)

La eficiencia de encapsulación (%EE) de las diferentes formulaciones, fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\%EE = \left( \frac{m_c}{m_e} \right) * 100 \quad (2)$$

Donde  $m_c$ , corresponde a la masa de PT liberada en citrato, y  $m_e$ , es la masa de PT presente en el extracto en el cual se originó la formulación. El valor de  $m_c$ , se determinó disolviendo una cantidad conocida de cápsulas en una solución de citrato de sodio (5% m/v) durante 2h, en un Orbit-Environ Shaker (Lab-Line Instruments, USA) a 37 ° C y 125 rpm. La masa de PT en ambos casos fue medida por el método de Folin-Ciocalteu descrito en 1.1.2 y los resultados se expresaron como mg equivalentes de AcCl.

### 1.2.3. Caracterización de las cápsulas

El contenido de humedad de las cápsulas fue determinado por el método gravimétrico, secando en estufa de aire forzado a 65 °C hasta peso constante (Das et al., 2011). Para la medición de  $a_w$  se utilizó un equipo Aqualab Serie 3 TE (USA). La densidad aparente ( $\rho_A$ ), fue calculada como el cociente entre la masa de una cantidad determinada de cápsulas y el volumen ocupado por las mismas (Abdullah and Geldart, 1999).

La forma de los encapsulados fue determinada usando el factor de esfericidad ( $fe$ ), calculado con la siguiente ecuación:

$$fe = \frac{d_{max} - d_{min}}{d_{max} + d_{min}} \quad (3)$$

Donde,  $d_{max}$  corresponde al valor del diámetro más largo y  $d_{min}$  al diámetro perpendicular al mismo, el factor de esfericidad comprende valores desde 0 para esferas perfectas y se aproxima a la unidad para formas elongadas (Chan et al., 2009). Para la determinación del diámetro se tomaron fotografías de al menos 50 cápsulas húmedas, en forma aleatoria en distintos ensayos mediante un estereomicroscopio Leica MZ 10F, con una cámara Leica DFC 490. Las medidas de los diámetros fueron realizadas usando el software analizador de imágenes ImageJ. Las características morfológicas de las micropartículas secas fueron examinadas mediante microscopía electrónica de barrido SEM (FEI, Quanta 200 con fuente: Filamento de Tungsteno EDS marca EDAX, detector: Apollo 40).

### 1.2.4. Digestión in-vitro en fluido gástrico (HCl 0,1 M)

La cinética de liberación de los compuestos polifenólicos, se realizó introduciendo una cantidad conocida de cápsulas en 25 ml de HCL 0,1 M. El ensayo se realizó en un Orbit - Environ Shaker (Lab-Line Instruments, USA) a 37 ° C y 125 rpm. En cada caso, se tomaron alícuotas del sobrenadante en intervalos de tiempo durante 4 horas, determinando el contenido de PT por el Método de Folin-Ciocalteu. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de liberación de los polifenoles del extracto considerando la masa de PT a cada tiempo respecto a la cantidad de compuesto activo total encapsulado.

### 1.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado en el software Sigma Plot versión 11.0. Se realizaron análisis de varianza ANOVA, con un nivel de significancia del 95%.

#### 4. Resultados y discusión

##### 1.4. Comparación de contenido de PT de las diferentes concentraciones de extracto de yerba mate

El contenido de PT fue directamente proporcional a la concentración de yerba mate en el rango utilizado. Al calcular el rendimiento se obtuvieron concentraciones de entre 111-143 mg equiv AcCl/ g yerba, en todos los casos. De acuerdo al análisis de varianza realizado, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de yerba evaluadas ( $p > 0,05$ ). Para la realización de los ensayos posteriores se usó el extracto al 3 %, equivalente a la concentración usada en trabajos previos con extracto de yerba liofilizado (Deladino et al., 2008).

##### 1.5. Obtención de los encapsulados compuestos. Estudio de la relación alginato de sodio: almidón

Se compararon los porcentajes de eficiencia de encapsulación del sistema simple (SS) y los sistemas compuestos (SC) (figura 1). No se observaron diferencias significativas debido al agregado de almidón en las concentraciones utilizadas, determinándose valores de eficiencia de encapsulación promedio del 56%.

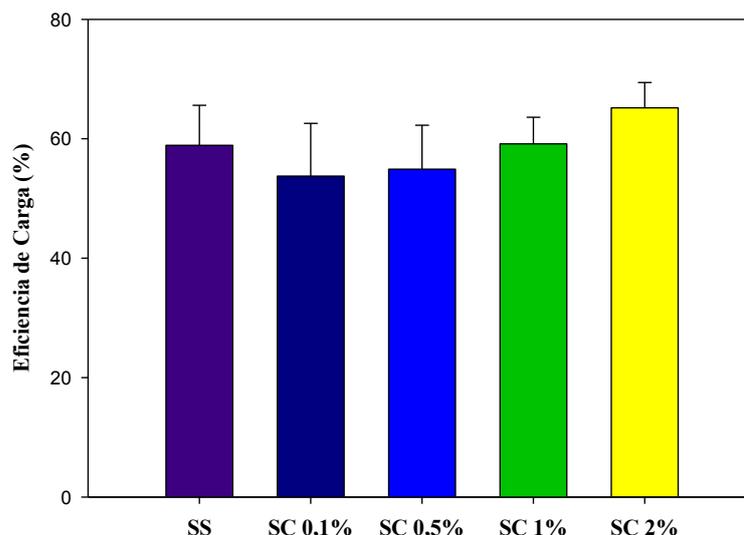


FIGURA 1. Comparación de la eficiencia de carga de los diferentes sistemas de encapsulación.

