



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DESARROLLO DE SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN COMPUESTOS  
PARA LA PROTECCIÓN DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES DE  
YERBA MATE**

**Ing. Alim. ALEX FERNANDO LÓPEZ CÓRDOBA**

Trabajo de tesis presentado para optar al grado académico de  
Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos

Directora: Dra. MIRIAM N. MARTINO

Codirectora: Dra. LORENA DELADINO

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)  
La Plata, Buenos Aires

2012

***Dedicatoria***  
*A Dios y a mi Madre*

## AGRADECIMIENTOS

La ejecución de este trabajo de tesis no hubiera sido posible sin la contribución de muchas personas, que en mayor o menor grado, de cerca o de lejos, en forma permanente u ocasional, me apoyaron igual.

Quiero agradecer especialmente, a las Dras. Miriam y Lorena, por permitirme conformar su equipo de trabajo y por brindarme apoyo incondicional y constante. Por los consejos, el compromiso, la confianza y las libertades para el desarrollo de las actividades.

A mi familia por su amor y sus esfuerzos, y por depositar su confianza en mis proyectos. Al primo Esau por su colaboración y disposición. A Caro, por compartir mis alegrías y mis tristezas y por soñar junto a mí.

Al Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el financiamiento otorgado.

Al CIDCA por facilitarme las instalaciones para el desarrollo de las actividades y al equipo de investigadores, becarios y técnicos por sus contribuciones.

A Majito, Nati Q, Leo, Martin, Silvana, Sandra R, Marina DS, Ceci Dini, Ceci Doporto, Cintia y Estela B; por las charlas, los chistes, los consejos, los mates, los materiales prestados, etc.

A cada persona que sin ser mencionada, se siente aludida igual...Gracias!!!

## *Índice*

---

<b>Índice de figuras</b> .....	6
<b>Índice de tablas</b> .....	9
<b>Resumen</b> .....	10
<b>Capítulo I. Introducción</b> .....	12
1.1. Objetivos generales .....	15
1.2. Objetivos específicos.....	15
<b>Capítulo II. Estado del arte</b> .....	16
2.1. Alimentos funcionales.....	16
2.2. Encapsulación .....	20
2.2.1. Técnicas de encapsulación.....	23
2.2.2. Encapsulación de compuestos con actividad funcional.....	24
<b>Capítulo III. Obtención y caracterización del extracto</b> .....	28
3.1. Yerba mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) .....	29
3.1.1. Actividad antioxidante de la yerba mate.....	31
3.1.2. Métodos de determinación de la capacidad antioxidante .....	34
3.2. Materiales y métodos.....	36
3.2.1. Preparación del extracto de yerba mate .....	36
3.2.2. Determinación del contenido de polifenoles totales (PT) del extracto de yerba mate.....	36
3.2.2.1. Método de Folin-Ciocalteu (FC) .....	36
3.2.2.2. Espectrofotometría UV.....	38
3.2.3. Cálculo del rendimiento de la extracción de PT .....	38
3.2.4. Composición de polifenoles del extracto de yerba mate mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	39
3.2.5. Actividad antioxidante frente al radical DPPH•.....	40
3.2.6. Análisis estadístico .....	40
3.3. Resultados .....	41
3.3.1. Obtención del extracto líquido. Optimización de las condiciones de extracción. ....	41
3.3.2. Composición de polifenoles del extracto de yerba mate por HPLC.....	45
3.3.3. Actividad antioxidante al radical DPPH•.....	49
3.4. Conclusiones parciales.....	52

<b>Capítulo IV. Preparación y caracterización de las cápsulas</b> .....	54
4.1. Sistemas de encapsulación .....	55
4.1.1. Materiales encapsulantes .....	55
4.1.1.1. Alginato.....	56
4.1.1.2. Almidón.....	58
4.1.2. Obtención de sistemas de encapsulación por gelificación iónica .....	60
4.1.3. Caracterización de los encapsulados .....	61
4.1.3.1. Técnicas microscópicas .....	62
4.1.3.2. Análisis térmico.....	63
4.1.3.3. Porosimetría por Intrusión de Mercurio (PIM).....	64
4.2. Materiales y métodos.....	65
4.2.1. Preparación de cápsulas .....	65
4.2.2. Secado de las cápsulas.....	66
4.2.3. Determinación de las propiedades fisicoquímicas .....	66
4.2.4. Determinación del tamaño y la forma de las cápsulas .....	67
4.2.5. Cálculo de la eficiencia de encapsulación (%EE) .....	67
4.2.6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	68
4.2.7. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) .....	68
4.2.8. Análisis térmico: Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	69
4.2.9. Determinación de porosidad mediante PIM .....	69
4.3. Resultados .....	71
4.3.1. Obtención de cápsulas .....	71
4.3.2. Análisis SEM .....	75
4.3.3. Análisis FT-IR.....	78
4.3.4. Análisis térmico (DSC).....	80
4.3.5. Porosimetría por intrusión de mercurio .....	83
4.4. Conclusiones parciales .....	88
<b>Capítulo V. Cinética y mecanismos de liberación del extracto de yerba mate</b> .....	89
5.1. Liberación del compuesto activo.....	90
5.1.1. Liberación por difusión.....	91
5.1.2. Liberación por degradación o erosión.....	92
5.1.3. Liberación por hinchamiento.....	94

5.2.	Materiales y métodos.....	96
5.2.1.	Liberación de polifenoles en fluidos digestivos simulados.....	96
5.2.2.	Estudio de los mecanismos de hinchamiento y erosión de los encapsulados en FGS .....	97
5.2.3.	Aplicación de modelos matemáticos.....	98
5.3.	Resultados .....	100
5.3.1.	Liberación del extracto en fluido gástrico simulado. Cinéticas de liberación. ....	100
5.3.2.	Estudio de los mecanismos de erosión e hinchamiento.....	104
5.3.3.	Aplicación de modelos matemáticos.....	111
5.4.	Conclusiones Parciales .....	118
<b>Capítulo VI. Obtención de sistemas compartimentalizados .....</b>		<b>119</b>
6.1.	Sistemas de encapsulación compartimentalizados.....	120
6.2.	Materiales y métodos.....	122
6.2.1.	Obtención de almidones cargados con zinc.....	122
6.2.1.1.	Cuantificación de la masa de zinc .....	123
6.2.1.2.	Análisis por microscopía SEM-EDX .....	123
6.2.2.	Efecto del agregado de zinc sobre la capacidad antioxidante (DPPH*) del extracto de yerba mate .....	124
6.2.3.	Obtención de los sistemas de encapsulación compartimentalizados de extracto de yerba mate y zinc .....	124
6.2.4.	Determinación del contenido de zinc y de polifenoles totales (PT) en el sistema compartimentalizado.....	124
6.2.5.	Análisis de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).....	125
6.3.	Resultados .....	126
6.3.1.	Caracterización de los almidones cargados con zinc.....	126
6.3.2.	Efecto del agregado de almidón cargado con zinc en la capacidad antioxidante del extracto de yerba mate .....	128
6.3.3.	Sistema compartimentalizado.....	130
6.3.4.	Efecto del zinc en sistemas de almidón y compartimentalizados mediante análisis FT-IR .....	133
6.4.	Conclusiones parciales.....	137
Capítulo VIII. Conclusiones.....		138
Bibliografía.....		140

## Índice de figuras

Figura 2.1. Crecimiento anual de publicaciones en encapsulación.....	20
Figura 2.2. Representación esquemática de los diferentes sistemas de encapsulación .....	22
Figura 2.3. Ingredientes funcionales de mayor importancia .....	25
Figura 3.1. Mecanismo de acción antioxidante de compuestos fenólicos .....	33
Figura 3.2. Curva de calibración para el método de Folin-Ciocalteu .....	42
Figura 3.3. Curva de calibración para el método de espectrofotometría UV ....	42
Figura 3.4. Comparación de las concentraciones de PT determinadas por el método de FC y espectroscopía UV.....	43
Figura 3.5. Correlación entre las concentraciones de PT determinadas por espectroscopía UV y el reactivo de FC. ....	44
Figura 3.6. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC del extracto acuoso de yerba mate .....	46
Figura 3.7. Estructuras químicas de algunos compuestos identificados en extracto de yerba mate:.....	47
Figura.3.8. Porcentaje de inhibición del DPPH• vs. las concentraciones de extracto evaluadas .....	49
Figura 4.1. Estructura del polímero de alginato.....	56
Figura 4.2. Modelo de “caja de huevo” de alginato de calcio .....	57
Figura 4.3. Estructura molecular del almidón .....	59
Figura 4.4. Esquema de obtención de cápsulas de alginato por gelificación iónica.....	61
Figura 4.5. Montaje empleado en la obtención de cápsulas por gelificación iónica.....	65
Figura 4.6. Efecto del contenido de almidón sobre la eficiencia de encapsulación en sistema simple (SS) y compuestos (SC) .....	71
Figura 4.7. Fotografías de los sistemas encapsulados .....	73



Figura 4.8. Cápsula SC teñida con solución de I <sub>2</sub> -IK: a) interior y b) exterior...	73
Figura 4.9. Fotografías SEM de SS:.....	76
Figura 4.10. Fotografías SEM de SC .....	77
Figura 4.11. Espectros IR de extracto liofilizado de yerba mate (Curva A), alginato de sodio (Curva B), cápsulas SS sin y con extracto de yerba mate (Curva C y D), almidón de maíz nativo (Curva E) y cápsulas SC con extracto de yerba mate (Curva F). .....	79
Figura 4.12 Termogramas DSC .....	81
Figura 4.13. Temperaturas de transición vítrea para SS y SC con extracto acuoso de yerba mate.....	83
Figura 4.14. Distribución de tamaños de poro para SS y SC .....	84
Figura 4.15. Curva de intrusión – extrusión de las cápsulas SS .....	85
Figura 4.16. Curva intrusión – extrusión de las cápsulas SC .....	85
Figura 4.17 Clases de comportamientos de curvas de intrusión-extrusión .....	87
Figura 5.1. Esquema de mecanismos de degradación/erosión en cápsulas....	93
Figura 5.2. Esquema del mecanismo de liberación por hinchamiento .....	94
Figura 5.3. Perfiles de liberación en FGS para cápsulas húmedas.....	100
Figura 5.4. Perfiles de liberación en FGS para cápsulas secas .....	102
Figura 5.5. Representación esquemática de la tortuosidad del sistema compuesto.....	103
Figura 5.6. Seguimiento fotográfico durante la liberación del compuesto activo en FGS para cápsulas húmedas .....	105
Figura 5.7. Cinética de erosión en sistemas húmedos.....	106
Figura 5.8. Imágenes de cápsulas secas hinchadas (t=240 min).....	107
Figura 5.9. Cinética de hinchamiento en sistemas secos.....	108
Figura 5.10. Grafico $t/W_t$ versus t para cápsulas secas.....	110
Figura 5.11. Parámetros del modelo de Kopcha para el SS .....	114
Figura 5.12. Parámetros del modelo de Kopcha para el SC .....	115

Figura 6.1. Micrografías SEM-EDX .....	126
Figura 6.2. Cantidad de Zn adsorbida en el almidón en relación a la cantidad empleada en la formulación .....	127
Figura 6.3. Capacidad antioxidante de suspensiones de almidón cargado con Zn en extracto acuoso de yerba mate .....	129
Figura 6.4. Contenido de PT en las cápsulas sin y con agregado de zinc. Letras diferentes sobre las barras corresponden a muestras con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).....	132
Figura 6.5. Espectros IR de almidones cargados con diferentes concentraciones de zinc.....	134
Figura 6.6. Espectros IR de cápsulas compartimentalizadas (A) y cápsulas control (sin adición de zinc) (B). .....	135

## Índice de tablas

Tabla 2.1. Alimentos funcionales disponibles en Argentina con detalle de componentes funcionales, marca y empresa elaboradora .....	19
Tabla 2.2. Clasificación de las técnicas de encapsulación .....	23
Tabla 2.3. Ejemplos de encapsulación de compuestos antioxidantes.....	26
Tabla 3.1. Compuestos identificados en yerba mate y algunas de sus actividades biológicas .....	31
Tabla 3.2. Concentraciones de compuestos fenólicos en extracto acuoso de yerba mate cuantificados mediante HPLC .....	48
Tabla 4.1. Técnicas empleadas en la caracterización de encapsulados .....	62
Tabla 4.2. Caracterización de sistemas encapsulados húmedos.....	74
Tabla 5.1. Parámetros obtenidos para la ecuación de Schott .....	110
Tabla 5.2. Parámetros cinéticos obtenidos para cápsulas húmedas.....	112
Tabla 5.3. Parámetros cinéticos obtenidos para cápsulas secas .....	116
Tabla 6.1. Formulaciones de las mezclas de almidón- zinc .....	122

## RESUMEN

En este trabajo de tesis se desarrolló un sistema de encapsulación compuesto para la vehiculización de extracto de yerba mate y zinc, simultáneamente. Se obtuvo un extracto acuoso de yerba mate con alto contenido de compuestos fenólicos y una elevada actividad antioxidante frente al radical DPPH•. Este se encapsuló en matrices de alginato de calcio adicionadas de almidón en distintas concentraciones. La incorporación de almidón de maíz al 2% resultó la más adecuada, aumentando la eficiencia de carga, conservando las características morfológicas luego del secado y disminuyendo la porosidad del sistema. Además el empleo de dicha concentración de almidón, moduló la velocidad de liberación de los polifenoles en fluido gástrico simulado, principalmente en cápsulas secas.

La obtención del sistema de encapsulación compuesto se realizó partiendo de la formulación óptima de almidón-alginato de calcio al 2% p/v. Se analizó y se seleccionó la concentración más adecuada de zinc a vehiculizar en el almidón. Fue posible obtener cápsulas conteniendo extracto de yerba mate y zinc simultáneamente, al emplear el almidón cargado con bajas dosis del mineral. En estos sistemas no se afectaron las propiedades individuales de cada compuesto activo manteniendo su funcionalidad, ni sus características morfológicas.

Los sistemas de encapsulación obtenidos en este estudio constituyen una alternativa efectiva para la protección de compuestos activos de interés para la salud, aportando distintas funcionalidades complementarias entre si.

**Palabras claves:** antioxidantes naturales, compartimentalización, encapsulación, *Ilex paraguariensis*, zinc.

## *Capítulo I. Introducción*

---

La evolución de la humanidad ha generado cambios en el estilo de vida y en sus hábitos alimentarios y de consumo. Actualmente la elección racional de alimentos se basa no sólo en satisfacer el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios, sino también en prevenir las enfermedades relacionadas con la nutrición y mejorar el bienestar físico y mental.

Los alimentos denominados funcionales constituyen un mercado en alza, siendo uno de los segmentos con mayor crecimiento en los últimos años (Falguera, y col., 2012). Una de las áreas de mayor interés en el desarrollo de estos alimentos, se fundamenta en la posibilidad de modular los sistemas redox y antioxidante del organismo, ya que dichos factores han sido implicados en el desarrollo de numerosas enfermedades crónicas y en el proceso de envejecimiento (Betoret, y col., 2010; Wootton-Beard, y col., 2011).

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*), es considerada una fuente rica de antioxidantes. Esta planta ha sido estudiada encontrando una gran variedad de compuestos que aportan beneficios para la salud, lo que hace a la yerba mate un material ideal para la extracción de compuestos activos y su posterior aplicación como ingrediente funcional (Deladino, y col., 2008; Filip, y col., 2001; Silva, y col., 2011).

Por su parte, el zinc es un oligoelemento que tiene un papel importante en el funcionamiento adecuado del sistema inmunológico, la piel, el crecimiento y la reproducción humana. Además interviene en el metabolismo, como componente de metaloenzimas. La deficiencia de zinc ha sido reconocida tanto en países industrializados como en países en desarrollo. Por lo tanto, la búsqueda de vehiculizadores de este mineral constituye un objetivo importante

para suplir los requerimientos nutricionales de la población en riesgo (Salgueiro, y col., 2000; Tapiero, y col., 2003).

El desarrollo de ingredientes multifuncionales que puedan dar lugar a distintos efectos fisiológicos beneficiosos para el organismo humano, representa un desafío importante para dar respuesta a las expectativas de consumidores con necesidades específicas. Por lo anterior, en el presente trabajo se propone desarrollar sistemas de encapsulación para la vehiculización de extractos antioxidantes naturales y minerales de interés nutricional simultáneamente; en matrices de alginato de calcio y almidón-alginato de calcio. El agregado de almidón de maíz tiene como finalidad: reforzar la matriz de alginato, modular la liberación de los compuestos activos y el transporte de minerales.



## 1.1. OBJETIVOS GENERALES

- Desarrollar sistemas de encapsulación de antioxidantes naturales (extracto de yerba mate) y de minerales (zinc) para protegerlos de posibles interacciones con el medio circundante.
- Lograr sistemas de encapsulación compartimentalizados para contener antioxidantes y minerales al mismo tiempo.
- Optimizar la estrategia de liberación de los compuestos activos por el empleo de distintos agentes encapsulantes.

## 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 1.2.1. Encapsulación de extractos antioxidantes de yerba mate

- Optimizar la carga de compuesto activo en la matriz de encapsulación.
- Optimizar la relación entre los constituyentes del sistema de encapsulación: almidón: alginato, para maximizar el contenido de compuesto activo.
- Modificar la velocidad de liberación controlando la formulación de la matriz.

### 1.2.2. Encapsulación de extractos antioxidantes y minerales simultáneamente

- Seleccionar las combinaciones de compuestos activos y agentes encapsulantes que permitan obtener la máxima eficiencia del sistema compuesto.
- Evaluar el comportamiento de los compuestos activos en los sistemas compartimentalizados.

## *Capítulo II. Estado del arte*

---

## 2.1. Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos que además de aportar los nutrientes básicos, otorgan beneficios adicionales en una o más funciones del organismo humano. En estos alimentos las propiedades saludables atribuidas deberán ser comprobadas científicamente y consensuadas por expertos (Betoret, y col., 2010; Szakály, y col., 2012).

Un alimento puede convertirse en funcional siguiendo alguna de las siguientes estrategias o sus combinaciones (Olagnero, y col., 2007; Roberfroid, 2002):

1. Eliminando componentes perjudiciales presentes en el alimento (Ejemplo: alérgenos).
2. Incrementando la concentración de un componente presente de forma natural en el alimento hasta alcanzar niveles en que pueda inducir los beneficios esperados (Ejemplo: fortificación con micronutrientes) o incrementando la concentración de una sustancia no nutritiva hasta niveles en que se conoce su efecto beneficioso.
3. Añadiendo un componente que no está presente de forma natural en el alimento y que no es necesariamente un macronutriente o un micronutriente, pero cuyos efectos beneficiosos son reconocidos (Ejemplo: prebióticos, antioxidantes no vitamínicos).
4. Sustituyendo un componente, generalmente un macronutriente (Ej. grasas), cuyo consumo excesivo tenga efectos perjudiciales por un componente de reconocido efecto beneficioso (Ejemplo: inulina).

5. Incrementando la biodisponibilidad o estabilidad de un componente que se sepa que es capaz de producir un efecto funcional o reducir un potencial riesgo de enfermedad del propio alimento.

El mercado mundial de alimentos y bebidas funcionales, ha tenido un crecimiento importante en los últimos años proyectando para el año 2013 cifras del orden de los US\$ 90,5 billones (Datamonitor, 2008; JustFood, 2008). Al parecer las empresas de alimentos tienen hoy múltiples expectativas ante la oportunidad de desarrollar alimentos con características específicas para nichos de mercados exigentes y dispuestos a pagar un poco más por alimentos diferentes a los convencionales (Falguera, y col., 2012; Szakály, y col., 2012). No obstante, a nivel global no se cuenta aún con una legislación armonizada sobre estos alimentos, siendo los lineamientos referentes a su producción, comercialización y distribución establecidos por cada país (Cóccaro, 2010; Olagnero, y col., 2007)

En Argentina, los alimentos funcionales toman cada vez más importancia encontrándose una gran variedad de estos productos en el mercado (Tabla 2.1) (Millone, y col., 2011). Sin embargo, se requiere del establecimiento de normativas y del desarrollo de investigaciones científicas que favorezcan el crecimiento de esta industria.

Tabla 2.1. Alimentos funcionales disponibles en Argentina con detalle de componentes funcionales, marca y empresa elaboradora

Producto funcional	Componente funcional	Marca	Empresa
LS Fe, Leche fortificada con hierro y calcio	Hierro, calcio, vitamina C	La Serenísima®	MHSA
Leche con fitoesteroles y omega 3, fortificada con calcio	Fitoesteroles, omega3, calcio	Serecol®	MHSA
Leche reducida en lactosa, fortificada con calcio	Reducción del 80% en contenido de lactosa, calcio.	La Serenísima Deslactosada®	MHSA
Leche con fibra en polvo	Oligosacárido, Vitamina A, D, C, E, B9, Calcio, Hierro, sin grasa	Svelty Actifibras® Svelty Calcio Plus®	Nestlé
Leche en polvo con fibra	Prebióticos	Nido Crecimiento®	Nestlé
Leche con fibra 0%	Inulina	Sancor Bio Balance®	Sancor
Leche con Fibra Activa	Prebióticos	Ser®	MHSA
Yogur simbiótico	<i>B lactis</i> DN173010 e inulina	Activia®	LS-Danone
Yogur con probióticos	<i>L casei</i> - <i>B lactis</i>	Yogurísimo®	LS-Danone
Yogur con probióticos	Probióticos, vitaminas A, D, E, B9	Sancor®	Sancor
Yogur dietético fortificado con B-puritas	<i>L casei</i> , <i>B lactis</i> , vitaminas A, B9, D y E	Ser®	LS-Danone
Leche fermentada	<i>L casei</i> , <i>L acidophilus</i> y oligofructosa (F.O.S) , inulina	BioSancor®	Sancor
Leche fermentada	<i>L casei</i> Shirota	Yakult®	Yakult
Leche fermentada	<i>L casei</i> Defensis	Actimel®	LS-Danone
Leche fermentada	Fitoesteroles	Vidacol®	LS-Danone
Leche fermentada	Cultivos ( <i>L casei</i> y <i>L acidophilus</i> )	Sancor®	Sancor
Alimento lácteo fortificado	Hierro, zinc, Vit A, D, B9, probióticos	Danonino®	LS-Danone
Bio queso	Probióticos	Ilolay Vita®	Williner
Margarina para untar	Fitoesteroles	Danicol	Flora Dánica
Fideos dietéticos de sémola con vegetales fortificados	Vitaminas y minerales	Lucchetti / Matarazzo	Molinos-Río de la Plata
Spaghetti Favorita <sup>2</sup>	Vitaminas y minerales	Lucchetti / Matarazzo	Molinos Río de la Plata
Galletitas con avena y pasas <sup>2</sup>	Vitaminas, minerales, avena y omega 9	Frutigran	Granix
Biscochitos <sup>2</sup>	Vitaminas y minerales, omega 9	Biscochitos Granix	Granix
Galletitas de agua reducida en grasas <sup>2</sup>	Vitaminas y minerales, omega 9	Express Light	Kraft Foods
Galletitas de agua blancas con fibra <sup>2</sup>	Vitaminas y minerales, inulina y omega 9	Express fibras blancas	Kraft Foods
Buñuelos / ñoquis y pizza / harina con levadura Pureza -harina integral <sup>2</sup>	Vitaminas y minerales	Pureza	Molino Cañuelas
Polenta con fibra	Salvado	Presto Pronta con fibra	Arcor
Pan con semillas y omegas	Semillas lino, girasol, amapola / avena / omega 6 y 9	Oroweat semillas Bimbo	Bimbo
Pan de salvado fortificado	Hierro, vitaminas, 7 cereales (avena, trigo, sésamo, maíz, centeno, girasol, cebada)	Pan Light 7 granos	Bimbo
Pan salvado	Fitoesteroles, omega 9, salvado de trigo	Salvado doble con fitoesteroles	Fargo
Pan rayado y rebozadores	Fortificados con hierro	Favorita Nutrihierro	Molinos Río
Avena Arrollada	Fibra soluble	Granix	Granix
Cereales para desayuno fortificados	Vitaminas E, B1, B3, B6, B9 y B12	Azucopos Granix	Granix
Cereal para desayuno	Vitaminas C, B1, B2, B3, B6, B9, B12, ác. pantoténico, hierro, zinc, calcio y fósforo	Cereal Fitness	Nestlé
Alimento para lactantes	Prebio 1: oligofructosa e inulina	Nestum	Nestlé
Postre en polvo	Vitamina A, E y D, zinc	Exquisita	Molinos Río de la Plata
Flan en polvo	Vitamina A, E y D, zinc	Exquisita	Molinos Río de la Plata
Barras de cereal	Avena, omega 9	Cerealitas	Kraft Foods
Barras de cereal	Omega 9, salvado	Fritugran	Granix
Postre / Flan	Vitaminas A, D, E, B2, B9, B12, calcio y fósforo	Ser Tentación	LS-Danone
Helado	Calcio	Luxor Bombón	Nestlé
Chicles sin azúcar	Azúcares alcoholes: sorbitol, manitol, xilitol	Beldent	Cadbury
Huevos	Omega 3	Cormillot	Cabaña Avícola Jorju
Bebida dietética con vitaminas y minerales	Vitamina E y potasio	Dasani	Coca- Cola
Bebida de soja fortificado	Vitamina C, B1, B2, B3, B6, B12 Y B9, calcio, hierro y zinc	Ades	Unilever
Jugo	Calcio y Vitamina D	Cepita	Coca-Cola
Jugo	Vitamina B5, B9, B12	Ivess- Cormillot	Ivess
Jugo en polvo fortificado	Vitamina C	Verao / Tang	Kraft Foods

Fuente: Millone y col. (2011).

## 2.2. Encapsulación

La encapsulación es una de las técnicas más usadas en el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceúticos. Esta tecnología ha tenido un crecimiento importante aumentando cada vez el número de patentes y la publicación de artículos científicos, derivados de la investigación básica y aplicada (Fig. 2.1.) (Boh, y col., 2008; Gouin, 2004).

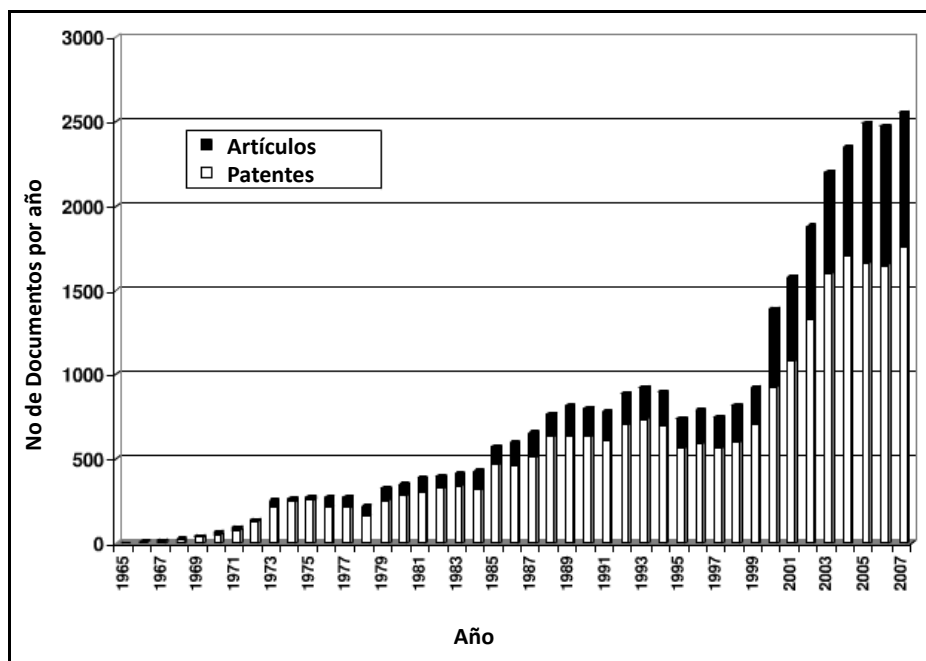


Figura 2.1. Crecimiento anual de publicaciones en encapsulación. Fuente: Boh y col. (2008).

La encapsulación ha sido definida como la tecnología mediante la cual se logra confinar compuestos activos dentro de una matriz polimérica. Esta técnica crea un microambiente en la cápsula capaz de controlar las interacciones entre el interior y el exterior (Borgogna, y col., 2010). Algunos de los propósitos de

aplicar una técnica de encapsulación en la industria de alimentos son (Champagne, y col., 2007; Onwulata, 2012):

- Proteger el compuesto activo de la degradación producida por el ambiente (calor, aire, luz, humedad, etc.)
- Liberación controlada del compuesto activo desde la matriz encapsulante bajo condiciones específicas (pH, temperatura, etc.).
- Modificar las características físicas del material original y hacer más fácil su manipuleo. Por ejemplo, reducir la higroscopicidad, modificar su densidad, distribuir el material uniformemente en una muestra, convertir materiales líquidos en polvo, entre otros.
- Enmascarar sabores desagradables.
- Separar componentes con el fin de que éstos no reaccionen.

Se pueden obtener diversos tipos de microcápsulas, aglomerados o cápsulas dependiendo de los ingredientes y del procedimiento de obtención (Deladino, y col., 2007b). La Fig. 2.2 muestra una representación esquemática de los sistemas más comunes. Los reservorios o sistemas núcleo-capa externa consisten en un interior constituido por el material activo y un recubrimiento denominado material de cubierta, pared, barrera, o encapsulante el cual puede estar formado por una o varias capas concéntricas (Fig. 2.2a). La velocidad de

liberación de estos sistemas depende del grosor, el área y la permeabilidad de la barrera.

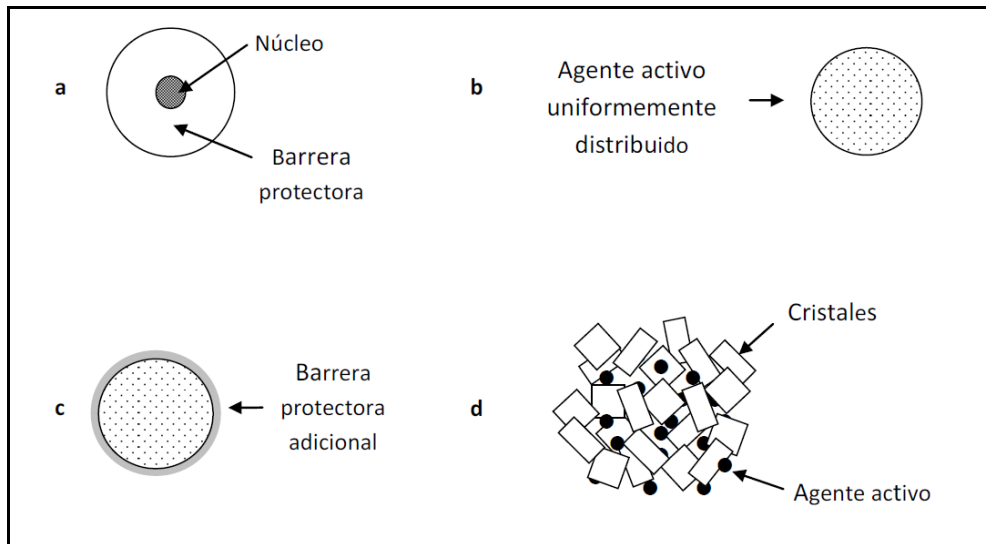


Figura 2.2. Representación esquemática de los diferentes sistemas de encapsulación: a) reservorio, b) matriz inclusiva, c) mixto y d) aglomerados. Fuente: Deladino y col. (2007b)

El sistema matriz inclusiva consiste en una mezcla homogénea del ingrediente activo y el material encapsulante (Fig. 2.2b). Parte del compuesto activo se encontraría en la superficie de la cápsula desprotegido. La liberación en estos sistemas depende del tipo del material de la matriz, la forma de la cápsula y la cantidad de compuesto activo.

Numerosos métodos permiten obtener sistemas mixtos adicionando una capa extra sobre los sistemas antes mencionados para aumentar la protección del agente activo o retardar su liberación (Fig. 2.2c).



Los aglomerados ofrecen una amplia área superficial para contener compuestos activos, facilitar el manipuleo y mejorar su aptitud frente al almacenamiento (Fig. 2.2d).

### 2.2.1. Técnicas de encapsulación

Las técnicas de encapsulación han sido utilizadas para la protección de una gran variedad de ingredientes en la industria de alimentos. Existen diversos métodos para la producción de encapsulados los cuales pueden ser clasificados en dos grupos: métodos físicos y físico-químicos (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Clasificación de las técnicas de encapsulación

Métodos Físicos	Métodos Físico-químicos
Secado en spray	Liposomas
Enfriamiento por spray	Coacervación
Recubrimiento por lecho fluidizado	Gelación iónica
Extrusión	Complejos de inclusión
Co-cristalización	

Fuente: Deladino y col. (2007b).

Actualmente los procesos más empleados en la industria de alimentos son el secado por atomización y la extrusión, principalmente, debido al costo accesible y la producción en serie de encapsulados por medio de estos mecanismos (Deladino, y col., 2007b; Gouin, 2004).

La selección del proceso de encapsulación adecuado dependerá de múltiples factores, tales como: el tamaño partícula requerido, las propiedades fisicoquímicas del material encapsulante y el compuesto activo, la finalidad del producto encapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (Munin, y col., 2011; Onwulata, 2011).

#### 2.2.2. Encapsulación de compuestos con actividad funcional

El aumento en la demanda de alimentos saludables ha provocado el desarrollo de nuevos aditivos e ingredientes alimentarios. Sin embargo, el reto es asegurar que estos ingredientes permanezcan efectivos durante la elaboración y el almacenamiento del producto (Onwulata, 2011).

Los alimentos pueden ser utilizados como un vehículo eficaz para la entrega de compuestos bioactivos y micronutrientes en los niveles adecuados. Dentro de los ingredientes funcionales de mayor importancia utilizados en la preparación de alimentos se encuentran los antioxidantes, ingredientes orgánicos, ácidos grasos Omega-3, fibra, minerales, probióticos, entre otros (Fig. 2.3) (Day, y col., 2009).

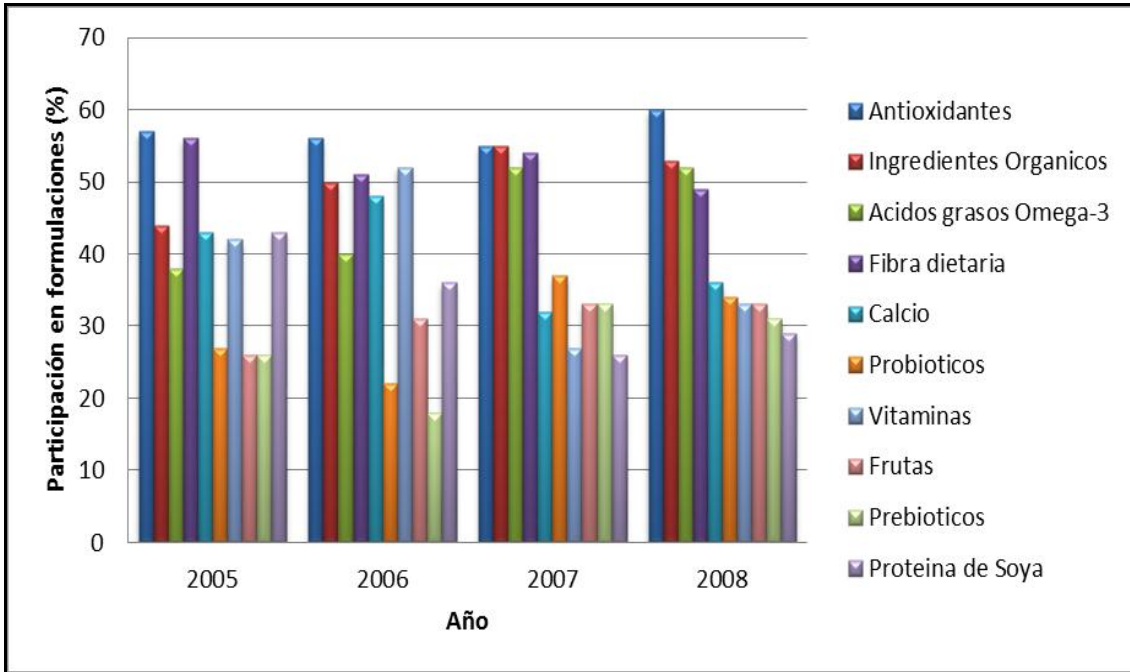


Figura 2.3. Ingredientes funcionales de mayor importancia. Fuente: Mintel (2009).

El desequilibrio entre la generación de especies oxidantes (radicales libres y otras especies reactivas) y la acción de los sistemas de defensa antioxidante del organismo, es una de las causas más importantes en la generación de enfermedades (Moure, y col., 2001; Zhang, y col., 2007). Por esta razón, el desarrollo de alimentos funcionales que contribuyan a contrarrestar la agresión oxidativa y sus efectos adversos, es uno de los desafíos más ambiciosos de esta industria.

La utilización de los polifenoles encapsulados en lugar de compuestos libres pueden superar los inconvenientes de su inestabilidad, disminuir el gusto desagradable, así como mejorar la biodisponibilidad y la vida útil del compuesto (Fang, y col., 2010; Munin, y col., 2011).

La Tabla 2.3 muestra un resumen de los diferentes tipos de antioxidantes naturales que han sido encapsulados, los materiales encapsulantes y las técnicas empleadas.

Tabla 2.3. Ejemplos de encapsulación de compuestos antioxidantes

<b>Compuesto activo</b>	<b>Material encapsulante</b>	<b>Técnica de encapsulación</b>	<b>Referencia</b>
Aceite de oliva	$\beta$ -Ciclodextrina/ Alginato	Inclusión molecular/ Extrusión	(Belščak-Cvitanović, y col., 2011; Mourtzinos, y col., 2007)
Catequina	Quitosano/ $\beta$ - Ciclodextrina	Gelificación iónica/ Inclusión molecular	(Ishikawa, y col., 2012; Zhang, y col., 2007)
Extractos de Myrtus communis	Liposomas	Emulsión	(Gortzi, y col., 2008)
Extracto de Piper sarmentosum	Alginato	Extrusión/ Gelificación iónica	(Chan, y col., 2010; Yim, y col., 2010)
Extractos de plantas medicinales (tomillo, ortiga,	Alginato	Extrusión electrostática	(Belščak-Cvitanović, y col., 2011; Stojanovic, y col., 2012)
Extractos de propóleo	Proteína de soya, Pectina	Coacervación compleja	(Nori, y col., 2011)
Extracto de Yerba Mate	Alginato, quitosano/ Sacarosa	Gelificación iónica/ Co-cristalización/ Spray drying	(Anbinder, y col., 2011; Deladino, y col., 2007a; Deladino, y col., 2008; Harris, y col., 2011)
Pulpa de mora	Maltodextrina y goma arábica	Spray drying	(Ferrari, y col., 2012)
Té	Etil celulosa/ Liposomas	Emulsión	(Li, y col., 2000; Ren, y col., 2009)

En este trabajo la encapsulación de un extracto de yerba mate rico en compuestos fenólicos ha sido propuesta como una estrategia factible para el desarrollo de ingredientes con actividad antioxidante, que puedan ser empleados en la formulación de alimentos funcionales o nutraceuticos.

***Capítulo III. Obtención y caracterización  
del extracto***

---

### 3.1. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*)

La yerba mate es una planta nativa de la región subtropical de América del Sur, consumida y producida principalmente en Argentina, el sur de Brasil, Uruguay y Paraguay. En estos países se ingiere como bebida en proporciones de más de un litro por día por millones de personas, como mate, mate cocido o tereré (Bracesco, y col., 2011; Silva, y col., 2011).

El Código Alimentario Argentino (CAA), en su capítulo XV (Art. 1193): Productos estimulantes o fruitivos define; “Con la denominación de Yerba Mate o Yerba se entiende el producto formado por las hojas desecadas, ligeramente tostadas y desmenuzadas, de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliácea) exclusivamente, mezcladas o no con fragmentos de ramas secas jóvenes, pecíolos y pedúnculos florales.”

La producción industrial de la yerba mate se realiza mediante sucesivas etapas (Isolabella, y col., 2010; Valerga, y col., 2012). Una vez realizada la *cosecha*, las hojas se trasladan al secadero en donde comienza el proceso de *sapecado*, el cual consiste en la exposición directa de las hojas al fuego a temperaturas entre los 400-450 °C durante 20-30 segundos. Este proceso se realiza con el fin de inactivar enzimas evitando la oxidación y la pérdida de color de la hoja. La hoja “sapecada” se somete a un proceso de *pre-secado* con aire caliente entre 80-100 °C durante 3-5 min. Luego se realiza el *secado* a 90-110 °C por 2-3 horas. La hoja seca, se somete a un proceso de trituración gruesa denominado *canchado*, el cual facilita su manipuleo durante el transporte y estacionamiento. Posteriormente, la yerba canchada es depositada en cámaras

de *estacionamiento* para el desarrollo del sabor, aroma y color característicos del mate. El estacionamiento puede realizarse bajo condiciones naturales de humedad relativa y temperatura durante 9-12 meses o de forma acelerada bajo condiciones controladas de humedad, temperatura y flujo de aire durante 30 ó 60 días. Una vez canchada y estacionada, la yerba mate es *triturada*, *zarandeada* y *mezclada* según el uso y preferencias de cada región. Por último se realiza el *envasado* y *estampillado* del producto para su posterior distribución.

La yerba mate contiene una gran variedad de compuestos químicos, principalmente derivados cafeicos, aminoácidos, flavonoides, minerales (K, Ca, Mg P, Na y Fe) y vitaminas (C, B1 y B2). La mayoría de estos compuestos son de carácter hidrofílico lo que facilita su extracción en medio acuoso (González de Mejía, y col., 2009).

El efecto de las sustancias bioactivas más importantes presentes en la yerba mate ha sido evaluado y analizado por varios autores. A modo de resumen se muestra una tabla elaborada por Heck y González de Mejía (2007), en la cual se citan los principales compuestos identificados y las actividades biológicas asociadas (Tabla 3.1).



Tabla 3.1. Compuestos identificados en yerba mate y algunas de sus actividades biológicas

Compuesto	Actividad biológica
Cafeína	Anticancerígeno, adelgazante, antioxidante, diurético, energizante, antitumoral, estimulante, vasodilatador inhibidora de la topoisomerasa I y II.
Acido clorogénico	Antioxidante, analgésico, anti-aterosclerótico, antidiabético, antitumoral, colerético, antibacteriano.
Clorofila	Antibacterial, anticancerígeno.
Colina	Antidiabético, colinérgico, lipotrópico
Acido nicotínico	Colerético, hipocolesterolémico (1 a 6 g/día)
Acido pantoténico	Antialérgico, antiartrítico, antifatiga
Rutina	Antioxidante, antitumoral, inhibidor de la cAMP- fosfodiesterasa, inhibidor de la topoisomerasa I y II, antiulcerosa, vasodilatador.
Taninos	Antioxidantes, antitumoral, inhibidor de la lipoxigenasa.
Teobromina	Inhibidor cAMP, Inhibidor de la cAMP- fosfodiesterasa, diurética, estimulante y miorelajante.
Teofilina	Inhibidor cAMP, Inhibidor de la cAMP- fosfodiesterasa, diurética, colerética, estimulante, vasodilatador y miorelajante.
Acido ursólico	Analgésico, antioxidante, antiperoxidante, inhibidor de proteasa, inhibidor de la topoisomerasa II, antiaritmico, anticancerígeno y antialzheimer.

Fuente: Heck y González de Mejía (2007).

### 3.1.1. Actividad antioxidante de la yerba mate

El interés en el empleo de fuentes de antioxidantes naturales ha ido aumentando significativamente en los últimos años. Esto se debe a la preferencia de los consumidores por el uso de ingredientes naturales y algunas

vinculaciones de efectos tóxicos producidos por el consumo de aditivos sintéticos (Betoret, y col., 2010; Moure, y col., 2001).

Según la “Food and Drug Administration” (FDA), se define como antioxidante a las sustancias empleadas para preservar alimentos, a través del retardo del deterioro, rancidez o decoloración debida a la oxidación. Este concepto no se restringe sólo a sustancias que actúan evitando la peroxidación lipídica, si no que incluye además la oxidación de otras moléculas como proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA), entre otras. De forma más amplia, puede definirse como antioxidante a las sustancias que en pequeñas proporciones (menos 0,01%) en presencia de sustratos oxidables retardan o previenen significativamente la oxidación de los mismos. En el caso de aplicaciones en alimentos, éste a su vez debe ser compatible con el sustrato, no conferir olores ni sabores extraños al producto, ser efectivo durante el período de almacenamiento del mismo y ser fácilmente incorporado en el alimento (Niki, 2010; Wootton-Beard, y col., 2011).

El extracto de yerba mate constituye una fuente importante de compuestos fenólicos con alto poder antioxidante, éstos pueden actuar como donantes de electrones o hidrógeno y/o como quelantes de iones de metales de transición (Fig. 3.1) (Pokorny, y col., 2001).

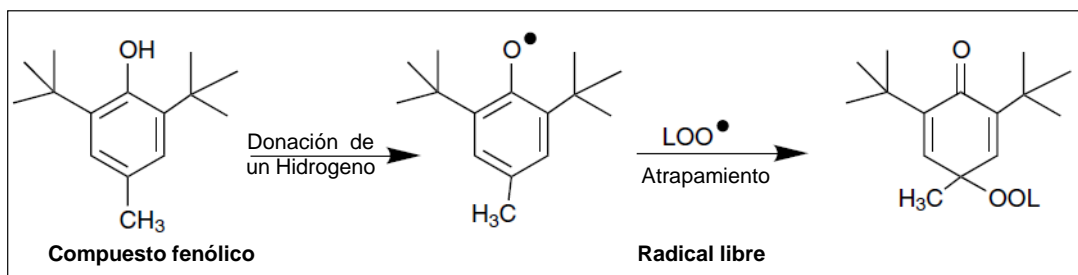


Figura 3.1. Mecanismo de acción antioxidante de compuestos fenólicos. Fuente: Pokorny y col. (2001)

Ciertos estudios han demostrado una relación importante entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de yerba mate (Floegel, y col., 2011; Terpin, y col., 2012). No obstante, la contribución individual y las posibles interacciones entre los componentes de la mezcla no han sido bien estudiadas (Heck, y col., 2008; Valerga, y col., 2012)

El ácido clorogénico y sus derivados son considerados los compuestos fenólicos con mayor influencia en la capacidad antioxidante del extracto de yerba mate. La aplicación de técnicas de HPLC y HPLC-MS ha permitido discriminar en dichos extractos una gran variedad de este tipo de compuestos (Berte, y col., 2011; Dugo, y col., 2009; Heck, y col., 2007). Las principales clases de ácidos clorogénicos hallados en la naturaleza son los ácidos cafeoilquínicos (CQA), ácidos dicafeoilquínicos (diCQA), y los menos comunes los ácidos feruloilquínicos (FQAs); cada grupo posee al menos tres isómeros.

### 3.1.2. Métodos de determinación de la capacidad antioxidante

En general, los métodos para determinar la capacidad antioxidante se basan en la inhibición de ciertas reacciones por la presencia de antioxidantes, siendo los más usados aquéllos que generan radicales libres en medios específicos y son fácilmente detectados por técnicas fotométricas. Cabe destacar, que en las medidas de capacidad antioxidante se miden los efectos de cooperación que existen entre los distintos antioxidantes (sinergismo), lo cual aporta una información más relevante que la cuantificación de compuestos antioxidantes aislados (Anesini, y col., 2012; Valerga, y col., 2012). Los ensayos de capacidad antioxidante se dividen en dos grandes grupos según sea el mecanismo de las reacciones implicadas (Apak, y col., 2007; Floegel, y col., 2011; Niki, 2010):

- Ensayos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno (Hydrogen Atom Transfer-HAT): aplican un esquema de reacción competitiva en el cual el antioxidante y el sustrato compiten por los radicales peróxidos generados. Ejemplos: **ORAC** (Oxigen Radical Absorbance Capacity) y **TRAP** (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter).
- Ensayos basados en transferencia de un electrón desapareado (Electron Transfer-ET): miden la capacidad de reducción de un oxidante (que cambia de color) por parte de un antioxidante. El grado de cambio de color se correlaciona con la concentración de antioxidante en la muestra determinada. Ejemplos:

**DPPH•** (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), **TEAC** (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity) y **FRAP** (Ferric Reduction Antioxidant Power).

Debido a la complejidad de los mecanismos de reacción de los antioxidantes naturales no se cuenta con métodos normalizados para la determinación de su actividad (Ndhlala, y col., 2010). Considerando estudios previos del grupo de trabajo y reportados en literatura, se seleccionó el método del DPPH• para la medida del poder antioxidante del extracto de yerba mate.

En este capítulo se realizará la obtención de un extracto acuoso de yerba mate, la identificación de los compuestos fenólicos presentes en el mismo, la determinación del contenido de polifenoles totales y su actividad antioxidante. Esta caracterización química permitirá conocer las propiedades más importantes del extracto obtenido para su posterior incorporación en sistemas de encapsulación.

## 3.2. Materiales y métodos

### 3.2.1. Preparación del extracto 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 realizó un filtrado preliminar con colador para separar la yerba y el líquido obtenido se volvió a filtrar con papel Whatman No. 1. Estas condiciones de extracción fueron seleccionadas por Deladino (2010), ya que permitieron obtener el mejor rendimiento en la extracción de polifenoles totales de yerba mate.

### 3.2.2. Determinación del contenido de polifenoles totales (PT) del extracto de yerba mate

La determinación del contenido de polifenoles totales fue realizada mediante los siguientes métodos:

#### 3.2.2.1. Método de Folin-Ciocalteu (FC)

El contenido de PT fue determinado usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Anedra, Argentina). Esta prueba está basada en la oxidación de los grupos fenólicos con los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico. Como resultado de la reacción se forma un complejo verde azulado, el cual tiene un máximo de absorbancia entre 725 y 750 nm. Para el análisis se tomaron 0,2 mL de

extracto acuoso de yerba mate y se colocaron en un tubo de ensayo conteniendo 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% (p/v) (Anedra, Argentina), se dejó reposar durante 2 minutos y a continuación se agregaron 0,2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1). Se agitó mediante vórtex y, luego de un tiempo de reacción de 30 minutos, se procedió a la medida de absorbancia en un espectrofotómetro (Shimadzu Double Bean Spectrophotometer UV-150-02, Seisakusho Ltd., Kyoto, Japón) a una longitud de onda de 725 nm (Schlesier, y col., 2002).

La calibración del método de FC, se realizó utilizando como patrón ácido clorogénico (AcCl). Se preparó una solución de AcCl a una concentración de 0,16 mg de AcCl/mL (Fluka, EEUU). Posteriormente fueron realizadas diluciones sucesivas y se midió la absorbancia a 725 nm. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron en función de la concentración de las soluciones. A fin de conocer las concentraciones de las muestras ensayadas a partir de las absorbancias medidas, se utilizó la Ley de Lambert y Beer, representada por la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \qquad \text{Ec 3.1}$$

Donde A es la absorbancia medida,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción determinado a partir de la pendiente de la curva de calibración ( $\text{mL} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), b es el camino óptico (1 cm) y C es la concentración de la muestra expresada como mg AcCl /mL.

### 3.2.2.2. Espectrofotometría UV

Debido a que el AcCl y sus derivados son los compuestos fenólicos mayoritarios en el extracto de yerba mate, se determinó la concentración de AcCl, mediante un espectrofotómetro UV visible a 324 nm (Shimadzu, UV 1240, Japón). Al igual que el método de FC, para la curva de calibración se empleó como patrón AcCl. Las concentraciones de AcCl en el extracto fueron determinadas a partir de la Ec 3.1. Los resultados se expresaron como mg de AcCl/mL.

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

El rendimiento de extracción de PT en medio acuoso se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (R)} = \left( \frac{m_p}{m_y} \right) \quad \text{Ec 3.2.}$$

Donde  $m_p$ , corresponde a la masa de PT presente en el extracto cuantificada por los métodos de FC y espectrofotometría UV y  $m_y$  es la masa de yerba mate empleada en la preparación del extracto, en gramos.



### 3.2.4. Composición de polifenoles del extracto de yerba mate mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El perfil de compuestos polifenólicos fue analizado mediante HPLC con un equipo Waters1525 (Waters, EEUU) con bomba binaria y detector DAD. El análisis cromatográfico se realizó en una columna Zorbax 300 SB-C18 de 250 x 4,6 mm y 5 µm de diámetro de partícula.

La fase móvil "A" consistió en una mezcla de metanol, agua y ácido fórmico (79,7:20:0,3) y la fase móvil "B" de una mezcla de metanol y ácido fórmico (99,7:0,3). Se empleó el siguiente gradiente de mezclas de solvente A con: 0-10%B/15 min; 30%B/10 min; 60%B/10 min; 80%B/2 min.

Se utilizaron los siguientes compuestos como estándares para la identificación y cuantificación de los polifenoles presentes en el extracto líquido: ácido clorogénico (Fluka, EEUU), rutina y ácido cafeico (Sigma-Aldrich, Argentina). Se prepararon soluciones stock de las sustancias patrón de concentración 0,25 mg/mL en mezclas de metanol:agua (50:50).

Las curvas de calibración se realizaron con cuatro niveles de concentración diferentes, cada una por triplicado. Los compuestos estándar se inyectaron por separado para determinar los tiempos de retención. La detección de los compuestos se realizó a la longitud de onda de máxima absorción: ácidos cafeico y clorogénico a 330 nm y rutina a 380 nm.

### 3.2.5. Actividad antioxidante frente al radical DPPH•

La actividad antioxidante fue determinada usando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) (Sigma-Aldrich, EEUU), siguiendo el protocolo de Brand-Williams, y col. (1995) con modificaciones. Se preparó una solución de DPPH• con una concentración de 25 mg DPPH•/L de etanol. Se adicionaron 100 µL de muestra a 3,9 mL de la solución de DPPH•. Luego de un tiempo de reacción de 30 minutos se midió la absorbancia a 517 nm.

La actividad anti-radical fue expresada como el porcentaje de inhibición (% I) del radical libre DPPH•, calculado con la siguiente ecuación:

$$\%I = \left( \frac{Abs_b - Abs_m}{Abs_m} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde  $Abs_b$  es la absorbancia de la reacción control (conteniendo todos los reactivos excepto la muestra) y  $Abs_m$  es la absorbancia de la muestra.

### 3.2.6. Análisis estadístico

A lo largo de este trabajo el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software SigmaPlot versión 11.0 (Systat Software Inc. EE.UU). Se realizaron análisis de varianza (ANAVA) y test de comparación de medias (Test de Tukey, Test de Fisher LSD), con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0,05$ ). Todos los resultados fueron reportados como la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres ensayos.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Obtención del extracto líquido. Optimización de las condiciones de extracción.

Las condiciones de proceso empleadas (100 °C/40 min), permitieron obtener un extracto líquido con alto contenido de polifenoles utilizando agua como solvente. Varios autores han estudiado el uso de diferentes solventes de extracción y su efecto en la concentración y capacidad antioxidante de los polifenoles de yerba mate. Bastos, y col. (2007) en un estudio cuali-cuantitativo de extracto de yerba mate mediante espectroscopía de masa (ESI-MS) y el reactivo de FC, encontraron un menor contenido de PT en los extractos etanólicos que en los acuosos y una cantidad aún menor de PT solubilizada en éter. Por su parte, Anbinder (2004) al emplear una mezcla etanol:agua (50:50), obtuvo concentraciones de polifenoles similares a las extraídas en medio acuoso. Turkmen, y col. (2006) observaron un incremento en la cantidad de PT extraída con el aumento de la polaridad del solvente empleado, solubilizando mayor cantidad de PT con el empleo de acetona al 50% y N,N-dimetilformamida al 50% que con el uso de agua.

Las Figs. 3.2 y 3.3, muestran las curvas de calibración con ácido clorogénico para los métodos de determinación de polifenoles empleados: FC y UV, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, se usó ácido clorogénico como patrón debido a que es la sustancia polifenólica más abundante del extracto líquido de yerba mate (Bracesco, y col., 2011; Dugo, y col., 2009; Jaiswal, y col., 2010).