Los sistemas compuestos adicionados con almidón al 5 y al 10% (datos no mostrados), no presentaron diferencias significativas con las demás concentraciones ensayadas, además resultaron de difícil manipulación debido a la alta viscosidad de las soluciones.

A partir de este ensayo, se seleccionó como sistema compuesto a las cápsulas con 2% de almidón, debido al interés de incorporar a futuro, almidones adicionados con minerales permitiendo así una mayor capacidad de inclusión de un segundo compuesto activo.

##### 2.3. Caracterización de las cápsulas

La figura 2 muestra las fotografías de ambos sistemas de encapsulación. En ellas se evidencia la presencia del almidón con la pérdida de la transparencia característica de las cápsulas de alginato de calcio.



FIGURA 2. Fotografías de un corte transversal de cápsulas húmedas.

En las micrografías SEM se observó que las cápsulas perdieron cierta esfericidad luego del secado, dicho efecto fue más marcado en el SS (Figura 3a). En el caso de los SC la disposición uniforme del almidón en la matriz encapsulante, constituye un refuerzo que permite mayor conservación de la forma durante el secado (Figura 3b).

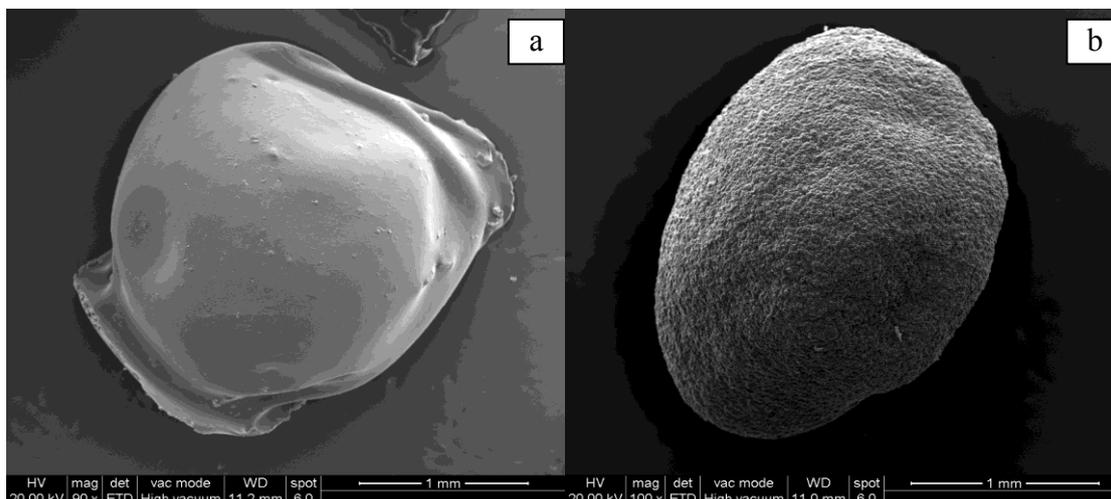


FIGURA 3. Fotografías SEM de cápsulas secas a) Sistemas simples y b) Sistemas compuestos.

Con respecto a las características físicas de los encapsulados, en la mayoría de los parámetros se observaron valores similares para ambos sistemas (Tabla 1).

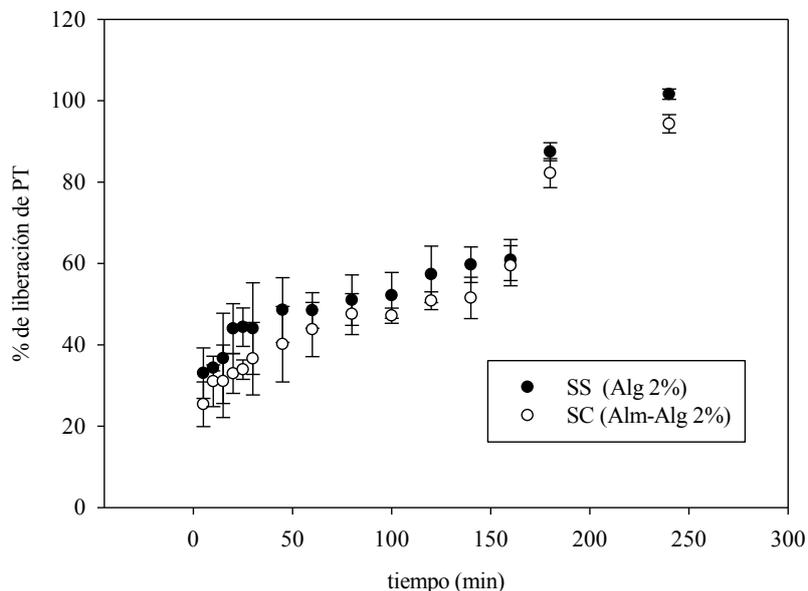
TABLA 1. Caracterización de sistemas encapsulados