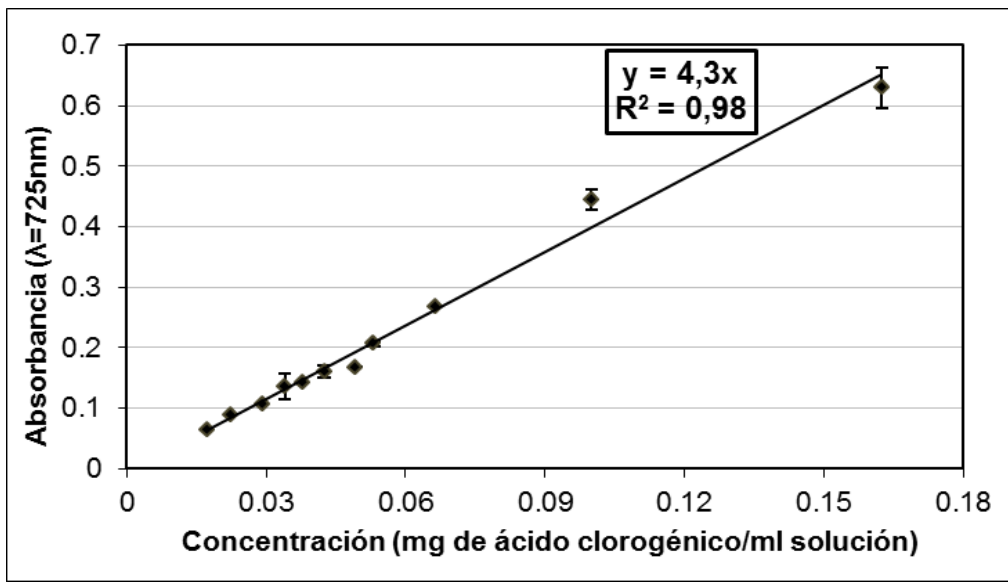


Figura 3.2. Curva de calibración para el método de Folin-Ciocalteu.

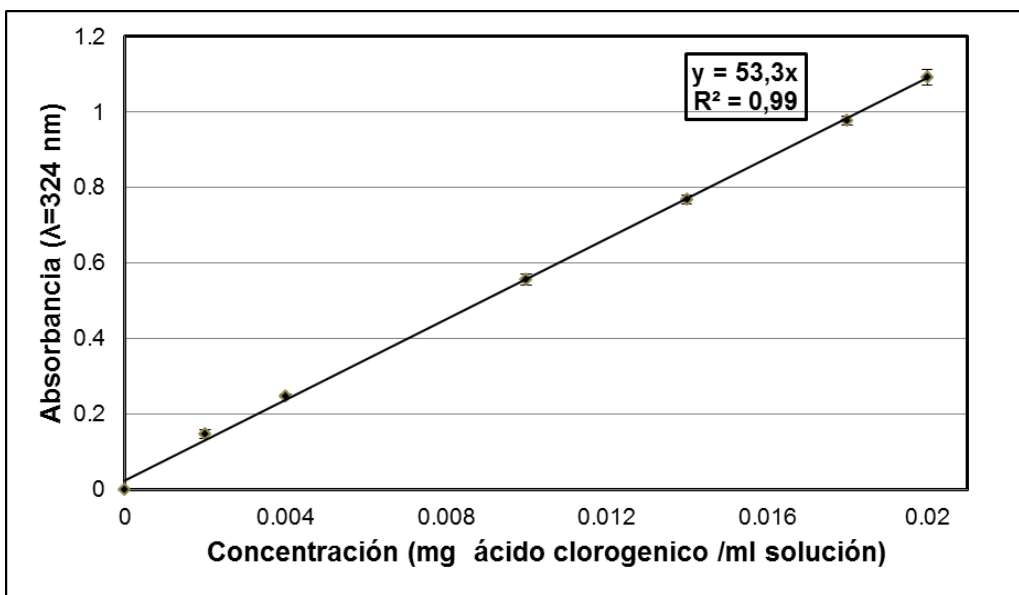


Figura 3.3. Curva de calibración para el método de espectrofotometría UV.

Los coeficientes de extinción ( $\epsilon$ ), se obtuvieron a partir de las pendientes de las rectas de las curvas de calibración de cada método (Fig. 3.2 y Fig. 3.3).

Las curvas obtenidas mostraron buena correlación, lo que permitió la determinación de las concentraciones de PT aplicando la ley de Lambert y Beer.

A fin de optimizar el rendimiento de extracción de los polifenoles en agua, se probaron distintas cantidades de yerba mate en la preparación del extracto, bajo las mismas condiciones de proceso. La Fig. 3.4. muestra el contenido de PT extraído en las diferentes formulaciones de extracto, determinadas mediante los métodos de FC y UV.

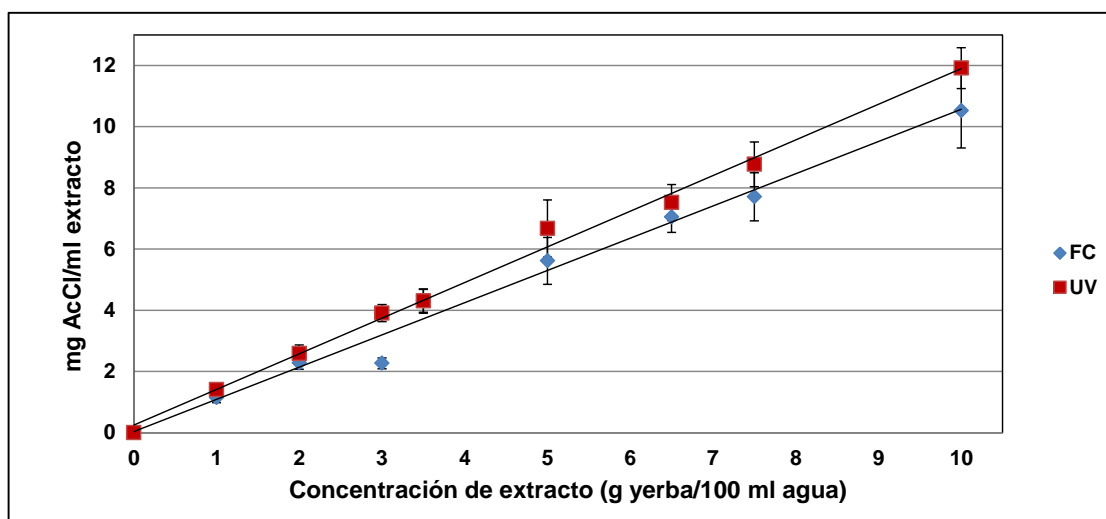


Figura 3.4. Comparación de las concentraciones de PT determinadas por el método de FC y espectroscopía UV.

Los resultados obtenidos con ambos métodos, mostraron un aumento lineal en el contenido de PT en proporción a la cantidad de yerba mate empleada en la obtención del extracto líquido. Este comportamiento indica que con las concentraciones evaluadas en este estudio, no se alcanzó la saturación de la

solución de extracción. Dicha concentración se alcanza cuando el valor de PT permanece constante independientemente de la cantidad de materia prima utilizada.

También fue observada una buena correlación entre los resultados obtenidos con el reactivo de FC y la espectrofotometría UV (Fig. 3.5).

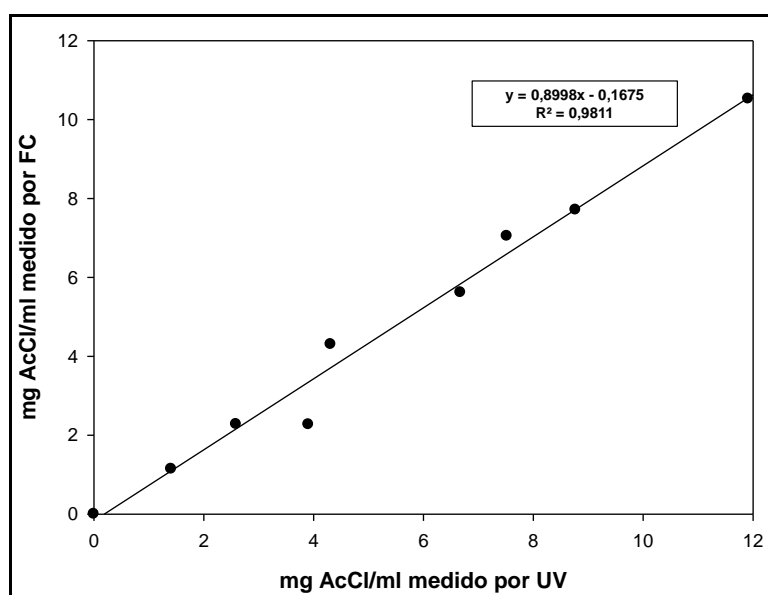


Figura 3.5. Correlación entre las concentraciones de PT determinadas por espectroscopía UV y el reactivo de FC.

Si bien se obtuvieron valores un poco mayores en la determinación por el método UV, esta diferencia no fue significativa. Lo anterior favorece el empleo de la espectroscopía UV como una alternativa rápida y sencilla para el análisis de rutina de compuestos fenólicos en estos extractos naturales. Esta metodología no requiere el uso de reactivos específicos lo que disminuye el costo de ensayo.

Por otro lado, se obtuvieron rendimientos de extracción de PT entre 110-140 mg AcCl/ g yerba, por ambos métodos (FC y UV). De acuerdo al análisis de varianza, no se encontraron diferencias significativas entre los rendimientos de extracción de PT en relación a las cantidades de yerba empleadas en todos los casos. Rendimientos equivalentes de PT en extractos acuosos de yerba mate fueron obtenidos por Deladino (2010) y Bastos y col. (2007); con valores de 122 y 134 mg AcCl/g yerba, respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados de esta sección, y con el fin de comparar con trabajos previos realizados en el laboratorio, para los ensayos posteriores se usó el extracto acuoso de yerba mate al 3 % (p/v). En este sentido también se empleó el método de Folin-Ciocalteu, debido a que es la técnica más comúnmente usada en la determinación de PT de extractos naturales, lo cual facilita la comparación con otros autores.

### 3.3.2. Composición de polifenoles del extracto de yerba mate por HPLC

Los principales compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso de yerba mate fueron identificados y cuantificados mediante HPLC-DAD (Fig. 3.6). Se observaron picos atribuibles a cada compuesto en distintos tiempos de retención (tr): ácido clorogénico (tr = 13,19 min), ácido cafeico (tr = 15,5 min) y rutina (tr = 25,3 min) (Fig.3.6). Otros autores han identificado en extractos de yerba mate teobromina, cafeína, quercitina, kanferol, etc. (Filip, y col., 2001; González de Mejía, y col., 2009; Heck, y col., 2007).

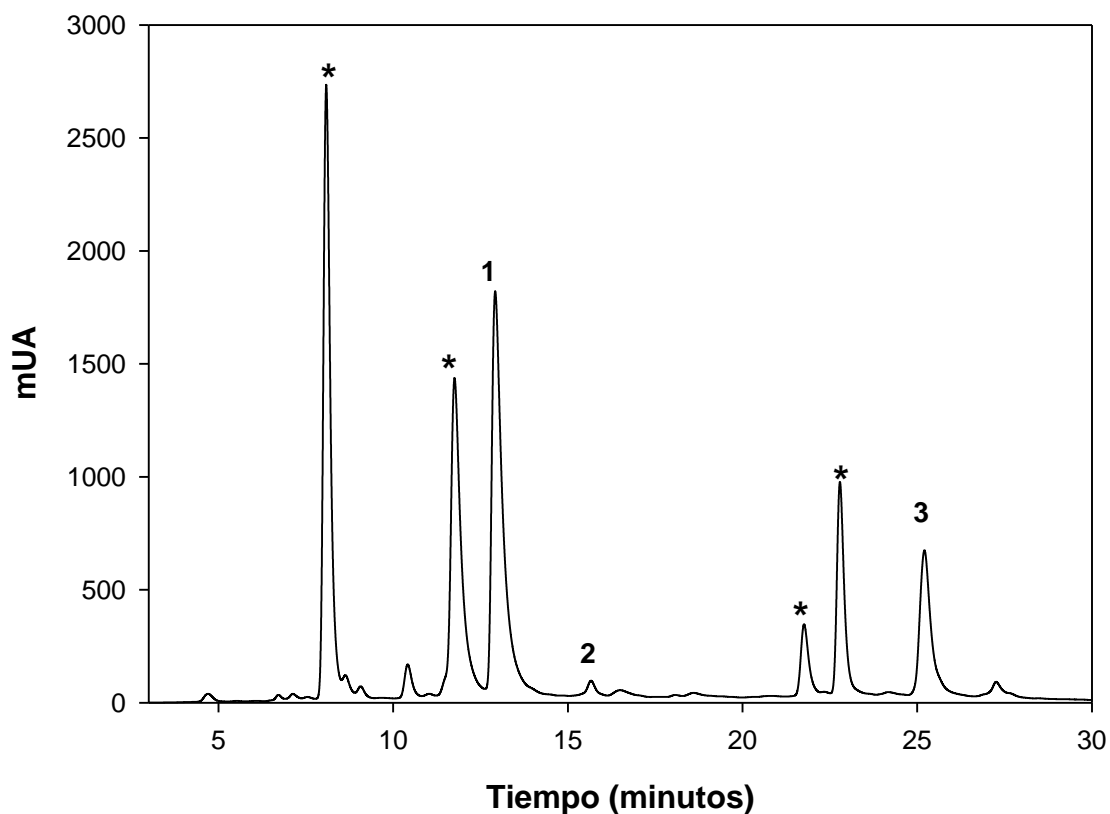


Figura 3.6. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC del extracto acuoso de yerba mate. (1) ácido clorogénico; (2) ácido cafeico y (3) rutina. 330 nm. \*Picos no identificados.

Como se observa en el cromatograma (Fig. 3.6), algunos picos no han sido identificados. Debido a la falta de estándares comerciales, una identificación tentativa de estos picos se hizo de acuerdo a la patente europea ES 2 267 182 T3 (Maffei Facino, y col., 2007). En el trabajo mencionado, mediante HPLC-MS, los picos mayoritarios eluidos antes que el ácido clorogénico fueron identificados como isómeros del mismo y los picos eluidos entre el ácido cafeico y la rutina fueron identificados como ésteres dicafeoilquínicos (3,4; 3,5 y 4,5 ácidos dicafeoilquínicos) (Fig. 3.7). Otros autores también encontraron un alto porcentaje de coincidencia entre los espectros UV de dichos compuestos (Carini, y col., 1998; Filip, y col., 2001). Por lo anterior, en este trabajo los



cuatro picos no identificados serán referidos como "compuestos relacionados con el ácido clorogénico".

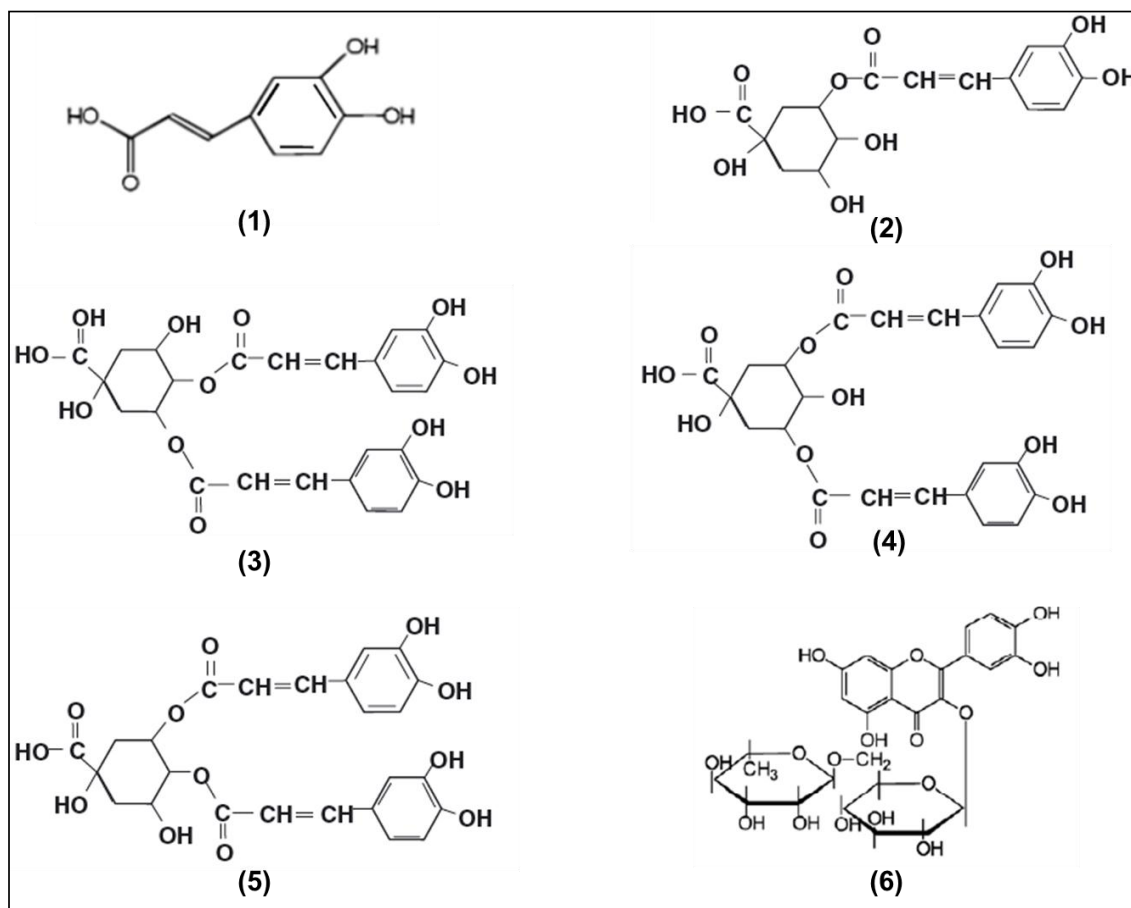


Figura 3.7. Estructuras químicas de algunos compuestos identificados en extracto de yerba mate: (1) ác. cafeico, (2) ác. clorogénico, (3) ác. 4,5-dicafeolquínico, (4) ác. 3,5-dicafeolquínico, (5) ác. 3,4-dicafeolquínico y (6) rutina. Fuente: Heck y col. (2007).

Dugo y col. (2009) mediante cromatografía líquida bidimensional encontraron alrededor de 26 diferentes compuestos derivados del ácido clorogénico en extractos de yerba mate. Por su parte, Jaiswal y col. (2010) con el empleo de Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC/MS), lograron

identificar una cantidad aún mayor de dichos compuestos, encontrando alrededor de 42 isómeros distintos.

Para los tres compuestos detectados en este estudio, se obtuvieron las siguientes ecuaciones para las curvas de calibración:

- Ácido clorogénico:  $y = 94236x - 465,23$ ;  $R^2 = 0,9914$ .
- Rutina:  $y = 28319x + 92,941$ ;  $R^2 = 0,9810$ .
- Ácido cafeico:  $y = 146210x - 1528,2$ ;  $R^2 = 0,9634$ .

Donde  $x$  es la cantidad de cada compuesto expresada en mg/mL,  $y$  es el área del pico correspondiente. Las concentraciones obtenidas para cada compuesto se muestran en la Tabla 3.2. El contenido de polifenoles totales fue calculado por la sumatoria de las concentraciones de ácido clorogénico, cafeico y rutina, y los compuestos no identificados cuantificados como ácido clorogénico.

Tabla 3.2. Concentraciones de compuestos fenólicos en extracto acuoso de yerba mate cuantificados mediante HPLC

Compuestos cuantificados (mg/g yerba mate)			
Ácido clorogénico	Ácido cafeico	Rutina	Compuestos relacionados con ác. clorogénico
29,53 ± 2,39	2,38 ± 0,44	7,39 ± 0,41	66,07 ± 6,67

Se puede observar que el mayor aporte al contenido de polifenoles totales corresponde a los compuestos relacionados con el ácido clorogénico. De la Tabla 3.2 se obtuvo una concentración de polifenoles totales de 105,37 mg

PT/g yerba mate. Este valor es del orden del contenido de PT determinado previamente por los métodos de FC (90 mg AcCl/g yerba) y UV (125 mg AcCl/g yerba). Resultados similares fueron obtenidos en extractos acuosos de yerba mate por Deladino (2010) y Silva y col. (2011), con valores de 120,5 mg PT/g yerba y 106 mg PT/g yerba, respectivamente.

### 3.3.3. Actividad antioxidante al radical DPPH•

La actividad frente al radical DPPH• de diferentes concentraciones de extracto acuoso de yerba mate, se muestra en la Fig. 3.8. El extracto acuoso de yerba mate al 3%, correspondiente a una concentración de PT de 2,32 mg AcCl/mL de extracto, mostró un porcentaje de inhibición del 90%.

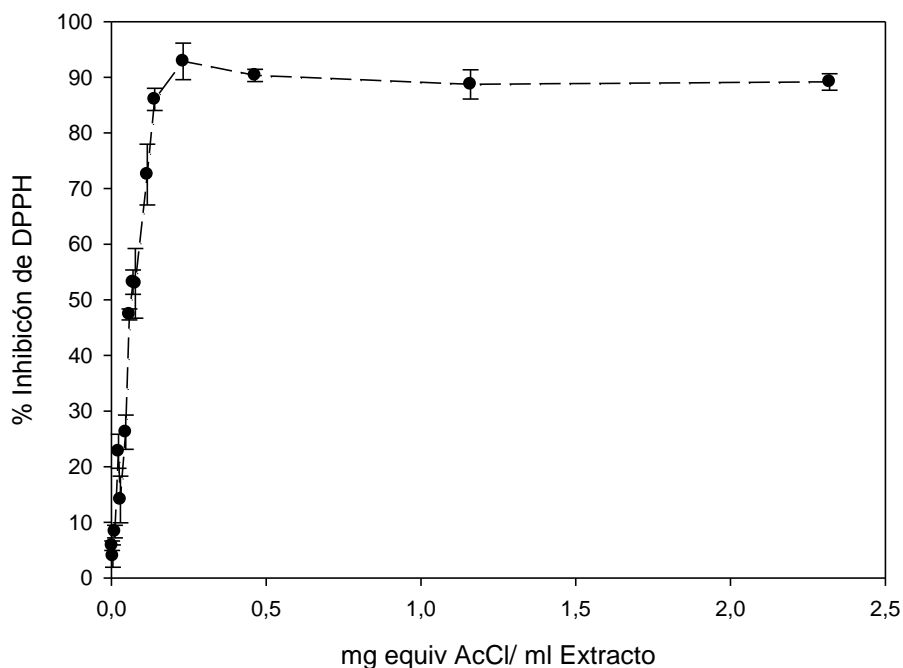


Figura.3.8. Porcentaje de inhibición del DPPH• vs. las concentraciones de extracto evaluadas

La actividad antioxidante del extracto de yerba mate ha sido comparada con la de antioxidantes de origen natural y sintéticos. Bastos y col. (2007), obtuvieron porcentajes de inhibición al DPPH• de 87,8 % en extracto acuoso de yerba mate y de 88,3 % en té verde, ambos preparados al 5% (p/v). Estos autores compararon la actividad inhibitoria de estos antioxidantes naturales frente al antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno) a la misma concentración, obteniendo un porcentaje de inhibición del 89%. González-De Mejía y col. (2009) determinaron valores entre 80-87 % para la actividad antioxidante de extractos de distintas variedades de yerba mate y los compararon con estándares de ácido clorogénico y gálico, encontrando porcentajes de inhibición de 91% y 87%, para éstos respectivamente.

Se observó un incremento rápido de la capacidad antioxidante del extracto acuoso de yerba mate con el aumento del contenido de PT, hasta alcanzar una meseta en la que el porcentaje de inhibición del radical DPPH• resulta independiente de la concentración de compuestos fenólicos (Fig. 3.8). Dicha concentración fue de 0,23 mg AcCl/mL, y presentó una alta actividad antioxidante inhibiendo alrededor del 90% del radical DPPH•. Según Moure y col. (2001) la mínima concentración de PT que causa la mayor actividad antioxidante es característica de cada compuesto y puede variar en función del método empleado.

La concentración de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la cantidad inicial del radical DPPH• ( $IC_{50}$ ) es un parámetro comúnmente utilizado para la comparación de distintos antioxidantes. Cuanto menor es este valor, mayor es la capacidad antioxidante de la sustancia bajo estudio.

En este trabajo la  $IC_{50}$  del extracto acuoso de yerba mate se calculó a partir de la Fig. 3.8, obteniéndose una concentración de 0,07 mg AcCl/mL. Anesini y col. (2012) encontraron valores de  $IC_{50}$  de 0,005 y 0,01 mg/mL en extractos preparados con yerba mate fresca y procesada, respectivamente. Siendo menor la  $IC_{50}$  para el extracto preparado con yerba mate fresca, lo que indica una mayor actividad antioxidante del mismo.

La efectividad de los extractos de yerba mate como antioxidantes ha sido atribuida a la propiedad reductora que ejercen los derivados cafeicos sobre los radicales libres; siendo los compuestos principalmente responsables de su actividad anti-radical el ácido clorogénico y sus derivados (Filip, y col., 2000; Heck, y col., 2007; Jaiswal, y col., 2010). Anesini y col. (2012) estudiaron la participación de los principales compuestos bioactivos (cafeína, derivados del ácido cafeico y rutina) en la actividad antioxidante (DPPH•) y la prevención de la oxidación lipídica de extractos acuosos de yerba mate. Sus resultados demostraron que el ácido clorogénico, ácido cafeico y rutina contribuyen significativamente a la actividad antioxidante del extracto. Por el contrario, una acción pro-oxidante fue obtenida para la cafeína. Sin embargo, el sinergismo entre los compuestos presentes en el extracto, es el responsable de su elevada actividad anti-radical.

Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales: *I)* Por su facilidad para ceder un radical hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre, dada la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático (Duthie, y col., 2003). *II)* Por su facilidad para quelar iones metálicos

(principalmente hierro y cobre) y por tanto inhibir la formación de radicales libres (Khokhar, y col., 2003). Filip, y col. (2000) en el estudio del efecto antioxidante de extracto de yerba mate en liposomas, estableció como mecanismo de acción más probable la actividad de los compuestos antioxidantes como inhibidores de los radicales peróxidos antes de la etapa de iniciación.

### 3.4. Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos en este capítulo permitieron caracterizar químicamente el extracto líquido de yerba mate, para su posterior incorporación en sistemas de encapsulación:

- El proceso utilizado para la obtención del extracto líquido es sencillo y práctico, lo que favorece su implementación a escala industrial. El empleo de agua como solvente, además de ser económica, permite la utilización del extracto obtenido como fuente natural de antioxidantes en formulaciones de alimentos funcionales.
- Se observó un aumento lineal en el contenido de PT en proporción a la cantidad de yerba mate empleada en la obtención del extracto líquido.
- Se encontró una alta correlación lineal entre las concentraciones de PT determinadas por los métodos FC y UV, lo que representa una alternativa de uso de la espectroscopía UV para el análisis rápido y sencillo de estos compuestos.

- El análisis mediante HPLC-DAD permitió la identificación y cuantificación de ácido clorogénico, cafeico y rutina en el extracto líquido.
- El contenido de polifenoles totales determinado por los métodos de FC y UV, coinciden con el resultado obtenido por HPLC, al realizar la suma de las concentraciones de ácido clorogénico, rutina, ácido cafeico y los picos no identificados mayoritarios atribuidos a derivados del ácido clorogénico.
- El extracto obtenido mostró un alto contenido de polifenoles totales y una elevada actividad antioxidante inhibiendo el radical DPPH• a bajas concentraciones.

*Capítulo IV. Preparación y  
caracterización de las cápsulas*

---



#### 4.1. Sistemas de encapsulación

La encapsulación es considerada una alternativa importante a la solución de 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. Además, permite enmascarar sabores desagradables, asegurar la dosis y la biodisponibilidad de un nutriente, y mejorar a su vez la relación costo/beneficio para el fabricante (Champagne, y col., 2007; Onwulata, 2012).

Actualmente el uso de antioxidantes naturales es de gran interés para el área de alimentos funcionales y nutraceúticos. Sin embargo, debido a la inestabilidad química y física de estos compuestos su aplicación directa en alimentos es limitada. A través de diferentes técnicas de encapsulación se ha logrado conservar una gran variedad de antioxidantes de origen natural como ingrediente funcional activo (Deladino, y col., 2008; Fang, y col., 2010). Por lo anterior, el desarrollo de sistemas de vehiculización, estabilización, protección y liberación controlada de extractos de yerba mate constituye un medio para la obtención de ingredientes naturales, que puedan ser empleados en la formulación de alimentos con actividad antioxidante incrementada.

##### 4.1.1. Materiales encapsulantes

Los biopolímeros son los vehículos más usados para la protección de ingredientes en la industria de alimentos debido a su biodisponibilidad, toxicidad y alergenicidad nula (Nussinovitch, 2010). Los biomateriales encapsulantes comúnmente utilizados son carbohidratos, celulosas, gomas,

proteínas y lípidos. Estos pueden emplearse en forma individual o combinados con otros materiales, a fin de generar sinergias favorables (Goh, y col., 2012; Wandrey, y col., 2010).

Tanto el alginato como el almidón son polímeros de origen natural cuya aplicación está ampliamente distribuida en la industria alimentaria. Ambos materiales han sido empleados como matriz encapsulante de diferentes compuestos, obteniendo resultados satisfactorios (George, y col., 2006).

#### 4.1.1.1. Alginato

El alginato permite obtener un gel estable y biocompatible. Químicamente, es un polisacárido lineal compuesto por bloques alternados de residuos de ácido  $\alpha$ -L gulurónico (G) y  $\beta$ -D manurónico (M) unidos mediante enlaces 1 $\rightarrow$ 4 (Fig. 4.1) (Draguet, 2000; Yang, y col., 2011).

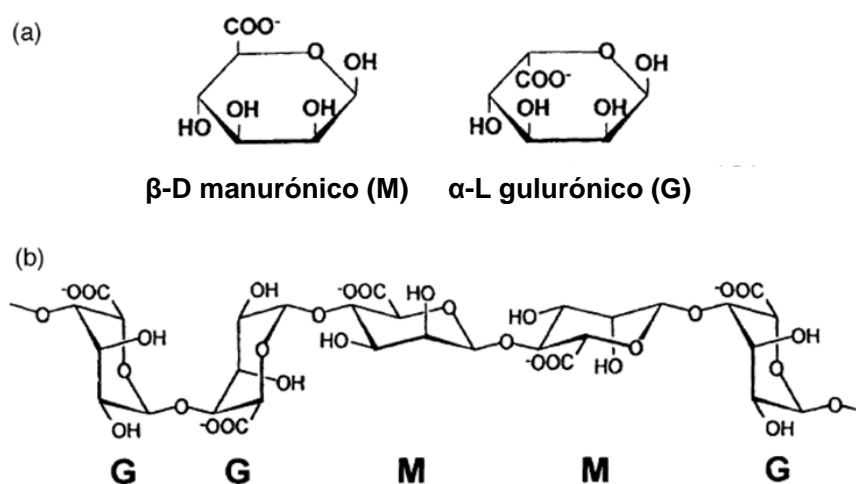


Figura 4.1. Estructura del polímero de alginato a) Monómeros del alginato b) Conformación de la cadena de alginato. Fuente: Draguet, 2000.

La gelificación y el entrecruzamiento del polímero se logra por el intercambio de los iones sodio de los ácidos gulurónicos con los cationes divalentes y el apilamiento de estos grupos gulurónicos para formar una red tridimensional, conocida como “caja de huevos” (Fig. 4.2) (Draguet, 2000; Rousseau, y col., 2004).

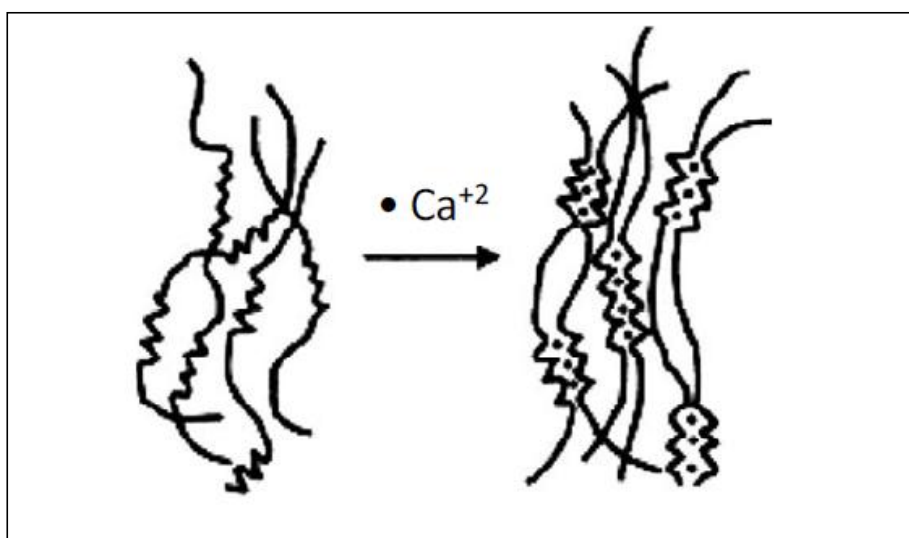


Figura 4.2. Modelo de “caja de huevo” de alginato de calcio. Fuente: Draguet, 2000.

Los factores más importantes que influyen sobre la gelificación son la concentración, la composición química, la secuencia de segmentos manurónicos y gulurónicos, la relación entre iones gelificantes y no gelificantes y la presencia de agentes complejantes como fosfatos o citratos. También hay que tener en cuenta que el alginato al ser un polielectrolito puede interactuar electrostáticamente con otros polímeros cargados (Draguet, 2000; Yang, y col., 2011).

Las cápsulas de alginato han sido empleadas por su fácil preparación a escala laboratorio, el proceso es muy sencillo y puede ser conducido en condiciones estériles. Además, muchos compuestos pueden ser encapsulados, ya sean hidrofóbicos o hidrofílicos, sensibles a la temperatura, líquidos o sólidos, etc. (Champagne, y col., 2007; Gouin, 2004). Algunos de los compuestos activos encapsulados con alginato son extractos de antioxidantes naturales, células microbianas, fármacos, entre otros. (Chan, y col., 2011b; Das, y col., 2011; Gbassi, y col., 2009; Lucinda-Silva, y col., 2010; Pongjanyakul, y col., 2010).

La principal desventaja de las cápsulas de alginato es que son muy porosas y se pueden producir pérdidas del material activo durante su preparación, manipuleo o posterior incorporación en una preparación (Fundueanu, y col., 1999; George, y col., 2006; Huguet, y col., 1996).

#### 4.1.1.2. Almidón

El almidón es ampliamente utilizado como ingrediente en la industria de alimentos debido a que es de fácil disponibilidad, no tóxico, biodegradable y de bajo costo (Smigielska, y col., 2005; Vilivalam, y col., 2000). A diferencia de otros polímeros, el almidón se encuentra en la naturaleza como complejas partículas discretas con ordenamiento radial denominadas gránulos. Estos están constituidos mayormente por una mezcla de dos polisacáridos: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero esencialmente lineal formado por moléculas de glucosa, unidas mediante enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) con un grado de polimerización de alrededor de 6000. Esta adquiere una conformación

tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa (Fig. 4.3. a y b).

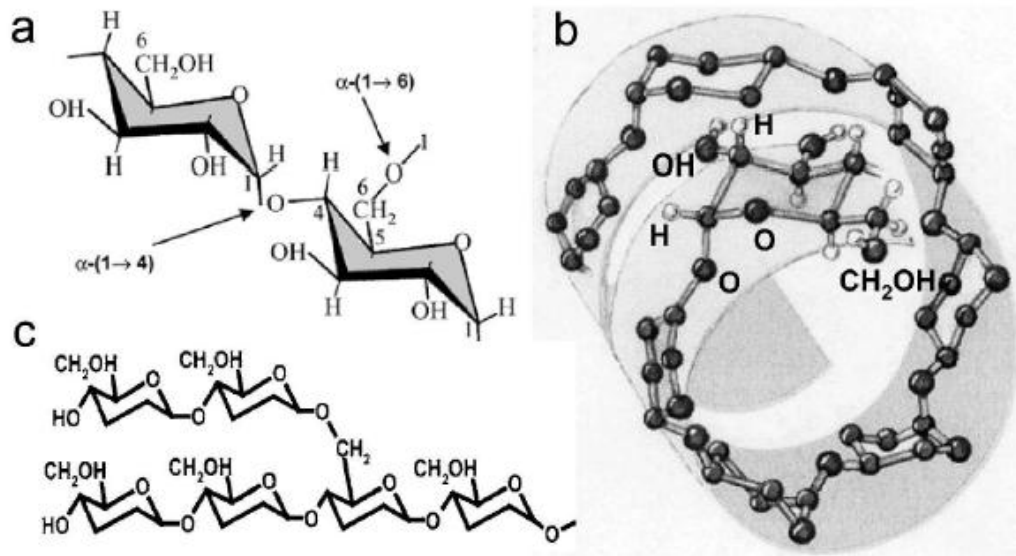


Figura 4.3. Estructura molecular del almidón: a) cadena de amilosa, b)  $\alpha$ -hélice de amilosa, c) ramificaciones de amilopectina. Fuente: Smigielska y col. 2005.

La amilopectina es una molécula muy grande y altamente ramificada, que contiene enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) y  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) (Fig. 4.3c). Esta es significativamente más grande que la amilosa, con un grado de polimerización de alrededor de 2 millones.

Respecto a sistemas de encapsulación, el almidón ha sido utilizado tanto como polímero encapsulante así como también como material de relleno inerte (Wandrey, y col., 2010). Con el agregado de almidón se ha observado un aumento de la resistencia mecánica, la conservación de la forma y del tamaño de las cápsulas y mayor estabilidad del material encapsulado durante el

almacenamiento (Chan, y col., 2011b; Rassis, y col., 2002). Sin embargo, no se conocen estudios en literatura en los que se haya empleado almidón no sólo como relleno inerte, sino también como vehículo de compuestos activos que mejoren la funcionalidad del sistema encapsulado.

#### 4.1.2. Obtención de sistemas de encapsulación por gelificación iónica

La formación de hidrogeles es una de las técnicas de encapsulación más empleadas en la actualidad y continuamente se buscan alternativas que permitan su implementación a escala industrial (Champagne, y col., 2007; Gouin, 2004). Esta técnica consiste en el goteo de la solución de hidrocoloide a través de un capilar o boquilla. Las gotas se reciben en una solución dispersante, en la que ocurre la reacción. Se utiliza principalmente alginato de sodio como gelificante y la combinación con iones divalentes como el calcio, para inducir la gelificación (Draguet, 2000; Goh, y col., 2012).

En el proceso de gelificación iónica el control de las condiciones de operación es fundamental para mantener las características morfológicas y el tamaño de los encapsulados. Según Chan y col. (2009) algunas de las variables a tener en cuenta son: densidad ( $\rho$ ), tensión superficial ( $\gamma$ ) y viscosidad ( $\eta$ ) de la solución hidrocoloide, diámetro de la punta de goteo ( $d_T$ ), distancia de recolección ( $h$ ), velocidad de caída ( $u$ ), diámetro de la gota ( $d_d$ ), entre otras (Fig. 4.4).

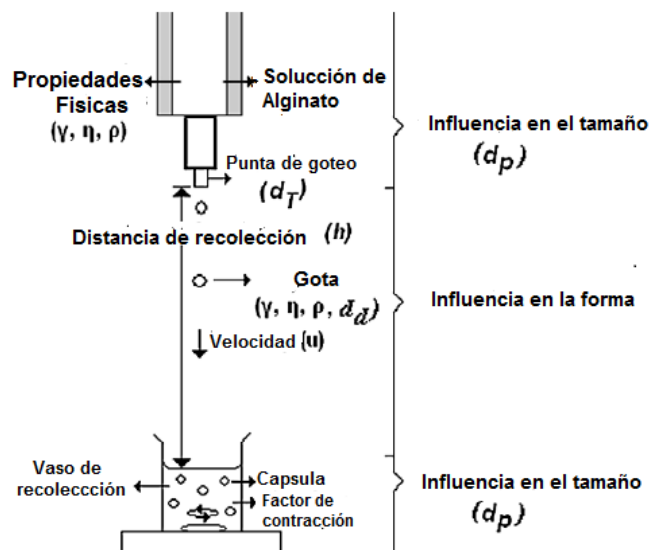


Figura 4.4. Esquema de obtención de cápsulas de alginato por gelificación iónica. Fuente: Chan y col. (2009).

Algunos autores han propuesto modelos matemáticos de predicción de forma y tamaño de los encapsulados, permitiendo optimizar el tiempo de preparación y estandarizar las condiciones de trabajo (Chan, y col., 2009; Chan, y col., 2011a; Shi, y col., 2011).

#### 4.1.3. Caracterización de los encapsulados

La caracterización de las cápsulas constituye una etapa fundamental en el análisis de la micro y macroestructura, propiedades térmicas, propiedades mecánicas y reológicas y el análisis de superficie. En la Tabla 4.1. se muestran algunas de las técnicas de caracterización más empleadas.

Tabla 4.1. Técnicas empleadas en la caracterización de encapsulados

<b>Característica</b>	<b>Técnicas empleadas</b>
Análisis morfológico	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM/ ESEM/SEM-EDX), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)
Tamaño de partícula y forma	Técnicas microscópicas, tamizado, sedimentación, técnicas de difracción de rayos láser
Porosidad	Porosimetría de Intrusión de Mercurio (MIP) Cromatografía de Exclusión Molecular Inversa (ISEC)
Interacciones polímero - compuesto activo	Difracción de rayos X, Espectroscopía de Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Análisis Térmico Diferencial (DTA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

En cada sistema particular la selección y aplicación de las técnicas, estará en función de las características del encapsulado y de las futuras aplicaciones del mismo. A continuación se describen brevemente las técnicas empleadas en este estudio:

#### 4.1.3.1. Técnicas microscópicas

Para analizar las características morfológicas de las cápsulas, se recurre normalmente a técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM) que también permiten detectar la posible agregación de las partículas, así como determinar el tamaño de las mismas.

El análisis SEM ha sido empleado frecuentemente para examinar las propiedades de superficie y la estructura de un gran número de materiales en el campo de alimentos. En esta técnica, un haz de electrones es utilizado para



escanear la superficie de la muestra, estos se detectan posteriormente dando información acerca de la topografía y morfología del material, además de la composición si el equipo cuenta con una unidad de microanálisis. Las muestras deben encontrarse libres de humedad y debe someterse a alto vacío. En el caso que se requiera el análisis de muestras húmedas, puede utilizarse el Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM), ya que ésta técnica no requiere llevar la muestra a sequedad, si no que puede analizarse en estado natural o bajo condiciones ambientales, sin necesidad de usar técnicas convencionales de preparación de muestras.

#### 4.1.3.2. Análisis térmico

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es probablemente la técnica más utilizada en la determinación de las propiedades térmicas de encapsulados, ésta ofrece información relevante acerca del estado físico del compuesto activo dentro de la matriz del polímero. La técnica de DSC mide la diferencia de temperatura entre la muestra y una referencia, causada por un cambio de fase. Las transiciones de primer orden producen picos y las de segundo orden ocasionan un salto en el flujo calórico. La transición vítrea es una transición de segundo orden y su determinación mediante DSC y otras técnicas apropiadas es muy importante para inferir la estabilidad de los productos, ya que los materiales en estado vítreo son recomendables debido a la baja movilidad dentro de la matriz (Alipour, y col., 2010; Gabbott, 2008).

#### 4.1.3.3. Porosimetría por Intrusión de Mercurio (PIM)

La porosimetría por intrusión de mercurio es una técnica indirecta para caracterizar materiales porosos. Esta permite obtener información cuantitativa sobre un material como tamaño de poro medio, distribución del tamaño de poros y volumen total de poros. El ensayo consiste en forzar el mercurio a penetrar dentro de los poros y huecos de un material aplicando presión. La entrada o salida de líquido al poro depende de la presión externa del líquido.

Los poros más grandes son llenados a las presiones más bajas. La medida depende de la tensión interfacial, las fuerzas capilares y la presión. Son factores importantes a tener en cuenta la forma general de los poros (cilíndricos, esféricos, chatos), el área superficial y la tortuosidad (Day, y col., 1994; Portsmouth, y col., 1991).

Los objetivos de este capítulo fueron:

- Obtener cápsulas con extractos de yerba mate a través de dos tipos de sistemas de encapsulación: Sistema Simple de alginato de calcio (SS) y Sistema Compuesto (SC) de almidón-alginato de calcio.
- Optimizar la relación entre los constituyentes del sistema de encapsulación: almidón: alginato de calcio para maximizar el contenido de compuesto activo.
- Caracterizar macro y microestructuralmente los sistemas encapsulados.

## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1. Preparación de cápsulas

Como material encapsulante se utilizó alginato de sodio al 2% p/v (Sigma–Aldrich, EE.UU), el cual fue disuelto en el extracto acuoso de yerba al 3 % p/v. Se llevó a cabo la gelificación por goteo en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 0,05 M usando una bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson ®, Francia) a 45 rpm (Fig. 4.5). 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 para eliminar el exceso de iones calcio (Deladino, y col., 2008). A estas cápsulas se las denominó Sistemas simples (SS).

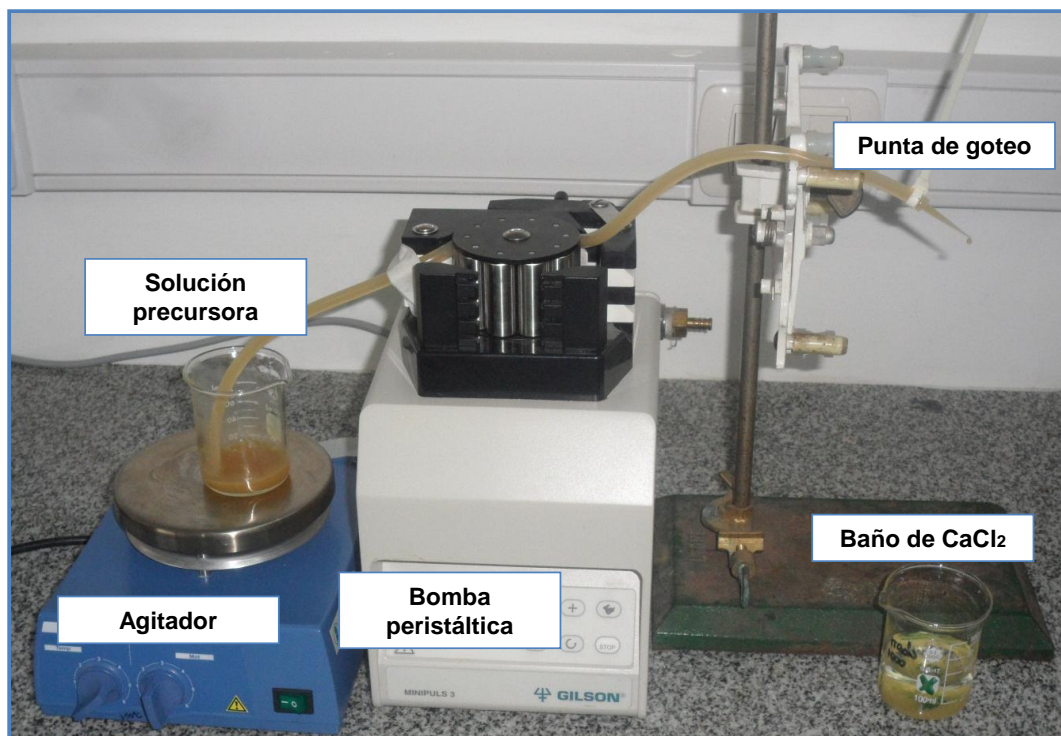


Figura 4.5. Montaje empleado en la obtención de cápsulas por gelificación iónica.

Los sistemas compuestos (SC) se obtuvieron a partir de mezclas de la solución de alginato de sodio al 2% (p/v) en extracto yerba mate, como se describió anteriormente, y almidón de maíz comercial (Maizena®) en diferentes concentraciones (0,1; 0,5; 1; 2, 5 y 10% p/v). Para la formación de las cápsulas se procedió como en la obtención de las cápsulas del sistema simple (SS).

#### 4.2.2. Secado de las cápsulas

Las muestras fueron llevadas a una estufa de convección forzada (San Jor, Argentina), a una temperatura de 65 °C durante 3 horas. Posteriormente éstas fueron enfriadas en un desecador y almacenadas en recipientes herméticos para ser usadas en los ensayos posteriores.

#### 4.2.3. Determinación de las propiedades fisicoquímicas

El contenido de humedad de las cápsulas fue determinado por el método gravimétrico, secando en estufa de aire forzado a 105 °C hasta peso constante (AOAC, 1998). La medición de actividad acuosa ( $a_w$ ) se realizó a 25 °C, utilizando el método higrométrico (AOAC, 1998), en un equipo Aqualab Serie 3 TE (Decagon, Inc. EE.UU). La densidad aparente ( $\rho_A$ ), fue calculada como el cociente entre la masa de una cantidad determinada de cápsulas húmedas y el volumen ocupado por las mismas en una probeta. Este último ensayo se realizó por cuadruplicado (Abdullah, y col., 1999).

#### 4.2.4. Determinación del tamaño y la forma de las cápsulas

Para la determinación del diámetro se tomaron fotografías de al menos 50 cápsulas húmedas, en forma aleatoria en distintos ensayos mediante un estereomicroscopio MZ 10F con cámara DFC 490 (Leica, Alemania). Las medidas de los diámetros fueron realizadas usando el software libre analizador de imágenes ImageJ (Schneider, y col., 2012).

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

$$fe = \frac{d_{max} - d_{min}}{d_{max} + d_{min}} \quad \text{Ec. 4.1.}$$

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).

#### 4.2.5. Cálculo de la eficiencia de encapsulación (%EE)

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

$$\% EE = \left( \frac{m_c}{m_e} \right) \times 100 \quad \text{Ec 4.2}$$

Donde  $m_c$  corresponde a la masa de PT encapsulados, 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% p/v) durante 2h, en un agitador orbital (Lab-Line Instruments, EE.UU) a 37°C y 125 rpm. El citrato de sodio actúa como quelante desintegrando el gel de alginato de calcio completamente (Draguet, 2000). La masa de PT en ambos casos fue medida por el método de Folin-Ciocalteu descrito en la sección 3.2.2.1 y se expresaron como mg equivalentes de AcCl.

#### 4.2.6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las micrografías SEM de las cápsulas secas fueron obtenidas empleando un microscopio FEI-Quanta 200 (Holanda). Las muestras se adhirieron con una cinta de doble faz sobre los portamuestras cilíndricos, se metalizaron con una capa de oro y se examinaron empleando un voltaje de aceleración de 20 kV.

Los cortes transversales de las cápsulas se obtuvieron mediante criofractura, sumergiendo los encapsulados en nitrógeno líquido.

#### 4.2.7. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Se realizó el análisis FT-IR de las bandas características presentes en el extracto de yerba mate liofilizado, alginato de sodio, almidón de maíz nativo, cápsulas SS con y sin extracto y cápsulas SC con extracto de yerba mate.

Las muestras fueron mezcladas con KBr (1:100) y molidas cuidadosamente con mortero de ágata. Luego se prepararon discos semitransparentes de KBr

de 7mm. Los espectros fueron tomados en el modo de transmisión entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ , adquiriendo 64 escaneos en promedio con resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Se empleó un equipo Nicolet IS-10 (Thermo Scientific, EEUU) y el análisis espectral fue realizado usando el software Omnic version 8.1. (Thermo Scientific, Inc, EEUU).

#### 4.2.8. Análisis térmico: Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El estudio de las propiedades térmicas de los encapsulados fue realizado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC Q100, TA Instruments, E.E.U.U). Se utilizó un patrón de Indio para la calibración del equipo. Las muestras (3-5 mg) se colocaron en cápsulas de aluminio y se cerraron herméticamente. Como referencia se empleó una cápsula vacía. Las muestras fueron calentadas a una velocidad de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , desde 25  $^{\circ}$  hasta 300  $^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.9. Determinación de porosidad mediante PIM

La técnica utilizada para determinar la distribución de tamaño de poro en los sistemas encapsulados fue la porosimetría de intrusión de mercurio (PIM). Esta técnica determina el volumen de mercurio forzado a entrar en los poros como una función de la presión. En el ensayo, la muestra se coloca en un recipiente impermeable. El recipiente con la muestra en su interior es sometido a vacío (a fin de desgasificar la muestra) y rellenado con un volumen conocido de mercurio. A continuación se aplica presión al mercurio de forma progresiva, produciéndose una intrusión gradual del mercurio en el medio poroso

evacuado, seguida por la extrusión (es decir la expulsión del mercurio desde la estructura porosa) a medida que la presión va disminuyendo. Para cada intervalo de presión considerado, el volumen de mercurio absorbido indica el volumen de poros de la muestra que tienen un determinado intervalo de tamaño de acceso (Day, y col., 1994; Tsakiroglou, y col., 1990). Se empleó un equipo Pascal 440 Thermo Fisher, el cual permite analizar poros de hasta 37 Å (0,1 nm) de radio. Para todas las muestras la presión máxima de Hg aplicada fue de 400 MPa. Ambos tipos de cápsulas fueron secadas previamente siguiendo el procedimiento 4.2.2, y luego se pesaron para la determinación. El ensayo se realizó por duplicado en cada caso. El tratamiento de los datos experimentales fue realizado, mediante la ecuación de Washburn (1921):

$$r = 2 \sigma \cos \alpha / P \quad \text{Ec. 4.3}$$

Donde:  $r$  es el radio equivalente de poro,  $\sigma$  es la tensión superficial del mercurio a la temperatura de ensayo,  $\alpha$  el ángulo de contacto entre el mercurio y el material y  $P$  es la presión aplicada.



### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Obtención de cápsulas

Se obtuvieron cápsulas de SS y SC, conteniendo extracto de yerba mate. En las cápsulas SC se analizó la influencia de las concentraciones de almidón en la eficiencia de encapsulación de extracto. En la Fig. 4.6 se comparan las eficiencias de encapsulación del sistema simple (SS) y los sistemas compuestos (SC).

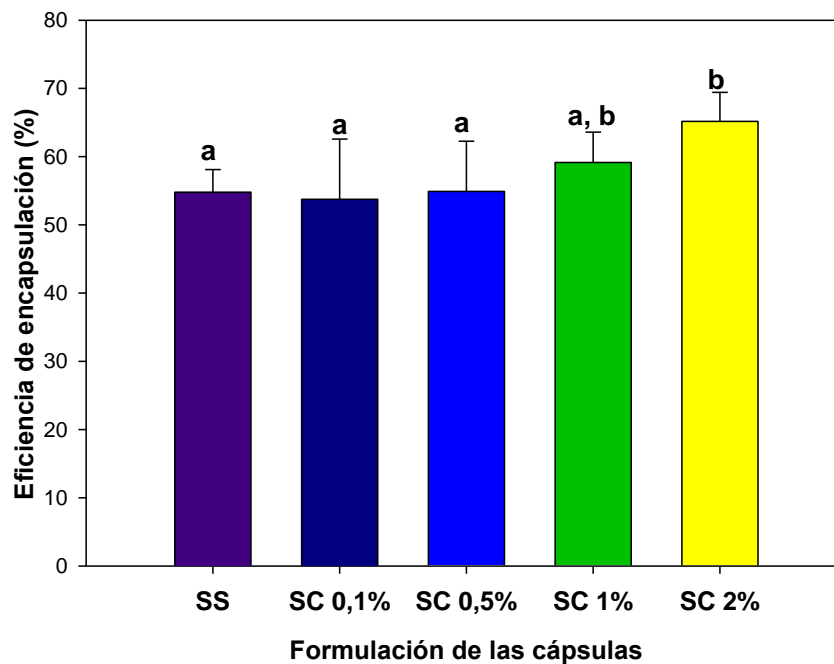


Figura 4.6. Efecto del contenido de almidón sobre la eficiencia de encapsulación en sistema simple (SS) y compuestos (SC). Los porcentajes de los SC indican contenido de almidón y letras diferentes sobre las barras corresponden a muestras con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Se obtuvo una eficiencia de encapsulación promedio del 55 % para el sistema simple. No se observaron diferencias significativas con el agregado de almidón

en concentraciones del 0,1; 0,5 y 1 %, determinándose valores de eficiencia similares a las del sistema simple.

Con la incorporación de almidón al 2% se obtuvo una eficiencia de encapsulación del 65 %. Este valor fue mayor que el obtenido para el SS y los SC con almidón al 0,1 y 0,5 % ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre los SC con almidón al 1 y 2%. En los SC adicionados con almidón al 5 y al 10% (datos no mostrados), no se observaron mejoras en la eficiencia respecto a los SC con almidón al 1 y 2%, 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. Teniendo en cuenta el objetivo de este trabajo de obtener sistemas multifuncionales, esta concentración de almidón permitiría incorporar a futuro una mayor cantidad de un segundo compuesto activo vehiculado por el almidón.

Sultana, y col. (2000) realizaron estudios agregando almidón de maíz resistente como material de relleno prebiótico para encapsular bacterias probióticas. Estos autores observaron que si bien aumentaba la eficiencia de encapsulación de bacterias en mezclas de alginato de sodio al 2% y almidón al 2%, el agregado de este último, a concentraciones superiores al 4% no influía en forma significativa en la eficiencia de encapsulación. Otros autores han logrado encontrar efectos positivos sobre la eficiencia de encapsulación de diferentes compuestos activos, añadiendo almidón en concentraciones entre el 10-60% (Chan, y col., 2011b; Rassis, y col., 2002).