Formulación	$d_{max}$ (mm)	fe	$\rho_A$ (g/cm <sup>3</sup> )	$a_w$	Humedad (%)
SS	3,70±0,29	0,01±0,09	0,78±0,03	0,98±0,00	96,66±0,13
SC	3,70±0,12	0,01±0,01	0,79±0,03	0,98±0,01	94,81±0,11

Chang et al., 2009, analizaron la influencia de las condiciones de operación sobre las características morfológicas de las cápsulas. Estos autores hallaron que los sistemas se pueden considerar esféricos para valores de  $f_e$  menores que 0,05; por lo tanto las cápsulas obtenidas en el presente estudio correspondieron a un alto grado de esfericidad.

### 2.3. Liberación del extracto en fluido gástrico simulado. Cinéticas de liberación

Se analizó la cinética de liberación de los PT en el tiempo, para las formulaciones elegidas: sistema simple (SS) y sistema compuesto con 2% de almidón (SC 2%), (figura 4). La totalidad de los polifenoles se liberaron en un período de 4 horas de inmersión en fluido gástrico simulado.



**FIGURA 4.** Cinéticas de liberación en fluido gástrico simulado para sistemas simples y compuestos.

En los primeros tiempos de la cinética (0-20 min) la velocidad de liberación fue rápida, alcanzando un 45% del total de los PT. Luego, entre los 20-160 min la difusión fue progresiva y finalmente se produjo un aumento significativo en el porcentaje de polifenoles en el medio alcanzando liberación de la masa total a los 240 min (figura 4).

No se hallaron diferencias significativas entre los perfiles de liberación para las dos formulaciones evaluadas. El agregado de almidón a la matriz de encapsulación, a estas concentraciones, permitiría la inclusión de un segundo compuesto activo sin modificar el perfil de liberación del compuesto activo contenido en las cápsulas de alginato de calcio. Así, se podría pensar en la utilización de capsulas compuestas para el transporte de distintos sistemas activos en el desarrollo de formulaciones de alimentos funcionales. (Chan et al., 2011; Deladino et al., 2008; Harris et al., 2011).

## 5. Conclusiones

Se obtuvieron cápsulas esféricas de alginato de calcio a partir de un extracto acuoso de yerba mate con alto contenido de polifenoles. Se lograron eficiencias de 56% de polifenoles totales tanto en cápsulas de alginato de calcio como en las que contenían hasta 2% de almidón adicionado. Fue posible obtener un sistema encapsulante compuesto, adicionando 2% de almidón sin modificar el perfil de liberación respecto al sistema control.

## 6. Bibliografía

- Abdullah, E.C., Geldart, D. 1999. The use of bulk density measurements as flowability indicators. *Powder Technology*. 102, 151-165.
- Champagne, C.P., Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 18, 184-190.
- Chan, E.-S., Lee, B.-B., Ravindra, P., Poncelet, D. 2009. Prediction models for shape and size of calcium-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 338, 63-72.
- Chan, E.-S., Wong, S.-L., Lee, P.-P., Lee, J.-S., Ti, T.B., Zhang, Z., Poncelet, D., Ravindra, P., Phan, S.-H., Yim, Z.-H. 2011. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*. 83, 225-232.
- Das, S., Chaudhury, A., Ng, K.-Y. 2011. Preparation and evaluation of zinc-pectin-chitosan composite particles for drug delivery to the colon: Role of chitosan in modifying in vitro and in vivo drug release. *International Journal of Pharmaceutics*. 406, 11-20.
- Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A.S., Martino, M.N. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*. 71, 126-134.
- Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Jacques, R.A., Caramao, E.B., Mondello, L. 2009. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. *Journal of Chromatography A*. 1216, 7213-7221.
- Harris, R., Lecumberri, E., Mateos-Aparicio, I., Meng bar, M., Heras, A. 2011. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*. 84, 803-806.
- Sébastien, G. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*. 15, 330-347.
- Silva, R.D.A., Bueno, A.L.S., Gallon, C.W., Gomes, L.F., Kaiser, S., Pavei, C., Ortega, G.G.I., Kucharski, L.C., Jahn, M.P. 2011. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. *Fitoterapia*. 82, 818-826.
- Wang, Q., Hu, X., Du, Y., Kennedy, J.F. 2010. Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydrate Polymers*. 82, 842-847.