La Fig. 4.7, muestra fotografías de los sistemas de encapsulación obtenidos a partir de las formulaciones seleccionadas.

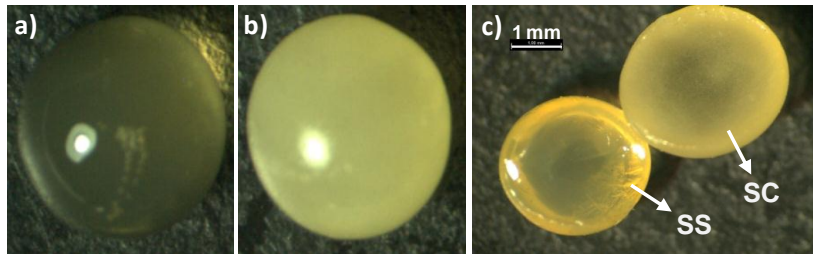


Figura 4.7. Fotografías de los sistemas encapsulados: a) cápsula de alginato de calcio (SS), b) cápsula de almidón-alginato de calcio (SC) y c) corte transversal de SS y SC.

En el caso del sistema compuesto, se evidencia la presencia de almidón por la mayor opacidad respecto a las cápsulas de alginato de calcio (Fig. 4.7). Para facilitar la visualización de los gránulos de almidón se realizaron tinciones de las cápsulas por inmersión en solución de  $I_2$ -IK diluida. En la Fig. 4.8 se observan los gránulos de almidón teñidos en el exterior y en el interior de los encapsulados.



Figura 4.8. Cápsula SC teñida con solución de  $I_2$ -IK: a) interior y b) exterior

Con respecto a las características morfológicas y fisicoquímicas de las cápsulas en estado húmedo, en la mayoría de los parámetros se observaron valores similares para ambos sistemas (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Caracterización de sistemas encapsulados húmedos

Formulación	Díámetro (mm)	Fe	$\rho_A$ (g/cm <sup>3</sup> )	$a_w$	Humedad (%)
SS	3,88±0,23	0,04±0,01	0,78±0,03	0,98±0,00	96,66±0,13
SC	3,69±0,21	0,03±0,01	0,79±0,03	0,98±0,01	94,81±0,11

Chan, y col. (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.

La distribución de tamaño uniforme y la alta esfericidad de las cápsulas también puede atribuirse al control de las variables del proceso de gelificación iónica: concentración de la solución de alginato, tamaño de orificio de goteo, distancia de caída de la gota y tiempo de inmersión en CaCl<sub>2</sub>. La obtención de sistemas de forma y tamaño homogéneo facilita su manipuleo y aplicación como ingrediente en alimentos (Chan, y col., 2009; Shi, y col., 2011).

#### 4.3.2. Análisis SEM

En las micrografías SEM se observó que las cápsulas perdieron cierta esfericidad luego del secado, dicho efecto fue más marcado en el SS (Fig. 4.9 a y c). En el caso de los SC la disposición del almidón en la matriz encapsulante, constituye un refuerzo que permite mayor conservación de la forma durante el secado (Fig. 4.10 a).

Las cápsulas secas de alginato de calcio presentaron una superficie con poros y grietas (Fig. 4.9. b). Similar a la observada por Fundueanu y col. (1998) en este tipo de encapsulado. Además, en estos sistemas se observó una estructura formada por varias capas de alginato (Fig. 4.9. d) y un interior hueco (Fig. 4.9. c). Este comportamiento fue atribuido al proceso de obtención de los encapsulados; debido a que cuando la solución de alginato de sodio entra en contacto con la solución gelificante que contiene iones calcio ocurre la gelificación instantánea en la interface, con el tiempo los iones calcio difunden en la solución e interaccionan formando una red (George, y col., 2006).

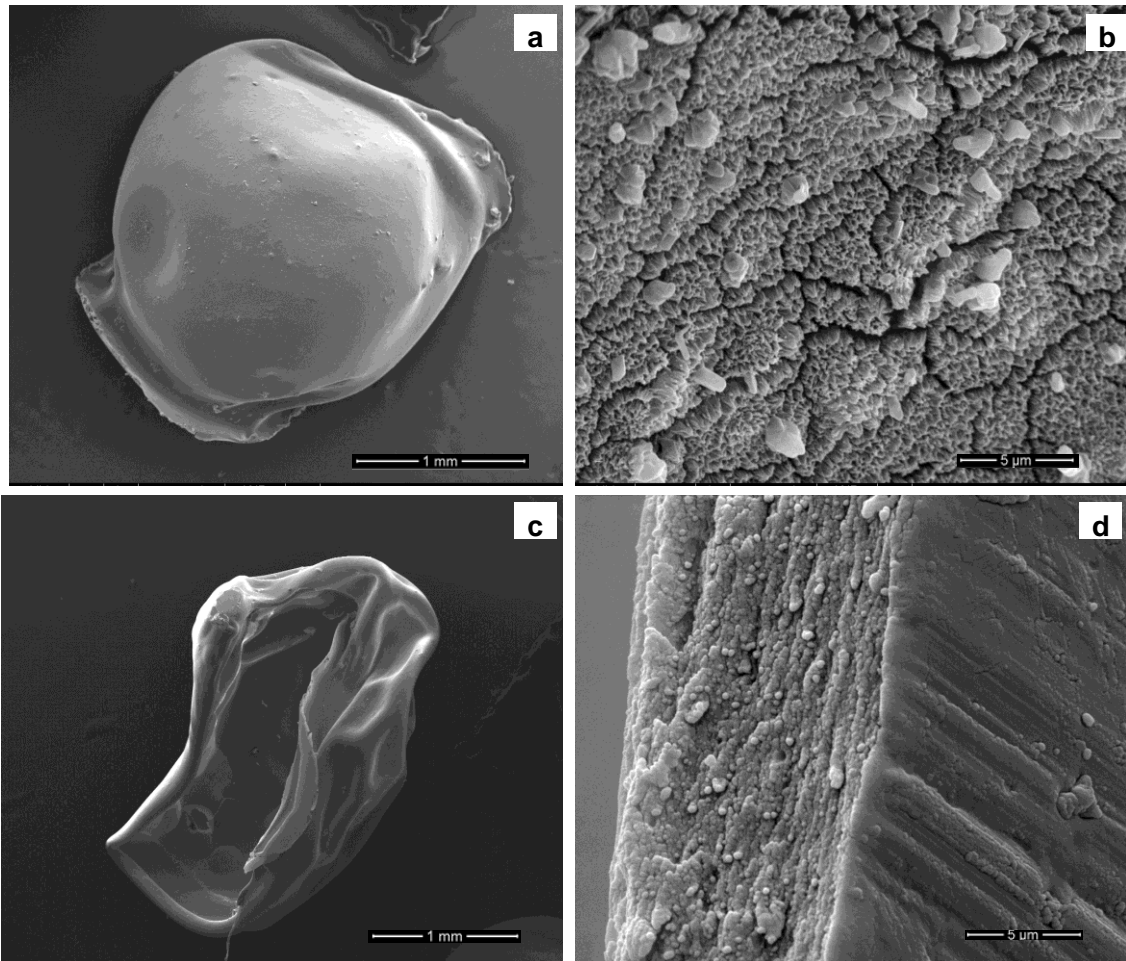


Figura 4.9. Fotografías SEM de SS: (a) y (b) superficie de las cápsulas y (c) y (d) corte transversal.

La máxima dureza del gel se registra en la superficie, ya que la concentración de alginato de calcio es mayor en ésta y disminuye hacia el centro, por lo que los geles obtenidos no son homogéneos (Draguet, 2000; Goh, y col., 2012).

Respecto a los sistemas compuestos, se observó la presencia de los gránulos de almidón en la superficie de la cápsula y en el interior de la matriz (Fig. 4.10). La superficie de estos encapsulados resultó menos porosa que en los sistemas simples (Fig. 4.10b).

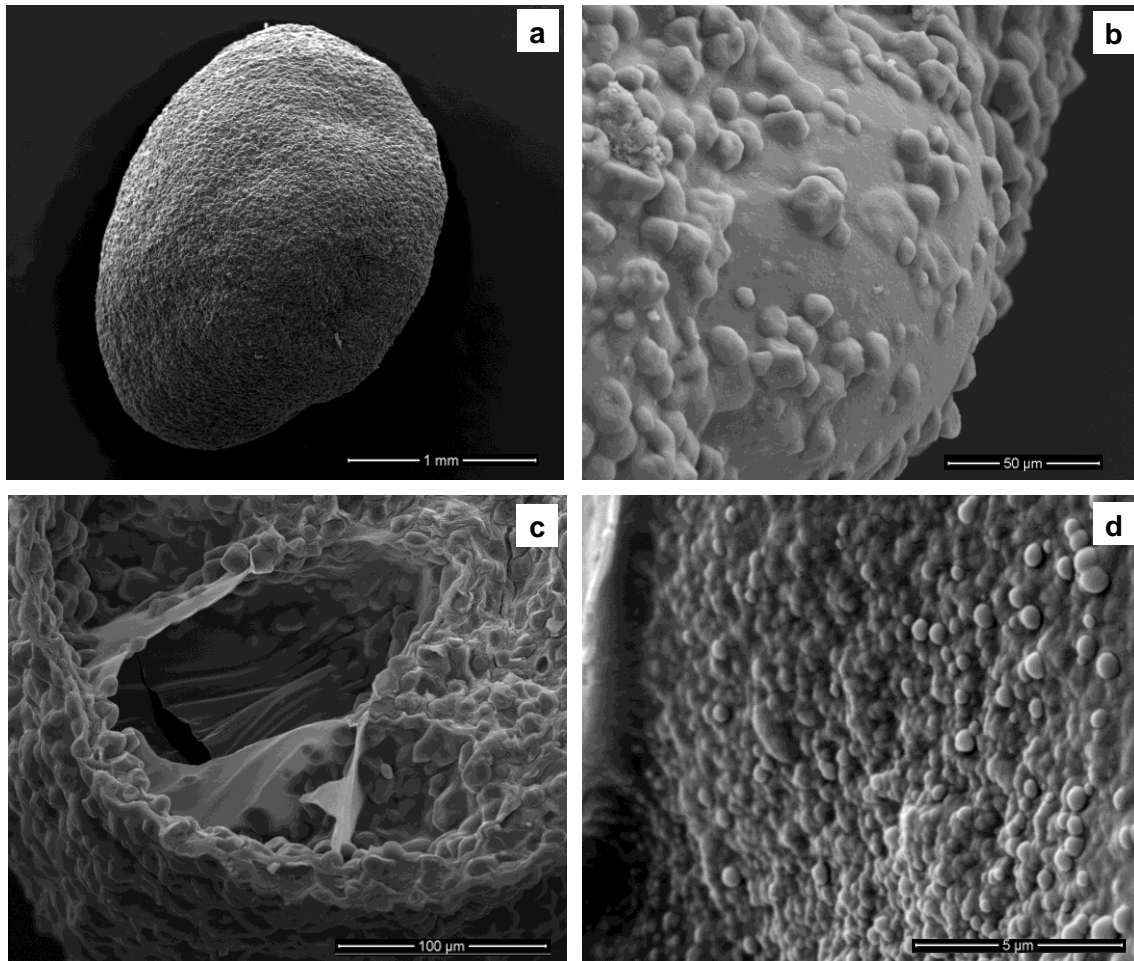


Figura 4.10. Fotografías SEM de SC (a) y (b) superficie de las cápsulas y (c) y (d) corte transversal.

Chan y col. (2011b) en microtomografías obtenidas por rayos-X de cápsulas liofilizadas de almidón-alginato de calcio, encontraron que la concentración del almidón fue mayor alrededor del núcleo interno que cerca de la superficie de las cápsulas. Este efecto se atribuyó al proceso de gelificación, debido a que en este se forman capas densas de alginato de calcio en la superficie dejando menos "espacio disponible" para ser ocupado por el relleno, en comparación con el núcleo interno.

### 4.3.3. Análisis FT-IR

La Fig. 4.11 muestra los espectros IR del extracto liofilizado de yerba mate (Curva A), alginato de sodio (Curva B), cápsulas SS sin y con extracto de yerba mate (Curva C y D), almidón de maíz nativo (Curva E) y cápsulas SC con extracto de yerba mate (Curva F). El análisis IR permitió la identificación de los grupos funcionales presentes y las interacciones matriz-compuesto activo en cada sistema.

El espectro IR del extracto de yerba mate (Curva A) presentó las bandas características de los compuestos fenólicos. Se observó una amplia banda centrada alrededor de  $3380\text{ cm}^{-1}$  asignada al estiramiento de los grupos -OH y un hombro a  $3218\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a los grupos hidroxilos involucrados en una unión puente hidrógeno intermolecular. También se observaron en el espectro del extracto acuoso de yerba mate picos a  $1520\text{ cm}^{-1}$  atribuidos a la vibración -C=C- de un anillo aromático y una banda correspondiente al estiramiento del grupo -C=O a  $1270\text{ cm}^{-1}$  (Anbinder, y col., 2011; Sivam, y col., 2012).

El alginato de sodio (Curva B) mostró un espectro característico de sus unidades sacarídicas. Se observaron picos alrededor de 3447, 1613, 1415 y  $1033\text{ cm}^{-1}$ , atribuidos al estiramiento de los grupos -OH,  $\text{COO}^-$  (asimétrico),  $\text{COO}^-$  (simétrico) y C-O-C, respectivamente (Kačuráková, y col., 1996; Wong, y col., 2002).



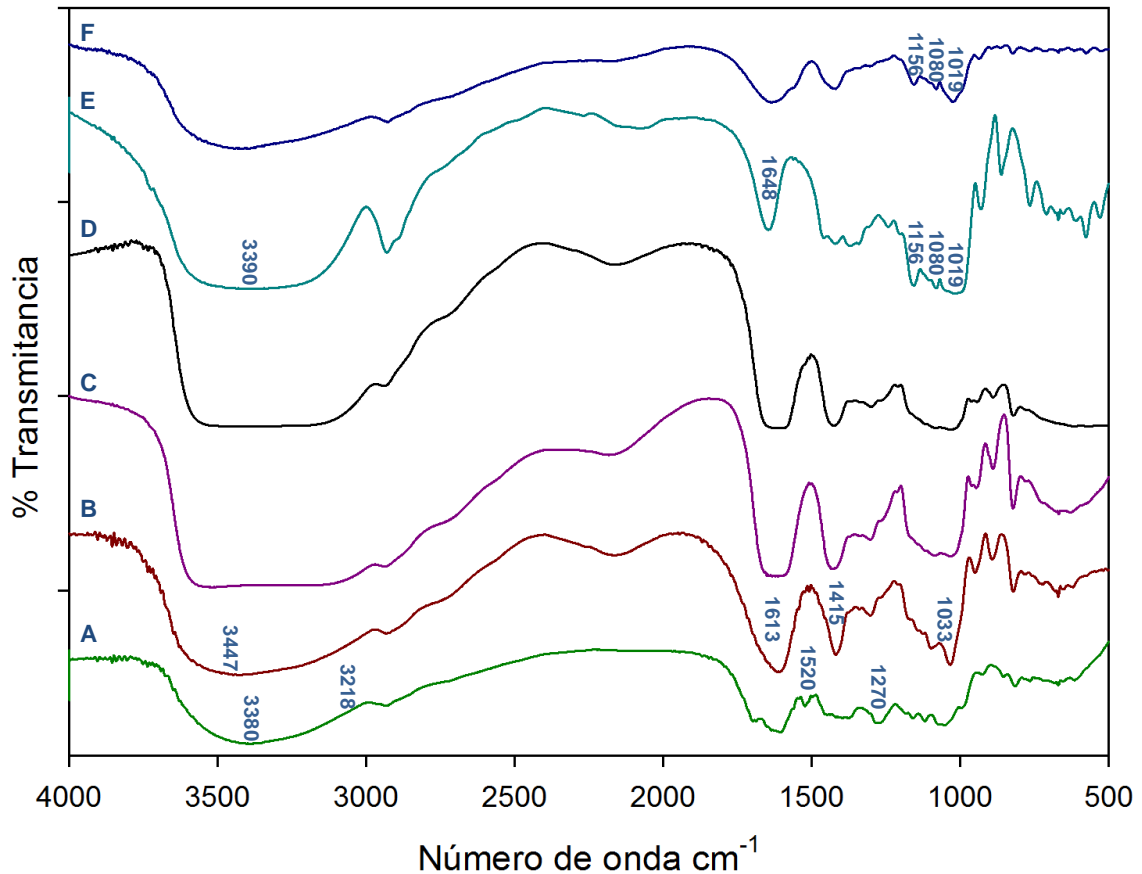


Figura 4.11. Espectros IR de extracto liofilizado de yerba mate (Curva A), alginato de sodio (Curva B), cápsulas SS sin y con extracto de yerba mate (Curva C y D), almidón de maíz nativo (Curva E) y cápsulas SC con extracto de yerba mate (Curva F).

Con la formación del gel de alginato de calcio las bandas correspondientes a los grupos  $\text{COO}^-$  del alginato de sodio se ensanchan (Curvas C, D y F), probablemente debido al intercambio entre los iones de calcio y sodio en los bloques del polímero, generando un nuevo entorno alrededor del grupo carbonilo (Anbinder, y col., 2011; Sartori, y col., 1997).

En los sistemas encapsulados conteniendo extracto de yerba mate SS y SC (Curvas D y F), se observaron cambios en la intensidad de la banda atribuida a la vibración de un anillo aromático ( $-\text{C}=\text{C}-$ ) característica de los compuestos

fenólicos presentes en el extracto de yerba mate. Este comportamiento se atribuyó a interacciones entre la matriz encapsulante y el compuesto activo y a la distribución de este último en el interior del sistema encapsulado. Anbinder, y col. (2011) encontraron cambios relevantes en el espectro FT-IR de cápsulas conteniendo extracto de yerba mate principalmente en la región comprendida entre  $1570 - 1540 \text{ cm}^{-1}$ . Dichos cambios fueron atribuidos a la interacción entre los grupos polares del compuesto activo con los grupos hidroxilos o carboxílicos del polímero de alginato.

El espectro IR de las cápsulas adicionadas de almidón al 2% presentó cambios principalmente en la región comprendida entre  $1500-900 \text{ cm}^{-1}$  (Curva F). En estas cápsulas se obtuvo un espectro similar al de almidón nativo (Curva E). Se observaron señales alrededor de  $1156$ ,  $1080$  y  $1019 \text{ cm}^{-1}$  atribuidas a las vibraciones de las uniones C-O y C-C de las unidades de glucosa. La banda ubicada a  $3390 \text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento de los grupos  $-\text{OH}$ . Estos resultados coinciden por los reportados en la literatura (Błaszczak, y col., 2005; Kizil, y col., 2002; Sivam, y col., 2012).

#### 4.3.4. Análisis térmico (DSC)

La Fig. 4.12 muestra los termogramas de DSC de extracto liofilizado de yerba mate (Curva A), alginato de sodio (Curva B) y cápsulas con y sin extracto de yerba mate de SS (Curva C y D) y SC (Curva E y F), respectivamente.

El extracto de yerba mate mostró una única transición endotérmica cercana a los  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  (Curva A). El pico obtenido fue ancho posiblemente debido al efecto sinérgico de los compuestos presentes en el extracto que tienen transiciones

en este rango de temperatura. El alginato de sodio mostró un pico exotérmico de descomposición a los 225 °C (Curva B). Picos similares fueron obtenidos por Anbinder, y col. (2011) y Sarmiento, y col. (2006) a temperaturas de 240, y 247 °C respectivamente. En los termogramas de los encapsulados (Curvas C-F), el pico característico del alginato de sodio no fue observado debido a la formación de la estructura de “caja de huevo” con los iones calcio.

Para las cápsulas SS sin y con extracto (Curvas C y D), se obtuvieron endotermas anchas con temperaturas de pico de 194 y 198 °C, respectivamente. De acuerdo a Sarmiento, y col. (2006) los picos endotérmicos están correlacionados con la pérdida de agua asociada a los grupos hidrofílicos de los polímeros.

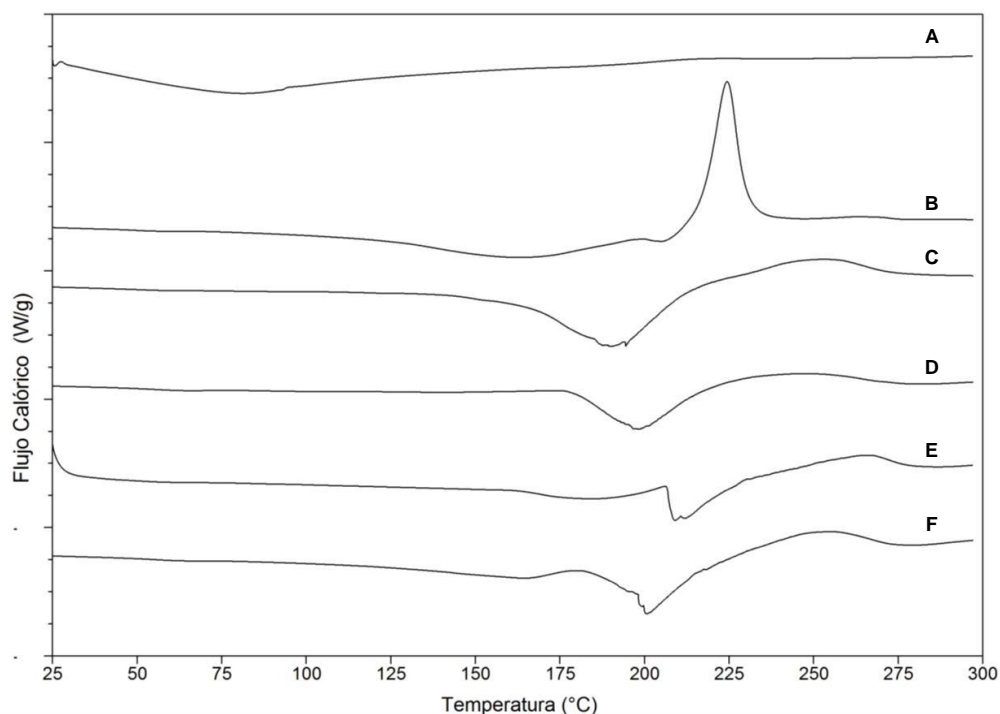


Figura 4.12 Termogramas DSC de extracto seco de yerba mate (Curva A), alginato de sodio (Curva B) y cápsulas sin y con extracto de yerba mate de SS (Curva C y D) y SC (Curva E y F), respectivamente.

Con la inclusión de almidón al sistema SC las endotermas se desplazaron hacia temperaturas mayores a valores de 209 y 201 °C para cápsulas sin y con extracto, respectivamente (Curvas E y F). Este desplazamiento podría atribuirse a cambios en la matriz de alginato de calcio con la adición de almidón, como se observó en el análisis FT-IR (sección 4.3.3).

La detección de la endoterma de gelatinización del almidón en el sistema SC fue difícil de identificar, debido a la baja concentración de este polímero y de agua. Sin embargo, en ensayos complementarios al incrementarse suficientemente la cantidad de agua; se detectó el pico de gelatinización a 71 °C, característico del almidón de maíz.

La determinación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de las cápsulas secas es de gran importancia como una medida de su estabilidad durante el almacenamiento. El pasaje del estado vítreo al amorfo facilitaría la movilidad de los polifenoles encapsulados, pudiendo perder su actividad antioxidante o facilitando su interacción con otros componentes cuando los encapsulados forman parte de un alimento complejo. La Fig. 4.13, muestra las temperaturas de transición vítrea halladas mediante DSC, para los SS y SC secos.

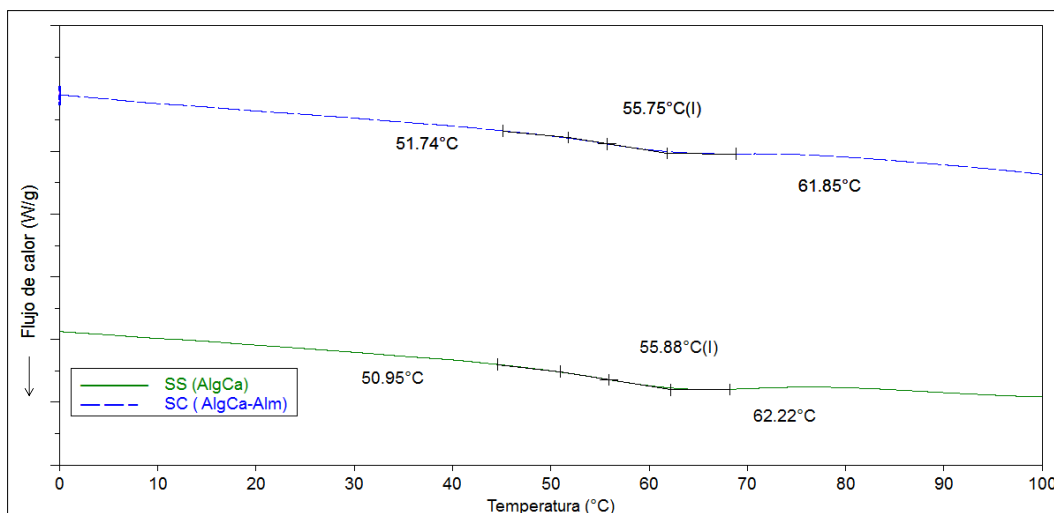


Figura 4.13. Temperaturas de transición vítrea para SS y SC con extracto acuoso de yerba mate.

La Tg de las cápsulas SS y SC se encontró a valores superiores a la temperatura ambiente lo cual es indicativo de una buena estabilidad del producto. La difusión del oxígeno, que altera la estabilidad de los compuestos antioxidantes y bioactivos, se encuentra disminuida en el estado vítreo. Sin embargo, con un aumento de la temperatura o humedad ambiente, la matriz puede convertirse en gomosa acelerando el proceso de difusión (Deladino, 2010; Gabbott, 2008).

#### 4.3.5. Porosimetría por intrusión de mercurio

En la Fig. 4.14 se observa la distribución de tamaño de poro para SS y SC. Se obtuvieron tamaños de poro comprendidos entre 1-10000 nm con un diámetro promedio de 100 nm, para ambos sistemas. Estos resultados corresponden a los reportados en literatura (George, y col., 2006; Klein, y col., 1983).

La clasificación respecto al tamaño de poro de los sistemas encapsulados se realizó teniendo en cuenta las siguientes categorías (Day, y col., 1994): microporos, los más pequeños por debajo de los 2 nm de diámetro, mesoporos, los cuales tienen un tamaño de entre 2 y 50 nm y macroporos con tamaño de 50 nm o más.

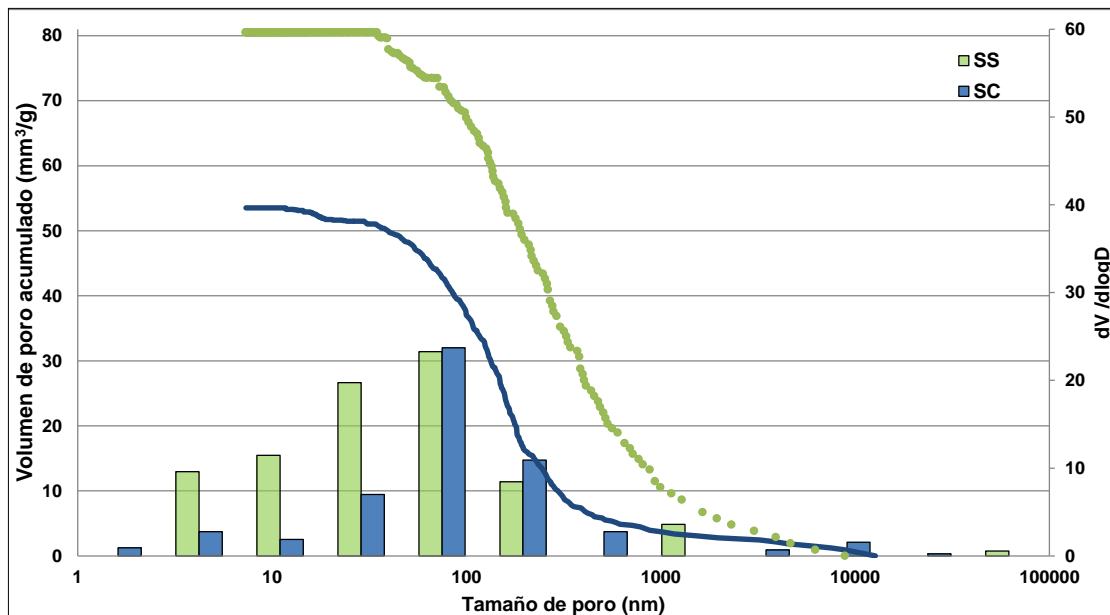


Figura 4.14. Distribución de tamaños de poro para SS y SC. Eje principal: Volumen acumulado de poros (Gráfico de líneas), Eje secundario:  $dV/d \log D$  (Gráfico de barras).

Las cápsulas de alginato de calcio resultaron más porosas que las que contenían almidón al 2%. En los sistemas compuestos el agregado de almidón modificó el perfil de distribución de poros generando una disminución del volumen acumulado de poros, principalmente entre los 5-50 nm (Fig. 4.14). Este comportamiento fue atribuido a la distribución de almidón en el interior de

la matriz (Fig. 4.10), el cual dificultaría el ingreso de mercurio en el ensayo debido a que aumenta la tortuosidad del sistema.

En las Figs. 4.15 y 4.16 se muestran las curvas de intrusión-extrusión de Hg para SS y SC, respectivamente.

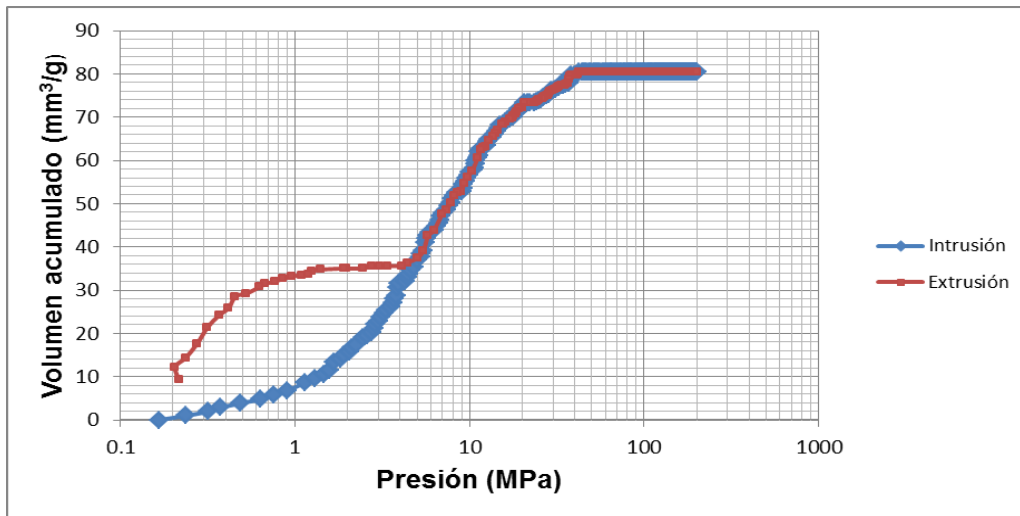


Figura 4.15. Curva de intrusión – extrusión de las cápsulas SS

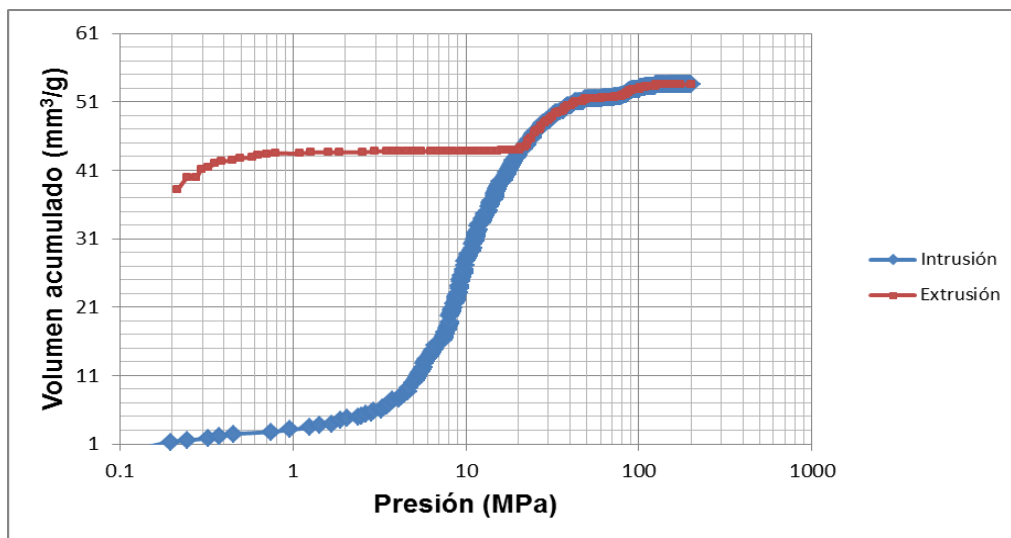


Figura 4.16. Curva intrusión – extrusión de las cápsulas SC

A baja presión el mercurio sólo está forzado a penetrar en los poros de mayor diámetro de los sistemas, cuando se aumenta la presión el mercurio penetra en los poros más pequeños (curva de intrusión). Una meseta (plateau) terminal bien definida en la curva de intrusión es indicativa de la penetración del mercurio dentro de un volumen total de poros identificable. Después de llegar a la máxima presión definida en el ensayo, comienza una reducción paulatina de la misma, permitiendo al mercurio salir de la red porosa del material (curva de extrusión). En general la baja presión de intrusión de Hg requerida en ambos sistemas, indica la presencia de macroporos (diámetro > 50 nm). Para el SS a valores bajos de presión (0,1 -10 MPa) un mayor volumen acumulado de Hg fue obtenido en comparación con el SC, estos resultados fueron atribuidos a la superficie macroporosa de las cápsulas de alginato.

Debido a la morfología de los poros y otros fenómenos físicos, la curva de extrusión no sigue la misma trayectoria que la curva de intrusión, este fenómeno es conocido como histéresis, e implica que para un mismo valor de presión, existe una diferencia entre el volumen de poros ocupado durante la intrusión de mercurio y el ocupado durante la extrusión. La histéresis de intrusión-extrusión y la retención de mercurio, dependen de la geometría de la red de poros tridimensional del material, y no simplemente de la distribución del tamaño de poro (Portsmouth, y col., 1991; Tsakiroglou, y col., 1990).

Day, y col. (1994) establecieron un modelo para estudiar el comportamiento de las curvas de intrusión-extrusión de mercurio en diferentes sistemas. Los resultados de la aplicación de este modelo mediante simulaciones llevadas a cabo con un buen número de datos experimentales de intrusión-extrusión sobre



sistemas bien caracterizados, han permitido proponer ciertas clases de comportamiento (Fig. 4.17).

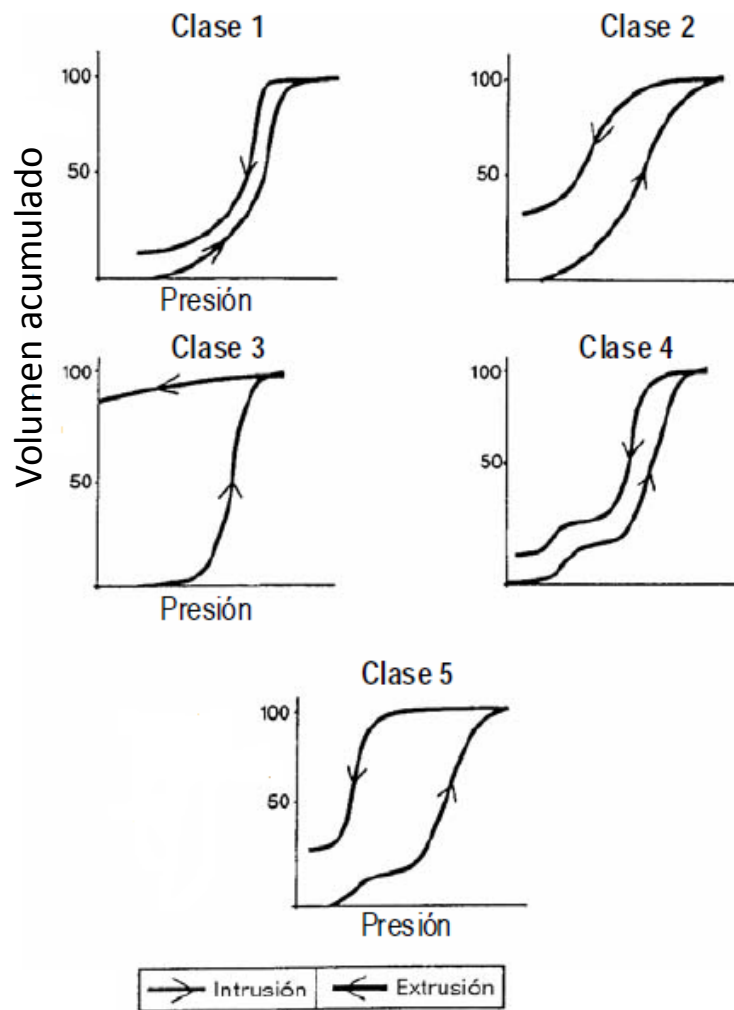


Figura 4.17 Clases de comportamientos de curvas de intrusión-extrusión según Day y col. (1994).

De acuerdo con el modelo de Day y col. (1994) las curvas de intrusión-extrusión de mercurio para los sistemas SS y SC fueron diferentes. En el caso del SS, este se caracterizó por una curva de intrusión abrupta con un claro límite a la intrusión. La extrusión presenta un ciclo de histéresis angosto y

paralelo. Este comportamiento representa un sistema unimodal angosto, correspondiente a la clase I (Fig. 4.15).

El sistema compuesto mostró una intrusión abrupta pero con un proceso de extrusión casi horizontal, correspondiente a la clase III (Fig. 4.16). En este sistema los cambios observables en la trayectoria de intrusión-extrusión se atribuyeron a la presencia del gránulo de almidón rellenando los espacios intersticiales de la matriz de alginato de calcio. Para Day, y col. (1994) dicho comportamiento es característico de sistemas complejos que contienen ya sea una distribución ancha de poros o cuellos muy angostos en cavidades más grandes .

#### 4.4. Conclusiones parciales

- 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 encapsulación de polifenoles totales de 55% en cápsulas de alginato de calcio y de 65% en los sistemas adicionados de almidón al 2%.
- El agregado de almidón al 2%, aumento la resistencia de las cápsulas al proceso de secado a 65 °C y permitió la obtención de sistemas menos porosos.
- Interacciones matriz-extracto de yerba mate, fueron evidenciadas mediante el análisis FT-IR y DSC. Los valores de Tg para ambos sistemas se encontraron aproximadamente 20°C por encima de la temperatura ambiente.

***Capítulo V. Cinética y mecanismos de  
liberación del extracto de yerba mate***

---

### 5.1. Liberación del compuesto activo

El desarrollo de sistemas de vehiculización y liberación controlada de compuestos activos es una de las estrategias de uso frecuente en la formulación de alimentos con propiedades funcionales. La liberación controlada se define como el mecanismo mediante el cual uno o más compuestos activos puede dirigirse a un sitio específico, en un tiempo y velocidad modulada (Arifin, y col., 2006; Mastromatteo, y col., 2010).

Las principales etapas involucradas en el proceso de liberación, son: 1) difusión del compuesto activo a la superficie 2) mecanismo de transporte desde la superficie de la matriz al medio y 3) disolución del compuesto activo en el medio circundante (Pothakamury, y col., 1995; Siepmann, y col., 2012).

La velocidad de liberación dependerá de factores internos y externos, tales como: geometría del sistema, tipo de matriz encapsulante, naturaleza del compuesto activo, cantidad de compuesto encapsulado, temperatura, solvente de liberación, velocidad de agitación, presión, pH (ácido, base, buffer), acción enzimática, entre otros (Pothakamury, y col., 1995; Siepmann, y col., 2008).

Los mecanismos más importantes que regulan la velocidad de liberación de un compuesto activo, son: *difusión*, *hinchamiento*, *biodegradación/ erosión* y *presión osmótica*. La relevancia de cada uno de ellos dependerá en gran medida de la composición de la matriz polimérica y del medio circundante, por lo que el agente activo puede ser liberado al medio por uno o por varios mecanismos actuando simultáneamente (Barba, y col., 2009).

### 5.1.1. Liberación por difusión

El comportamiento de liberación de agentes activos es el resultado del fenómeno de difusión en el polímero y de restricciones de transferencia de masa en la interfase polímero/líquido (Kaunisto, y col., 2011). La migración del compuesto activo al medio de liberación puede darse directamente a través de la estructura molecular del polímero o bien a través de macro o microporos existentes en la matriz polimérica (Siepmann, y col., 2012). El modelo más común para estudiar la difusión es el propuesto en las leyes de Fick:

- Primera ley de Fick

La primera ley de Fick establece que en estado estacionario, la velocidad de transferencia de una sustancia que difunde a través de la unidad de área de una sección, es proporcional al gradiente de concentración (Ec. 5.1).

$$J = -D \cdot \left( \frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad \text{Ec 5.1.}$$

En esta ecuación  $J$  es la velocidad de flujo por unidad de área,  $C$  es la concentración del compuesto que difunde,  $x$  es la dirección espacial normal a la sección y  $D$  el coeficiente de difusión.

- Segunda ley de Fick

La mayoría de las situaciones prácticas de difusión son en estado no estacionario. Es decir, el flujo de difusión y el gradiente de difusión varían con el tiempo. En condiciones no estacionarias el uso de la segunda ley de Fick resulta más apropiado (Ec. 5.2).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \cdot \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) \quad \text{Ec 5.2.}$$

En esta ecuación C es la concentración de la especie que difunde,  $t$  el tiempo,  $D$  el coeficiente de difusión y  $x$ ,  $y$  y  $z$  las coordenadas espaciales. Las condiciones iniciales y de frontera a tener en cuenta para la resolución de las ecuaciones varían para cada tipo de sistema de liberación (Siepmann, y col., 2012).

#### 5.1.2. Liberación por degradación o erosión

Los mecanismos de *degradación/erosión*, tienen mayor importancia en sistemas en los que el compuesto activo se encuentra disperso dentro del polímero y se libera a medida que éste se degrada (He, y col., 2005). En la literatura se suelen usar dichos términos indistintamente, no obstante para evitar confusiones algunos autores han establecido claras diferencias: la *degradación* es el proceso mediante el cual las cadenas del polímero matriz sufren ruptura

o hidrólisis de sus enlaces, generándose cadenas más cortas, sin pérdida de materia. Mientras que la *erosión* está referida a la disminución de masa de la matriz, la cual puede deberse a la pérdida de monómeros, oligómeros y otros productos solubles en el medio circundante (Lao, y col., 2011). La degradación ocurre de forma homogénea en toda la matriz, mientras que la erosión se limita a la capa superficial del sistema (Burkersroda, y col., 2002; Pothakamury, y col., 1995) (Fig. 5.1).

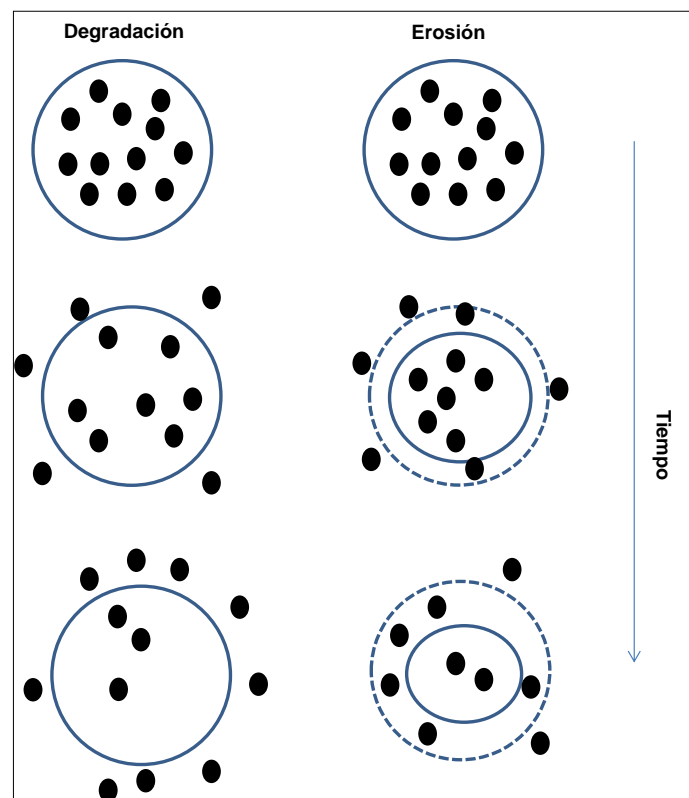


Figura 5.1. Esquema de mecanismos de degradación/erosión en cápsulas. Adaptado de Gopheric, (2002) y Pothakamury, (1995).

El mecanismo de erosión es más deseable, debido a que la velocidad de liberación se puede modificar variando la carga del compuesto activo mientras

se mantiene la integridad del sistema, dado que la erosión ocurre sólo en superficie (He, y col., 2005; Pothakamury, y col., 1995).

### 5.1.3. Liberación por hinchamiento

En el mecanismo de liberación por hinchamiento, cuando el sistema se encuentra en un medio termodinámicamente compatible, el polímero se hincha debido a la adsorción del medio y el compuesto activo puede difundir a través de la zona de la matriz que ha sufrido hinchamiento (Peppas, y col., 1993) (Fig. 5.2).

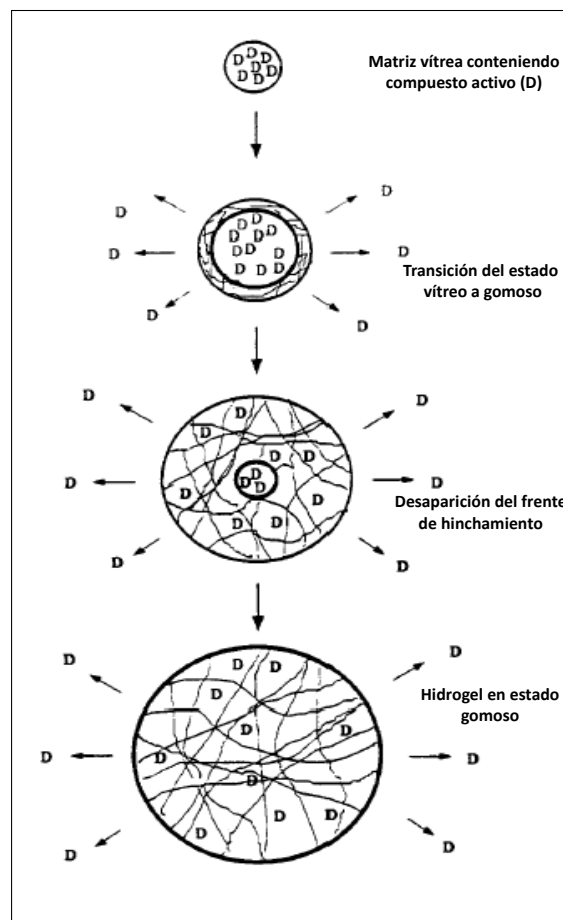


Figura 5.2. Esquema del mecanismo de liberación por hinchamiento. Adaptada de Peppas y col. (1993).



En este mecanismo las matrices pueden someterse a una transición de fase desde un estado vítreo, donde las moléculas atrapadas poseen poca movilidad, a un estado gomoso, de mayor movilidad donde las moléculas difunden con rapidez. La velocidad de liberación del compuesto activo depende de la velocidad de hinchamiento del gel. Por lo que el tiempo de difusión y el tiempo de relajación de las cadenas son dos parámetros fundamentales en los mecanismos de liberación de matrices poliméricas susceptibles de sufrir hinchamiento (Lin, y col., 2006; Pothakamury, y col., 1995).

Los objetivos del presente capítulo fueron:

- Estudiar la influencia del medio circundante sobre el perfil de liberación de los sistemas de encapsulación obtenidos, empleando fluidos digestivos simulados simples.
- Cuantificar el compuesto activo liberado en cada medio;
- Conocer el mecanismo de liberación de los diferentes tipos de encapsulados: aplicación de modelos matemáticos.

## 5.2. Materiales y métodos

### 5.2.1. Liberación de polifenoles en fluidos digestivos simulados

El ensayo de liberación de compuestos fenólicos en fluidos digestivos simulados se realizó empleando un método adaptado de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP34, 2011). Se introdujo una cantidad conocida de cápsulas en 25 mL de medio de liberación y se llevaron a un agitador orbital (Orbit Environ Shaker, Lab-Line Instruments, EEUU) a 37 ° C y 125 rpm durante 6 horas.

Inicialmente se realizó inmersión en Fluido Gástrico Simulado, FGS (HCl 0.1 M pH 2) durante 4 horas. Luego las cápsulas se filtraron, lavaron y se sumergieron por 2 horas en Fluido Intestinal Simulado, FIS (Buffer fosfato pH 7.5). En cada caso, se tomaron alícuotas del sobrenadante a diferentes tiempos.

La cantidad de compuestos fenólicos liberados a cada tiempo fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Liberación de PT} = \left( \frac{m_t}{m_\infty} \right) * 100 \quad \text{Ec 5.3}$$

Donde  $m_t$ , corresponde a la masa de PT liberada al tiempo  $t$  y  $m_\infty$  la masa máxima de polifenoles que se podría liberar a  $t=\infty$ , esta última fue determinada introduciendo la misma cantidad de cápsulas utilizada en el ensayo de liberación en una solución de citrato de sodio (5% p/v) hasta disolución

completa, en el agitador orbital a 37 ° C y 125 rpm. El valor de  $m_{\infty}$  es equivalente al parámetro  $m_c$  de la Ec 4.2. La masa de PT fue cuantificada por el método de Folin-Ciocalteu descrito en la sección 3.2.2.1 y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de AcCl.

### 5.2.2. Estudio de los mecanismos de hinchamiento y erosión de los encapsulados en FGS

Con el objetivo de analizar los mecanismos involucrados en la liberación de PT en FGS, se realizó un ensayo equivalente al descrito en el apartado 5.2.1 (37 °C / 125 rpm). Se prepararon varios tubos con igual masa de cápsulas y volumen de medio. A diferentes tiempos se seleccionó un tubo al azar, las cápsulas se filtraron, se secaron con papel Whatman No. 1 y se pesaron. El porcentaje de cambio de masa (%  $\Delta W$ ) fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta W(\%) = \left( \frac{W_t - W_0}{W_0} \right) * 100 \quad \text{Ec 5.4}$$

Donde  $W_t$  representa la masa (g) de las cápsulas en el tiempo t y  $W_0$  la masa (g) de cápsulas introducidas inicialmente. Valores de  $\Delta W > 0$ , corresponden a fenómenos de hinchamiento y  $\Delta W < 0$  a mecanismos de erosión (Wang, y col., 2010). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Además del cambio en la masa se estudió la variación en tamaño mediante seguimiento fotográfico utilizando un estereomicroscopio Leica MZ 10F con cámara Leica DFC 490 (Leica, Alemania). Los diámetros de los encapsulados se calcularon mediante uso del software libre analizador de imágenes ImageJ (Schneider, y col., 2012).

### 5.2.3. Aplicación de modelos matemáticos

Los perfiles de liberación de PT en FGS de los sistemas encapsulados, se analizaron mediante diferentes modelos matemáticos semiempíricos. Los parámetros de cada ecuación fueron calculados mediante el software DDSolver (Zhang, y col., 2010).

- Modelo de la ley de la potencia (Korsmeyer y Peppas, 1986)

$$\frac{m_t}{m_\infty} = k \cdot t^n \quad \text{Ec 5.5}$$

Donde  $m_t/m_\infty$ , representa la fracción de polifenoles liberada a cada tiempo  $t$ ,  $k$  es una constante relacionada con características estructurales y geométricas del sistema y  $n$  es el exponente que indica el tipo de mecanismo de liberación involucrado. Este modelo es válido para fracciones  $m_t/m_\infty < 0,6$  (Korsmeyer, y col., 1986; Ritger, y col., 1987).

- Modelo de difusión-relajación (Peppas y Sahlin, 1989)

$$\frac{m_t}{m_\infty} = k_d \cdot t^m + k_r \cdot t^{2-m} \quad \text{Ec 5.6}$$

La constante  $k_d$ , representa la contribución difusional, mientras que el segundo término,  $k_r$ , representa la contribución de la relajación del caso II, del modelo de Korsmeyer y Peppas (Korsmeyer, y col., 1986; Peppas, y col., 1989).

- Modelo de Berens-Hopfenberg

$$\frac{m_t}{m_\infty} = \left(1 - Ae^{-k_B t}\right) \quad \text{Ec 5.7}$$

Donde  $k_B$ , corresponde a la constante de velocidad de relajación y el término  $A$  involucra las contribuciones de los mecanismos Fickiano y no Fickiano (Berens, y col., 1978; Ganji, y col., 2010). Esta ecuación puede ser usada en los casos en que la fracción liberada de compuesto activo ( $m_t/m_\infty$ ) alcanza valores superiores 0,6 rápidamente, siendo el empleo del modelo de Korsmeyer y Peppas inapropiado.

### 5.3. Resultados

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

Se analizó la cinética de liberación de los PT en el tiempo, para el sistema simple (SS) y el sistema compuesto (SC), en estado húmedo y seco (Fig. 5.3 y Fig. 5.4). En ambos casos la totalidad de los polifenoles encapsulados fue liberada tras un período de 4 horas de inmersión en fluido gástrico simulado, lo que significó que el pasaje a través de FGS no habría modificado el contenido de polifenoles totales en ninguno de los sistemas.

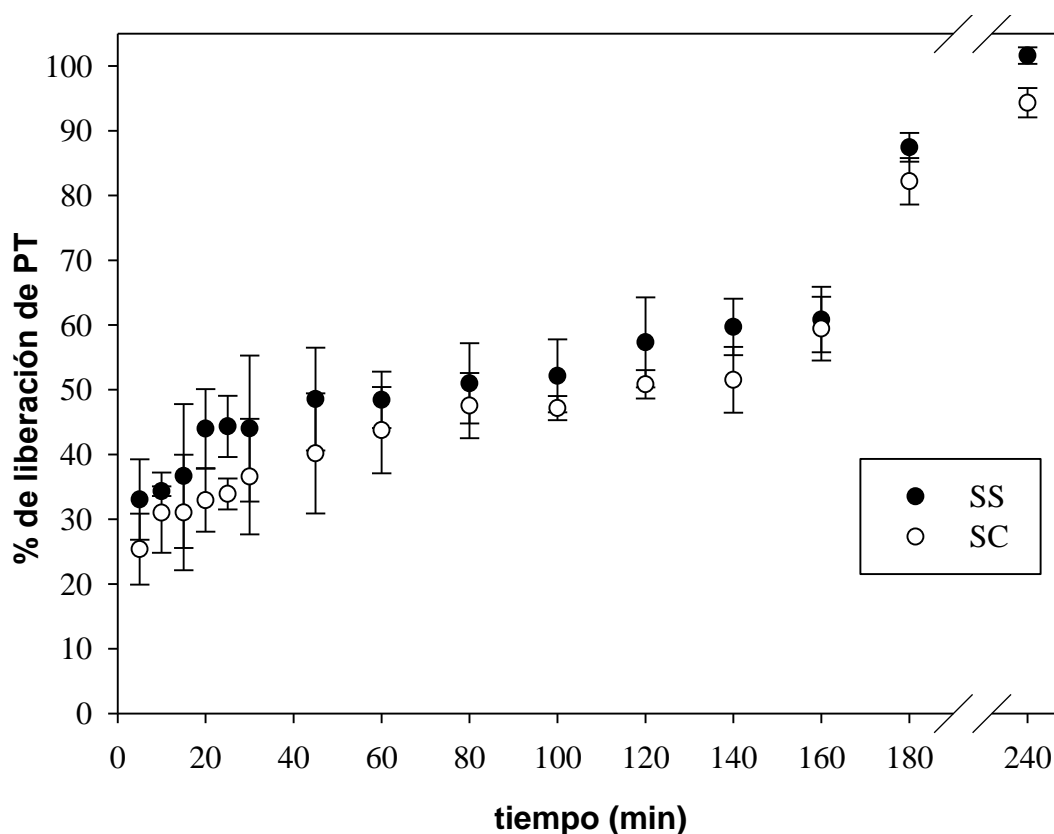


Figura 5.3. Perfiles de liberación en FGS para cápsulas húmedas.

En las cápsulas húmedas se observó una velocidad de liberación rápida, más del 25 % del total de polifenoles encapsulados fueron cuantificados en los primeros 5 min de ensayo (Fig. 5.3). Este hecho puede atribuirse a la liberación de los antioxidantes presentes en la superficie de los encapsulados que tiene fácil acceso al medio de liberación, solvente en el cual tienen alta solubilidad.

Posteriormente, entre los 5-160 min la cantidad de polifenoles liberada aumentó gradualmente, pero a menor velocidad. En ambos sistemas, la totalidad de PT encapsulada fue liberada entre los 160-240 min.

Si bien el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los perfiles de liberación de ambos sistemas ( $p>0,05$ ), se observó un efecto modulador del almidón sobre la velocidad de liberación de PT a lo largo de la cinética. En este sentido, al comparar el tiempo requerido para liberar el 50 % de los PT se obtuvieron valores de 60 min para el sistema SS y de 100 min para las cápsulas con relleno de almidón.

Con respecto a las cápsulas secas, la velocidad de liberación inicial en FGS fue aún mayor que en estado húmedo, liberándose más del 50% de PT en un tiempo de 5 y 25 min para SS y SC, respectivamente (Fig. 5.4).

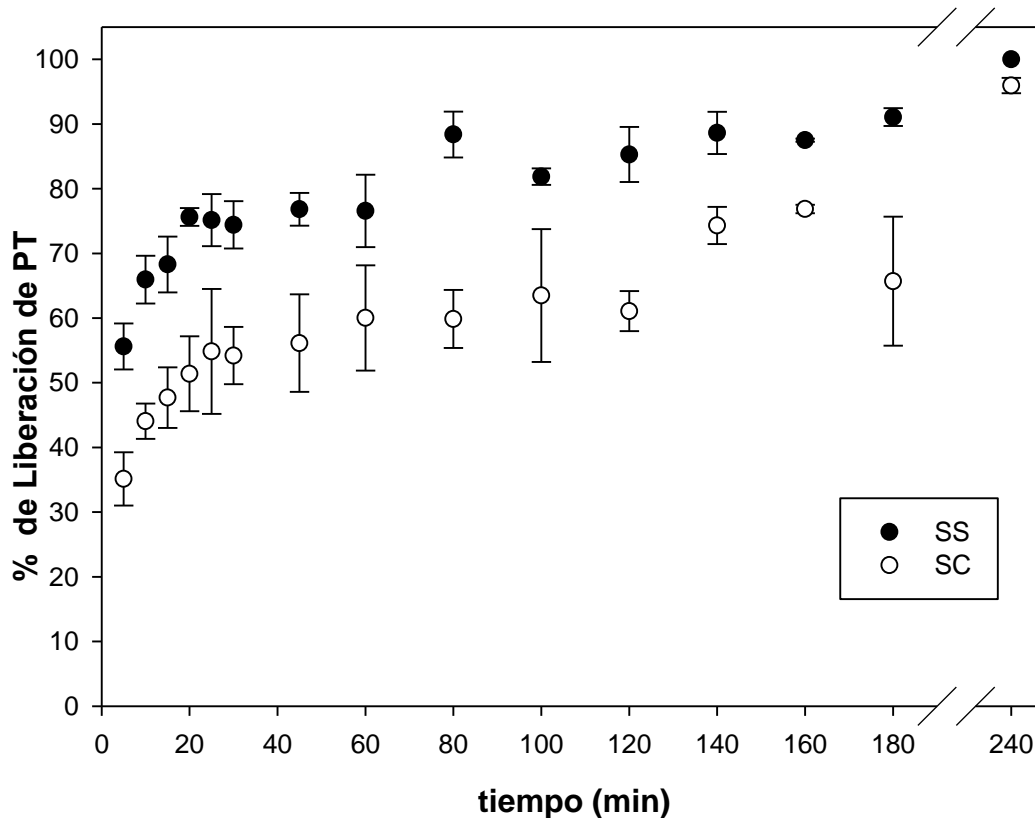


Figura 5.4. Perfiles de liberación en FGS para cápsulas secas

A tiempos mayores, la cantidad de PT liberada continuó en ascenso pero a menor velocidad, siendo este efecto más notorio en las cápsulas SC en las que el almidón modula sustancialmente la cinética de liberación (Fig. 5.4).

Los perfiles de liberación de ambas formulaciones secas resultaron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), siendo la velocidad de liberación de PT más lenta en el sistema con almidón adicionado al 2%.

La mayor velocidad de liberación en los primeros tiempos en sistemas secos podría ser atribuida al proceso de secado, durante el cual es factible la difusión y migración de los compuestos activos hacia la superficie. Los compuestos más solubles migrarían junto con el agua provocando una distribución desigual del



agente activo en la matriz polimérica, con una mayor concentración del mismo en la superficie (Huang, y col., 2001).

En general el efecto modulador debido a la incorporación de almidón en el SC, puede explicarse teniendo en cuenta el estudio de las características macro y microestructurales discutidas en el capítulo anterior. En el sistema compuesto, el almidón actúa como material de relleno reforzando la estructura y ocupando parcialmente los espacios internos de la matriz; disminuyendo así la porosidad del sistema. Los gránulos de almidón dispersos en la matriz actúan como barrera al flujo de solvente conduciendo sus moléculas a través de un camino tortuoso, que hace más lenta la liberación de compuesto activo (Fig. 5.5.).

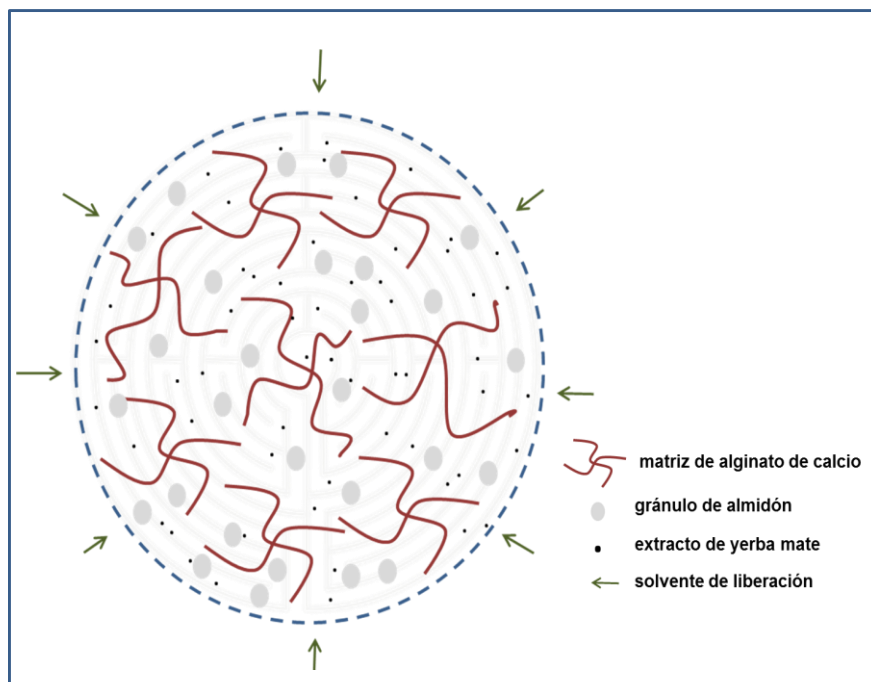


Figura 5.5. Representación esquemática de la tortuosidad del sistema compuesto

Varios autores han estudiado el efecto de agregado de relleno en diferentes matrices encapsulantes. Gal, y col. (2007) obtuvieron cápsulas de alginato empleando almidón como relleno al 10 %. El agregado de relleno contribuyó a la estabilidad de las matrices y disminuyó sustancialmente la velocidad de liberación en fluidos digestivos simulados. Por otro lado, Chang y col. (2011b) observaron en microtomografías obtenidas por rayos X de cápsulas liofilizadas de alginato reforzadas con almidón, una especie de “tela de araña” formada por puentes entre el material de relleno y el polímero matriz. Así, se generaría una estructura rígida en la que la tortuosidad de la misma hace más lenta la difusión del compuesto activo desde el interior de la cápsula al medio de liberación. El mismo efecto ha sido observado por otros autores con el agregado de rellenos inertes como bentonita, silicatos, celulosa, entre otros (Gal, y col., 2007; Puttipatkhachorn, y col., 2005; Rassis, y col., 2002; Sultana, y col., 2000).

### 5.3.2. Estudio de los mecanismos de erosión e hinchamiento

Luego del pasaje por la solución de fluido gástrico simulado, las cápsulas húmedas conservaron su forma esférica, aunque su tamaño inicial se vio reducido a lo largo del ensayo. El color verde característico del extracto de yerba mate desapareció paulatinamente hasta mostrar una apariencia translúcida en cápsulas de alginato y blanquecinas en cápsulas con almidón, ambos sistemas conservaron su integridad hasta el final del ensayo (Fig. 5.6).

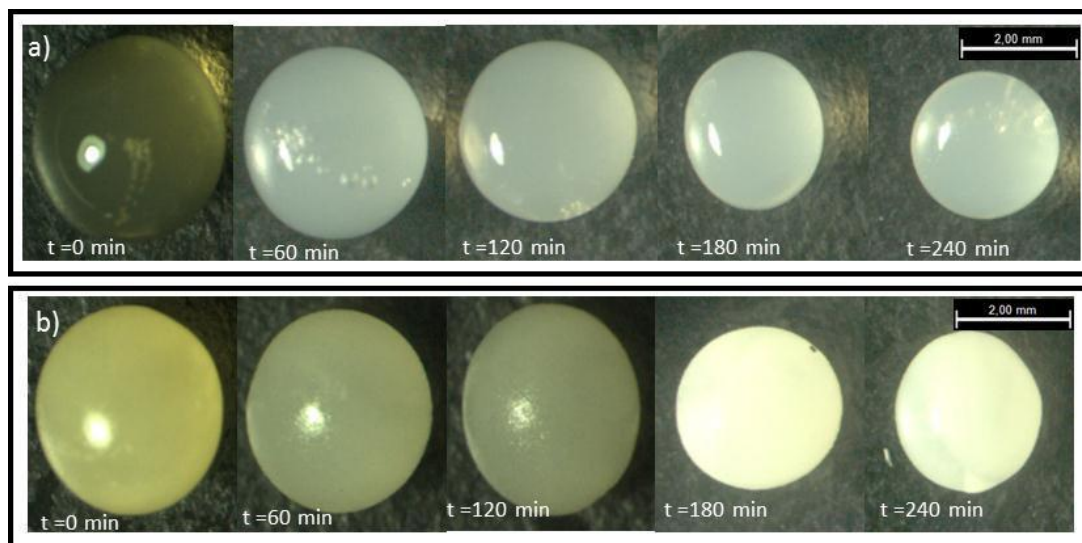


Figura 5.6. Seguimiento fotográfico durante la liberación del compuesto activo en FGS para cápsulas húmedas: a) Sistema simple y b) Sistema compuesto.

La mayor reducción del diámetro de las cápsulas debido a la erosión de la matriz, se observó en los primeros minutos de inmersión en FGS (0-10min), período en el que la velocidad de erosión fue máxima y disminuyeron su diámetro cerca de un 10%. Posteriormente continuaron erosionándose hasta valores máximos de reducción de diámetro de 16% en SS y 13% en SC (Fig 5.6).

En la Fig. 5.7 se observa el cambio de masa ( $\% \Delta W$ ) de los encapsulados durante la digestión en FGS, dichos porcentajes se calcularon de acuerdo a la Ec. 5.4. Los valores obtenidos son característicos de mecanismos de erosión superficial por pérdida de masa ( $\Delta W < 0$ ) (Lao, y col., 2011).

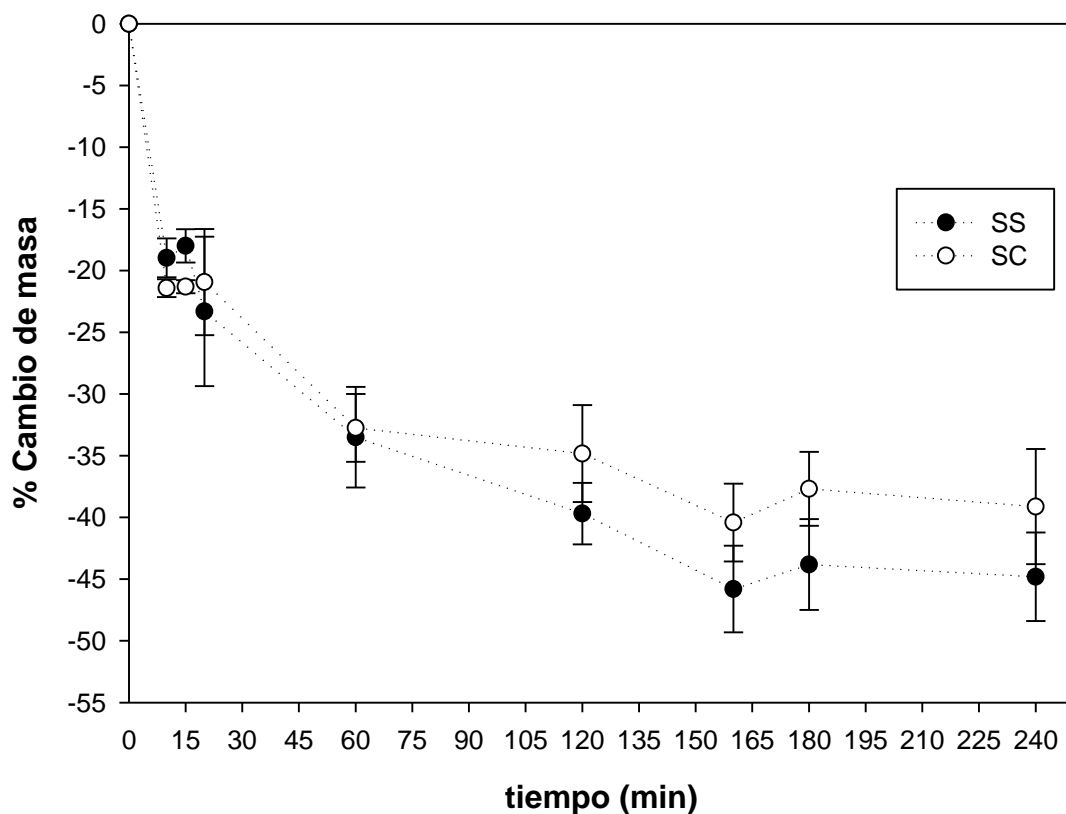


Figura 5.7. Cinética de erosión en sistemas húmedos

Al igual que lo observado en la determinación del diámetro, el descenso más significativo en la masa de los encapsulados durante la inmersión en FGS se observó en los primeros 10 min de ensayo. En este lapso la masa disminuyó cerca de un 20%, para ambos sistemas. Luego, continuó reduciéndose hasta los 160 min, tiempo a partir del cual no cambió significativamente. Ambos sistemas redujeron su masa alrededor del 40% en relación a la masa inicial, al final del ensayo.

Los porcentajes de pérdida de masa y de reducción de diámetro tendieron a ser menores en las cápsulas con almidón, sin embargo dicho efecto no fue significativo ( $p > 0,05$ ). Los mayores cambios en la masa y el diámetro en los

encapsulados ocurren durante los primeros 30 min de inmersión en FGS. Este tiempo corresponde a un porcentaje de liberación de PT mayor al 35%.

En el caso de las cápsulas secas los valores obtenidos de  $\Delta W > 0$ , corresponden a fenómenos de hinchamiento (Fig. 5.8).

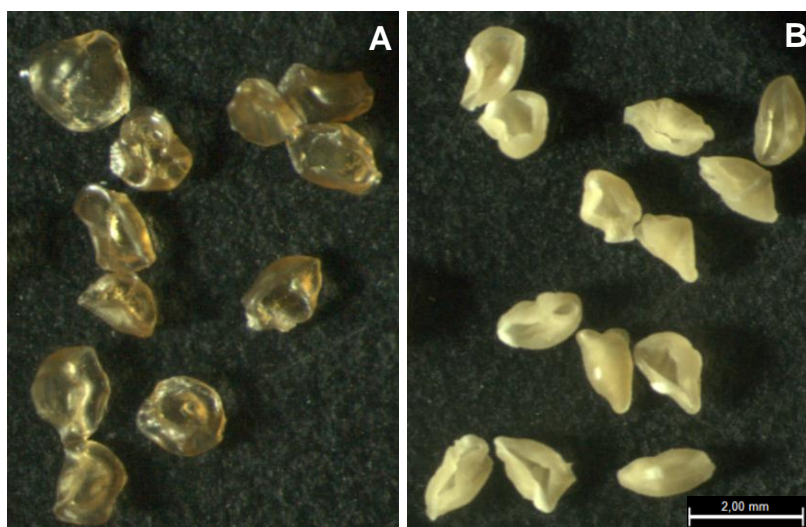


Figura 5.8. Imágenes de cápsulas secas hinchadas ( $t=240$  min): A) SS y B) SC.

En estos sistemas se necesita de una hidratación previa para que el compuesto activo comience a difundir hacia el medio. Las cápsulas secas poseen una matriz en estado vítreo ya que la  $T_g$  determinada por DSC fue de  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  (sección 4.3.4). En dicho estado existe muy baja movilidad de las moléculas por lo que es necesario la plastificación y/o relajación de las cadenas poliméricas para que el compuesto activo pueda difundir dentro de la matriz (Brazel, y col., 2000; Peppas, y col., 1993).

Si bien las cápsulas se hincharon con el paso del tiempo, no recobraron su forma original observándose formas irregulares en las que el seguimiento de la cinética de hinchamiento por diámetro resultó poco preciso. Esto pudo deberse

al cambio en la morfología del hidrogel en el proceso de secado. Como se discutió anteriormente, la pérdida de esfericidad fue menor en las cápsulas SC. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de hinchamiento de SS y SC (Fig. 5.9).

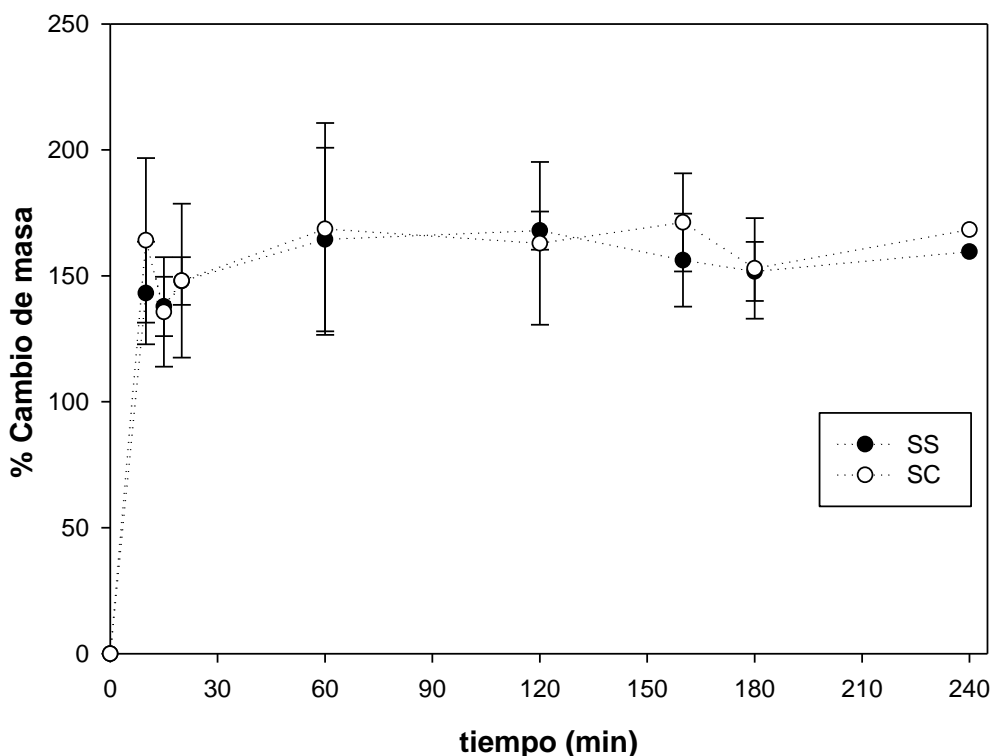


Figura 5.9. Cinética de hinchamiento en sistemas secos

Ambos sistemas SS y SC, aumentaron su masa alrededor de un 150% con respecto al valor inicial en un tiempo de inmersión en FGS de 240 min (Fig. 5.9). El valor máximo de hinchamiento se alcanzó en los primeros tiempos de ensayo (0-10 min). Posteriormente se obtuvo un período estacionario en el que el hinchamiento de las cápsulas no varió significativamente en el tiempo. Estos resultados correlacionan con los obtenidos en el ensayo de liberación en FGS

con cápsulas secas, siendo el porcentaje liberado de PT mayor al 30% en los primeros tiempos de la cinética.

Los perfiles de hinchamiento de las cápsulas secas se ajustaron a la ecuación de segundo orden propuesta por Schott (1992) (Ec. 5.9).

$$\frac{dW}{dt} = k(W_{\infty} - W_t)^2 \quad \text{Ec. 5.8}$$

Donde  $W_{\infty}$  es el porcentaje máximo de medio absorbido (FGS) o de equilibrio,  $W_t$  es el porcentaje de medio absorbido (FGS) a un tiempo  $t$  y  $k$  es la constante de velocidad de hinchamiento. Después de la integración definida entre los límites  $[0, W_t]$  y  $[0, t]$ , la ecuación 5.8 se transforma en:

$$\frac{t}{W_t} = \frac{1}{W_{\infty}}t + \frac{1}{kW_{\infty}^2} \quad \text{Ec 5.9}$$

En la Fig. 5.10 se muestra el grafico  $t/W_t$  versus  $t$ , para las cápsulas SS y SC.

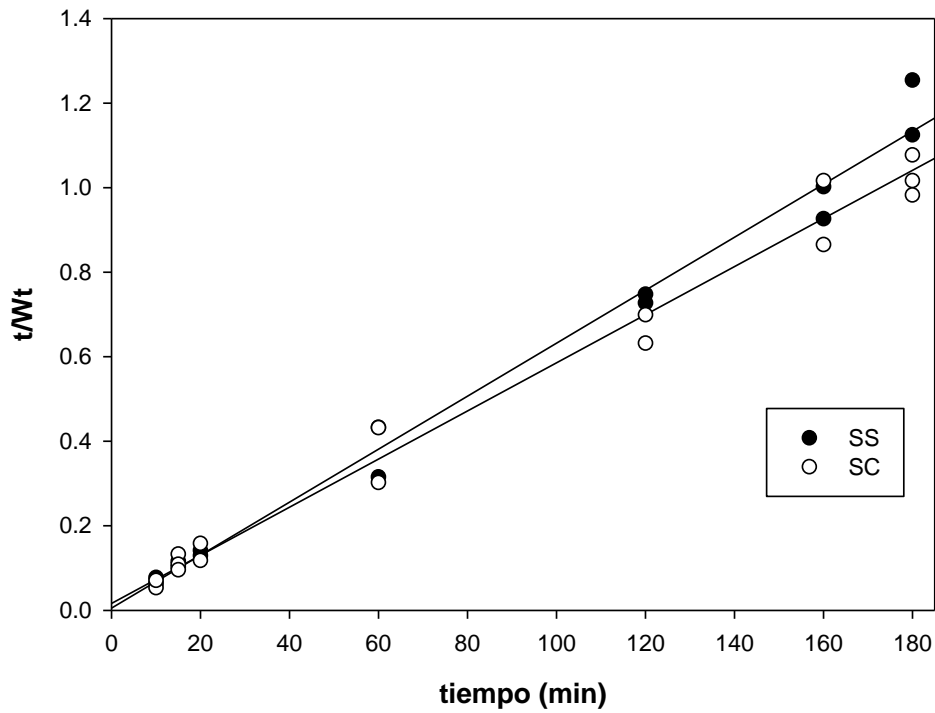


Figura 5.10. Grafico  $t/W_t$  versus  $t$  para cápsulas secas.

Las curvas obtenidas para SS y SC mostraron un alto coeficiente de correlación lineal ( $R^2 > 0,98$ ), indicando que el perfil de hinchamiento de dichos sistemas obedece a una cinética de segundo orden, ajustada a la ecuación de Schott. A partir de la pendiente de las curvas y las ordenadas en el origen (Fig. 5.10), se calcularon los parámetros  $W_\infty$  y  $k$ , respectivamente (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Parámetros obtenidos para la ecuación de Schott

Sistema	$k \times 10^{-3}$	$W_\infty$	$W_\infty$
	( $\text{min}^{-1}$ )	estimado	experimental
SS	7,22	158,73	167,94
SC	2,18	185,18	171,19



Los valores de  $W_{\infty}$  determinados con el modelo de Schott resultaron similares a los hallados experimentalmente (Tabla 5.1). Respecto a la velocidad de hinchamiento estimada ( $k$ ), se obtuvo un valor mayor de ésta para SS que para SC. Estos resultados no coincidieron con lo observado en el estudio de hinchamiento de los encapsulados en FGS, en el que no se hallaron diferencias significativas entre los perfiles de ambos sistemas. Sin embargo, el comportamiento de la constante  $k$  del modelo de Schott, podría correlacionarse con lo observado en el estudio de liberación de los polifenoles en FGS, en el que también se observó una mayor velocidad de liberación en las cápsulas sin agregado de almidón (Fig. 5.4).

### 5.3.3. Aplicación de modelos matemáticos

Las cinéticas de liberación de polifenoles en FGS, se analizaron aplicando modelos matemáticos semiempíricos. El nivel de ajuste de los datos a cada ecuación, se evaluó tomando como referencia los valores  $R^2$  corregido y la distribución de los residuos entre los valores medidos y los estimados en cada caso.

En la Tabla 5.2 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos para las cápsulas SS y SC, en estado húmedo.

Tabla 5.2. Parámetros cinéticos obtenidos para cápsulas húmedas

Sistema	Parámetros cinéticos		R <sup>2</sup> corregido	Distribución de residuos	
<i>Modelo de ley de la Potencia (Korsmeyer y Peppas)</i>					
	<i>K</i>	<i>n</i>			
SS	25,08	0,17	0,96	Buena	
SC	17,38	0,23	0,96	Buena	
<i>Modelo difusión-relajación (Peppas y Sahlin)</i>					
	<i>k<sub>d</sub></i>	<i>k<sub>r</sub></i>	<i>m</i>		
SS	22,08	0,88	0,21	0,97	Buena
SC	16,64	0,11	0,24	0,96	Buena

En estos sistemas ambos modelos mostraron un ajuste satisfactorio con valores aceptables de R<sup>2</sup> corregido y una buena distribución de residuos. Como se mencionó anteriormente en el modelo de Korsmeyer y Peppas la constante *n* indica el mecanismo predominante de liberación: valores de  $n = 0,5$  (difusión Fickiana),  $0,5 < n < 1$  (Transporte anómalo),  $n = 1$  (Transporte caso II) y  $n > 1$  (Transporte súper caso II) (Pothakamury, y col., 1995). Los valores obtenidos en este trabajo fueron menores a 0,5 para ambos sistemas (Tabla 5.2), parámetros similares fueron obtenidos por otros autores (González-Paredes, y col., 2011; Shoaib, y col., 2006) quienes lo atribuyen a un mecanismo de liberación Fickiano. Ganji, y col. (2010) en la revisión de distintos trabajos sobre mecanismos de liberación relacionan valores de *n* menores que 0,5 con sistemas en los que la velocidad de penetración del medio de liberación al interior de la matriz es baja.

Respecto al modelo de Peppas y Sahlin se obtuvo una mayor contribución del mecanismo difusivo con respecto a la relajación de las cadenas del polímero ( $k_d \gg k_r$ ) (Tabla 5.2), resultado que concuerda con lo discutido por el modelo de Korsmeyer y Peppas.

Por otro lado, se estudió la contribución del fenómeno de erosión superficial a la cinética de liberación de los polifenoles de yerba mate, mediante la ecuación empírica de Kopcha (Ec 5.10). Esta ecuación contempla la contribución de los mecanismos de difusión y erosión superficial durante la liberación del compuesto activo.

$$M = At^{1/2} + Bt \quad \text{Ec 5.10}$$

Donde  $M$  ( $\leq 70\%$ ) es el porcentaje de PT liberado en tiempo  $t$ ,  $A$  y  $B$  son los términos de difusión y erosión, respectivamente. De acuerdo con esta ecuación, si la relación  $A/B=1$ , el mecanismo de liberación implica difusión y erosión por igual. Si  $A/B>1$ , la difusión prevalece. La erosión predomina si  $A/B<1$  (Kopcha, y col., 1991).

Los parámetros  $A$  y  $B$  del modelo de Kopcha fueron estimados para cada sistema en distintos intervalos de tiempo (Figs. 5.11 y 5.12).

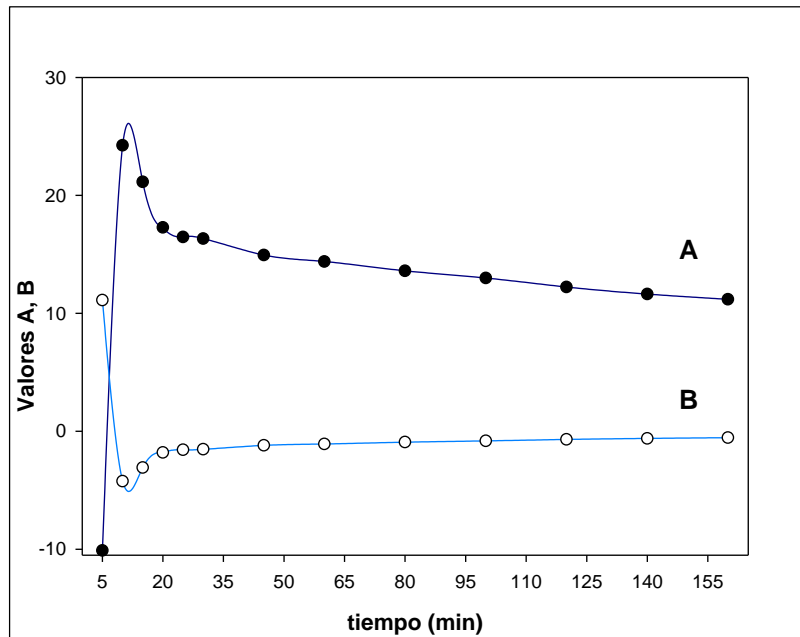


Figura 5.11. Parámetros del modelo de Kopcha para el SS

El perfil de evolución de los parámetros A y B para el sistema simple mostró que el mecanismo de erosión predomina sobre el aporte difusivo en los primeros tiempos de ensayo ( $t=5$  min). Posteriormente se observa un aumento rápido del parámetro difusivo (A) y una disminución significativa de aporte del mecanismo de erosión (B) entre los 5-10 min de la cinética. A tiempos mayores la contribución del fenómeno de erosión se hace insignificante, predominando el mecanismo difusivo Fickiano ( $A \gg B$ ) (Fig. 5.11).

En el caso del sistema compuesto en los primeros 5 min de ensayo si bien se observa una contribución del mecanismo de erosión esta es muy baja respecto al aporte difusivo ( $B \ll A$ ). A lo largo de toda la cinética predomina el mecanismo de liberación por difusión, siendo el aporte de la erosión insignificante. Este comportamiento fue atribuido al efecto del relleno de

almidón que favorece la conservación de la matriz, evitando que esta se erosione.

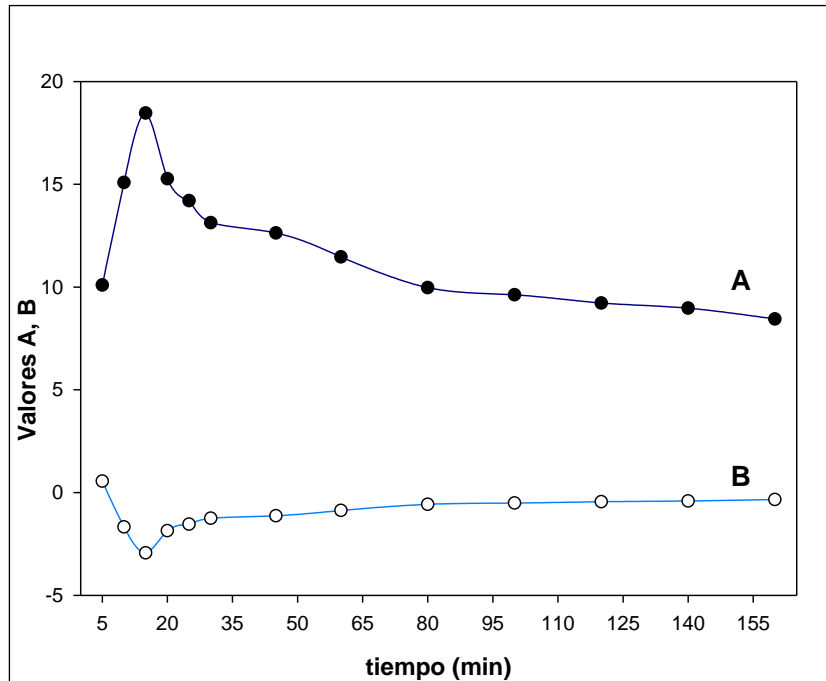


Figura 5.12. Parámetros del modelo de Kopcha para el SC

En ambos casos la relevancia del mecanismo de erosión fue observada a tiempos cortos. Los resultados obtenidos con la ecuación semiempírica de Kopcha se correlacionan satisfactoriamente con el perfil de pérdida de masa de los encapsulados (Fig. 5.7) y con la cinética de liberación de PT (Fig. 5.3) en sistemas húmedos.

Los parámetros cinéticos obtenidos para las cápsulas secas se muestran en la Tabla 5.3. El modelo de Korsmeyer y Peppas no fue usado para el ajuste del perfil de liberación de las cápsulas SS, debido a que dicho modelo se encuentra limitado a valores  $m_t/m_\infty < 0,6$ . Por lo tanto, para éste sistema el empleo de la ecuación de Berens-Hopfenberg resultó más apropiado (Ec. 5.7).

Tabla 5.3. Parámetros cinéticos obtenidos para cápsulas secas

Sistema	Parámetros cinéticos			R <sup>2</sup> corregido	Distribución de residuos
<i>Modelo de ley de la Potencia (Korsmeyer y Peppas)</i>					
	<i>k</i>	<i>N</i>			
SC	30,46	0,16		0,97	Buena
<i>Modelo de Berens-Hopfenberg</i>					
	<i>k<sub>B</sub></i>	<i>A</i>			
SS	0,008	0,35		0,91	Buena
<i>Modelo difusión-relajación (Peppas y Sahlin)</i>					
	<i>k<sub>d</sub></i>	<i>k<sub>r</sub></i>	<i>m</i>		
SS	45,74 <sup>c</sup>	0,60	0,18	0,98	Buena
SC	23,16	4,91	0,18	0,96	Buena

El modelo que mejor se ajustó a la cinética de liberación de ambos sistemas secos fue el de difusión-relajación. Se observó una buena distribución de residuos y un valor de R<sup>2</sup> corregido aceptable (Tabla 5.3). Este modelo tiene en cuenta como mecanismos de liberación predominantes un acoplamiento de la difusión y la relajación macromolecular (Peppas y Sahlin, 1989). Para ambos sistemas se observa una contribución del mecanismo de relajación a la liberación, sin embargo este resultó insignificante respecto del aporte difusivo

( $k_d \gg k_r$ ) (Tabla 5.3). Estos resultados se correlacionan con el comportamiento de las cinéticas de hinchamiento de las cápsulas secas, en las que se observó que si bien los encapsulados requirieron de una relajación inicial de las cadenas esta fue rápida aumentando su masa en un 150 % tras 10 min de inmersión en FGS; a partir de este tiempo la masa de los encapsulados no cambió significativamente.

#### 5.4. Conclusiones Parciales

- La inmersión de las cápsulas en FGS no modificó el contenido de polifenoles encapsulado. En ambos sistemas, la totalidad de compuestos fenólicos fue liberada en FGS tras un tiempo de inmersión de 240 min.
- El proceso de secado influyó en la velocidad inicial de liberación de polifenoles totales en FGS, de los sistemas. Las cápsulas secas liberaron más del 50% de PT a tiempos cortos.
- La incorporación de almidón al 2% a la matriz de alginato de calcio, moduló la velocidad de liberación de compuestos fenólicos en FGS. Dicho efecto fue más notorio en las cápsulas en estado seco.
- El ajuste de modelos matemáticos semiempíricos permitió el análisis de los mecanismos involucrados en la cinética de liberación de PT de los sistemas.
- La liberación de los polifenoles en FGS estuvo gobernada por el mecanismo de difusión, combinado con fenómenos de erosión superficial en cápsulas húmedas e hinchamiento en cápsulas secas.



*Capítulo VI. Obtención de sistemas  
compartimentalizados*

---

## 6.1. Sistemas de encapsulación compartimentalizados

Los desafíos actuales en la industria de alimentos funcionales, han generado la necesidad de obtención de nuevas materias primas e ingredientes fácilmente manipulables, estables, versátiles, de bajo costo, etc.; pero además que satisfagan distintas necesidades, simultáneamente.

En este trabajo los sistemas de encapsulación compartimentalizados se muestran como una alternativa para dar valor agregado y mejorar la funcionalidad de algunos ingredientes. En la compartimentalización una matriz conteniendo un compuesto activo es combinada con otra que transporta una sustancia de interés, lo que permite la coexistencia de compuestos activos con diferente actividad biológica o química. Esta metodología permite el aislamiento y la protección de cada compuesto activo evitando las interacciones y el deterioro entre ellos.

En los capítulos anteriores de este trabajo se utilizó el extracto de yerba mate como único compuesto activo, contenido en cápsulas de alginato de calcio y de almidón-alginato de calcio. La adición de almidón tuvo como objetivo reforzar la estructura del hidrogel y a su vez, constituir un vehículo de minerales, como sales de zinc, teniendo en cuenta la capacidad del almidón para absorber metales alcalinos y de transición formando complejos (Ciesielski, y col., 2003; Smigielska, y col., 2005).

El zinc es un elemento esencial en la nutrición humana y su importancia para la salud continua recibiendo mucha atención. La deficiencia de zinc es un problema frecuente en países desarrollados y más aún en aquellos en vías de

desarrollo. Su deficiencia, en niños, produce retraso de crecimiento, incremento de las enfermedades infecciosas y alteración de la función cognitiva (Salgueiro, y col., 2000). El consumo de zinc es esencial en la expresión génica, crecimiento y diferenciación celular, cicatrización de heridas y respuesta inmune. El zinc actúa como cofactor de más de 300 enzimas, algunas de ellas implicadas en los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo celular y en el metabolismo de ácidos nucleicos, carbohidratos y proteínas del organismo. Además, induce la formación de metalotioneínas, las cuales intervienen en la eliminación de elementos minerales tóxicos, como el cadmio, y en la protección frente a especies reactivas de oxígeno (Salgueiro, y col., 2000; Tapiero, y col., 2003).

El desarrollo de vehiculizadores de zinc permite complementar dietas con baja biodisponibilidad, reforzar el sistema inmune y ampliar el aporte de antioxidantes procedentes de la dieta (Cilla, 2010).

La USDA admite muchos compuestos de zinc como generalmente reconocidos como seguros (GRAS). El sulfato de zinc y el óxido de zinc son las sales GRAS más económicas y comúnmente empleadas por la industria alimentaria (Boccio, y col., 2004).

Los objetivos de este capítulo fueron:

- Seleccionar las combinaciones de compuestos activos y agentes encapsulantes que permitan obtener la máxima eficiencia del sistema mixto.
- Caracterizar microestructuralmente los sistemas obtenidos.
- Evaluar la funcionalidad de los compuestos activos en el sistema compartimentalizado.

## 6.2. Materiales y métodos

### 6.2.1. Obtención de almidones cargados con zinc

Se preparó una mezcla adicionando almidón nativo comercial (Maizena<sup>®</sup>) al 10% p/v y diferentes concentraciones de sulfato de zinc; en agua desionizada Milli-Q. Las proporciones de Zn/almidón empleadas para la preparación de 10 mL de mezcla, se muestran en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Formulaciones de las mezclas de almidón- zinc

Nomenclatura*	g Zn/ g almidón
AZnB	0,3247
AZnM	0,6511
AZnA	0,9647

\* La nomenclatura indica tres niveles de Zn<sup>+2</sup>: B: bajo, M: medio y A: alto

Las mezclas se colocaron en tubos herméticos, permaneciendo 15 h en un agitador orbital a 25 °C a una velocidad de 180 rpm. Luego se colocaron en una centrífuga (Rolco, Argentina) por 20 min a 300g, se descartó el líquido sobrenadante y se secaron en estufa a 30 °C. Las muestras se molieron y almacenaron en recipientes herméticos hasta su análisis (Fernández, y col., 2008).

#### 6.2.1.1. Cuantificación de la masa de zinc

El contenido de zinc fue determinado mediante Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA) en un equipo marca Varian modelo EspectrAA 300-plus (Cambridge, Reino Unido). Previo al análisis, las muestras se sometieron a digestión ácida con HCl concentrado por 40 min a ebullición (Pirt, y col., 1951). El residuo de la digestión se filtró y se llevó a volumen con agua Milli-Q.

#### 6.2.1.2. Análisis por microscopía SEM-EDX

El análisis SEM-EDX se realizó en un equipo ZEISS DSM-969 equipado con unidad EDX (ISIS-LINK, Oxford Inst., Alemania). Las muestras se adhirieron con una cinta de doble faz sobre los portamuestras cilíndricos y se recubrieron con carbón conductor.

#### 6.2.2. Efecto del agregado de zinc sobre la capacidad antioxidante (DPPH<sup>•</sup>) del extracto de yerba mate

Se prepararon suspensiones de almidón cargado con zinc en extracto de yerba mate a la misma concentración a emplearse en la preparación de las cápsulas (2 % p/v). Las suspensiones se agitaron y se centrifugaron a 5000g por 5 min. A partir de una alícuota del sobrenadante se determinó el porcentaje de inhibición al radical DPPH<sup>•</sup> (Sección 3.2.5).

#### 6.2.3. Obtención de los sistemas de encapsulación compartimentalizados de extracto de yerba mate y zinc

Para la obtención de los sistemas compartimentalizados se llevó a cabo el siguiente protocolo: se preparó una solución de alginato de sodio al 2 % (p/v) en extracto de yerba mate. A dicha solución se adicionó un 2% (p/v) de almidón cargado con Zn y se agitó durante 30 min. A partir de ésta mezcla se prepararon las cápsulas mediante la técnica de gelificación iónica descrita en la sección 4.2.1. El mismo procedimiento fue realizado para la preparación de las cápsulas control, empleando almidón nativo sin adición de zinc.

#### 6.2.4. Determinación del contenido de zinc y de polifenoles totales (PT) en el sistema compartimentalizado

Para la determinación del contenido de zinc y de PT en los encapsulados se sumergió una cantidad conocida de cápsulas en solución de citrato de sodio al

5% (p/v), hasta desintegración completa. Se centrifugó a 5000g por 5min y se tomaron alícuotas de sobrenadante para el análisis. El contenido de Zn se determinó mediante espectroscopia de absorción atómica (sección 6.2.2) y el contenido de polifenoles totales fue determinado mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (sección 3.2.2.1).

#### 6.2.5. Análisis de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Se realizó el análisis FT-IR de los almidones cargados con zinc a distintas concentraciones (AZnB, AZnM y AZnA) y el sistema compartimentalizado de extracto de yerba mate y zinc. Los espectros fueron tomados siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.2.7.

### 6.3. Resultados

#### 6.3.1. Caracterización de los almidones cargados con zinc

Las micrografías de la Fig. 6.1 obtenidas mediante SEM-EDX muestran la superficie de los gránulos de almidón. La presencia de sulfato de zinc en el almidón fue revelada mediante el microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDX). Se observó una distribución homogénea del zinc en la superficie de los gránulos (Fig. 6.1b).

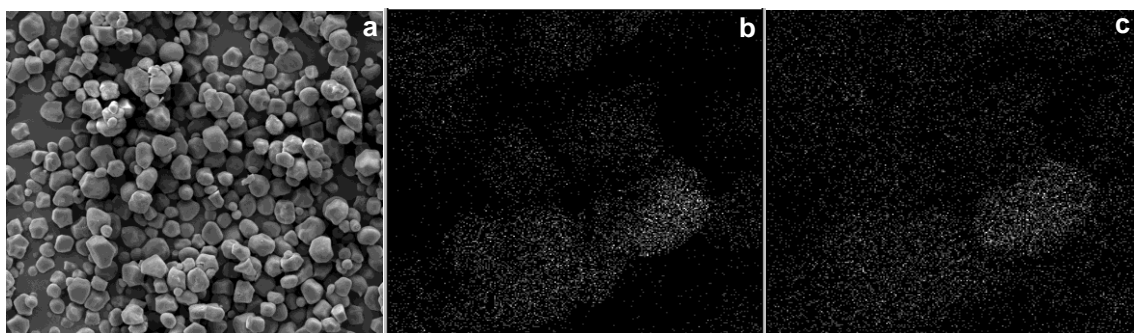


Figura 6.1. Micrografías SEM-EDX de a) gránulos de almidón nativo (1300X) y b) Mapeo superficial de zinc (2000X) y c) Mapeo superficial de azufre (2000X).

Por espectroscopia de absorción atómica se determinó la cantidad de zinc adsorbida por el almidón en las distintas formulaciones. La relación entre las cantidades de mineral empleadas en la preparación de los vehículos y la adsorbida por el almidón se muestra en la Fig. 6.2.



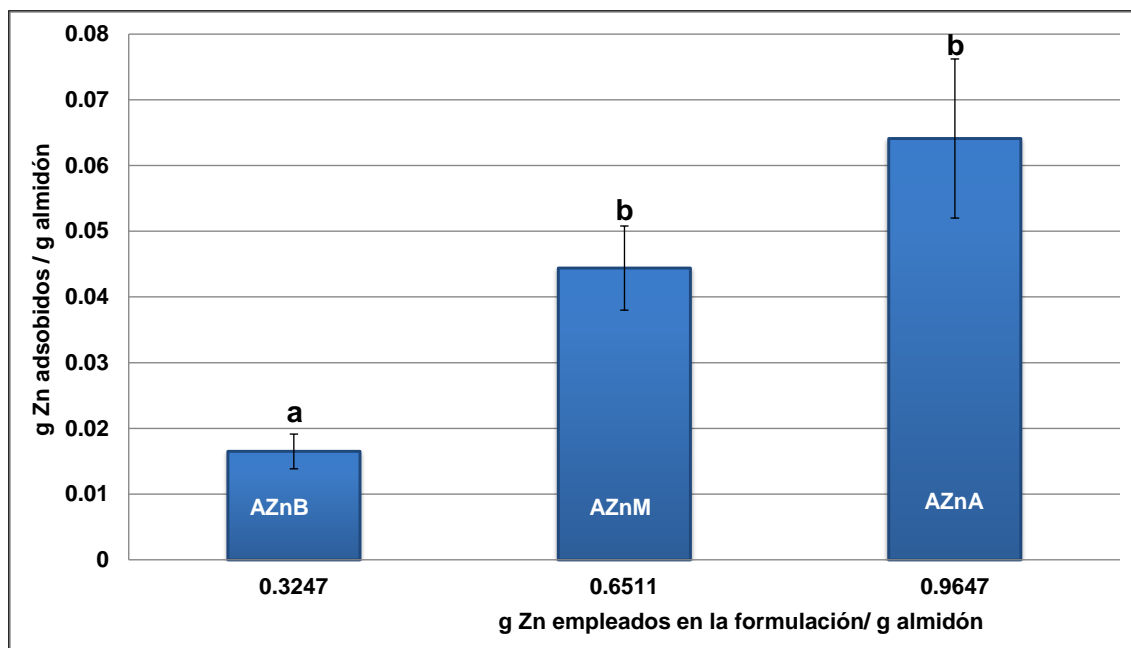


Figura 6.2. Cantidad de Zn adsorbida en el almidón en relación a la cantidad empleada en la formulación. Letras diferentes sobre las barras corresponden a muestras con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Por el análisis estadístico de medias, se observó un aumento significativo en la adsorción de zinc en el almidón, al emplear las formulaciones de AZnA y AZnM, respecto de AZnB. Las formulaciones AZnA y AZnM no presentaron diferencias significativas entre ellas (Fig. 6.2). Por otro lado, se obtuvo una relación constante de 0,07 entre la masa de Zn adsorbida y la masa de mineral empleada en la preparación del vehículo.

Smigielska, y col. (2010) prepararon un vehículo para zinc empleando almidón de papa modificado mediante la reacción de oxidación. Las concentraciones de zinc adicionadas fueron de 0,5 – 2 mg Zn/g almidón. Observaron una dependencia similar a la obtenida en este estudio entre la dosis de zinc empleada y la cantidad de mineral adsorbida en el almidón. Estos mismos

autores obtuvieron resultados equivalentes con la adsorción de cobre y hierro en almidón nativo y almidones modificados; obteniéndose mayor carga de estos elementos en los almidones modificados (Smigielska, y col., 2005). Por otro lado, Fernández, y col. (2008) estudiaron la preparación de vehículos de Mg y Zn utilizando almidón parcialmente gelatinizado por alta presión; encontrando que los almidones tratados con alta presión retenían mayor cantidad de minerales que los almidones sin tratamiento. Estos autores atribuyeron dicho efecto a la gelatinización parcial ocurrida durante el tratamiento de alta presión, que facilitaría la interacción de los polímeros con los cationes metálicos.

En el presente trabajo se logró retener zinc en almidón de maíz sin necesidad de tratamientos previos sobre el almidón nativo, con la consecuente economía de recursos. Estos almidones constituyen una alternativa como ingrediente para la fortificación de alimentos con zinc, de modo que se incremente el aporte de este mineral en la dieta.

### 6.3.2. Efecto del agregado de almidón cargado con zinc en la capacidad antioxidante del extracto de yerba mate

En la Fig. 6.3 se observa la actividad anti-radical frente al DPPH<sup>•</sup> de las suspensiones de almidón cargado con Zn en extracto de yerba mate (AZnB-YM, AZnM-YM y AZnA-YM), la suspensión de almidón control sin zinc (A-YM) y el extracto de yerba mate al 3% (YM). Se obtuvieron porcentajes de inhibición de alrededor del 90%, en todos los casos ( $p > 0,05$ ).

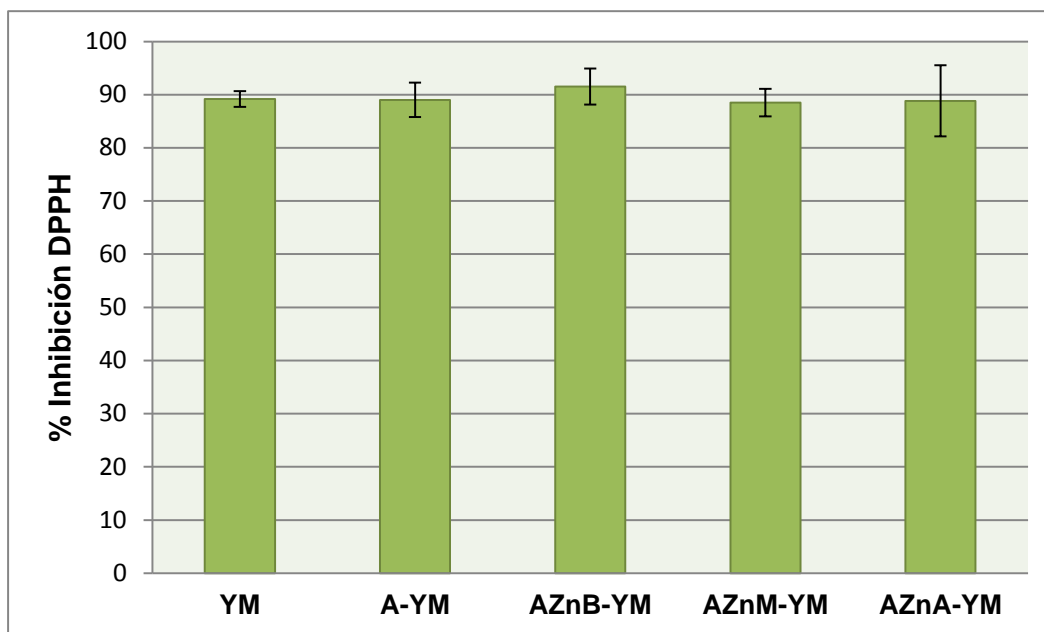


Figura 6.3. Capacidad antioxidante de suspensiones de almidón cargado con Zn en extracto acuoso de yerba mate

Teniendo en cuenta la alta capacidad antioxidante del extracto de yerba mate, se determinó la actividad frente al radical DPPH<sup>•</sup> de las mezclas a la concentración del extracto equivalente a la EC<sub>50</sub> (sección 3.3.3). En este caso tampoco fueron encontradas diferencias, obteniendo porcentajes de inhibición de alrededor del 50 %, para todas las formulaciones. De lo anterior se puede decir que la adición de almidón cargado con Zn a las concentraciones estudiadas, no influyó sobre la capacidad antioxidante del extracto de yerba mate determinada mediante el radical DPPH<sup>•</sup>. Cilla (2010) estudió la actividad antioxidante de zumos de fruta suplementados con minerales (Zn y Fe), empleando los métodos de ORAC y TEAC. Este autor encontró que la suplementación con hierro y/o zinc no influyó sobre la capacidad antioxidante de los zumos de fruta, siendo los compuestos principalmente responsable de

dicha actividad el ácido ascórbico y los polifenoles. Por otra parte, este autor observó un efecto antioxidante del zinc mediante un ensayo de inducción de estrés oxidativo con  $H_2O_2$  en células. El zinc es considerado un componente esencial del sistema de defensa antioxidante por su rol como cofactor de enzimas, como la Cu/Zn-superóxido dismutasa, que actúan frente al estrés oxidativo celular (Powell, 2000; Zago, y col., 2001). Otros autores han atribuido al zinc un efecto antioxidante en base a la protección que ejerce sobre los grupos sulfhidrilo de las proteínas, así como por su participación en la reducción del radical OH a  $H_2O_2$  por antagonismo con metales de transición tales como hierro y cobre (Powell, 2000).

### 6.3.3. Sistema compartimentalizado

Se obtuvieron cápsulas de alginato de calcio conteniendo zinc y extracto de yerba mate simultáneamente. La adición del zinc vehiculizado en el almidón tuvo como objetivo evitar la gelificación del alginato con este catión. Ya que en ensayos preliminares adicionando sulfato de zinc a la solución precursora se observó la formación de un gel débil.

La concentración de zinc vehiculizada en el almidón tuvo un impacto sobre la morfología de las cápsulas. Sólo se obtuvieron cápsulas esféricas empleando almidón con baja concentración de zinc (16,5 mg Zn/g almidón). Durante la agitación de las soluciones precursoras preparadas con almidón con media (AZnM) y alta (AZnA) concentración, se observó un incremento en la viscosidad lo que dificultó la obtención de los encapsulados, obteniendo como producto

geles blandos de formas irregulares. Este comportamiento se atribuyó al efecto entrecruzante que el zinc, adsorbido en el almidón, ejerció sobre las cadenas de alginato.

Según Aslani, y col. (1996) los iones de zinc y de calcio tienen diferentes sitios de unión en el polímero de alginato. Otros autores han encontrado que durante la gelificación los cationes de zinc interactúan en mayor medida con el alginato que el calcio. Sin embargo, la interacción alginato-zinc es menos selectiva, lo que genera la formación de geles menos consistentes (Chan, y col., 2002; Taha, y col., 2008).

Una alternativa para el empleo de los almidones con media y alta concentración de zinc (AZnM y AZnA, respectivamente), sería su uso como ingrediente para la formulación de alimentos funcionales o como sustitutos de las sales de zinc para disminuir su gusto desagradable. Smigielska, y col. (2010) prepararon un pudín empleando almidón de papa adsorbido con zinc. El producto obtenido no mostró diferencias significativas en sus características sensoriales.

El contenido de zinc en las cápsulas preparadas empleando almidón AZnB, fue de 3,89 mg Zn/g cápsulas. Dicha concentración de zinc corresponde al 35% de la ingesta diaria recomendada para un adulto (11 mg) (FAO/WHO, 2002). Dependiendo del producto donde sean incorporadas las cápsulas se deberá calcular el aporte de zinc correspondiente. Teniendo en cuenta que la concentración de Zn del extracto de yerba mate al 3% fue de 0,0013 mg/g, el

aporte de la yerba mate a la concentración total de Zn en las cápsulas es poco significativo.

La Fig. 6.4 muestra la comparación entre el contenido de polifenoles totales de los diferentes sistemas de encapsulación empleados en este estudio.

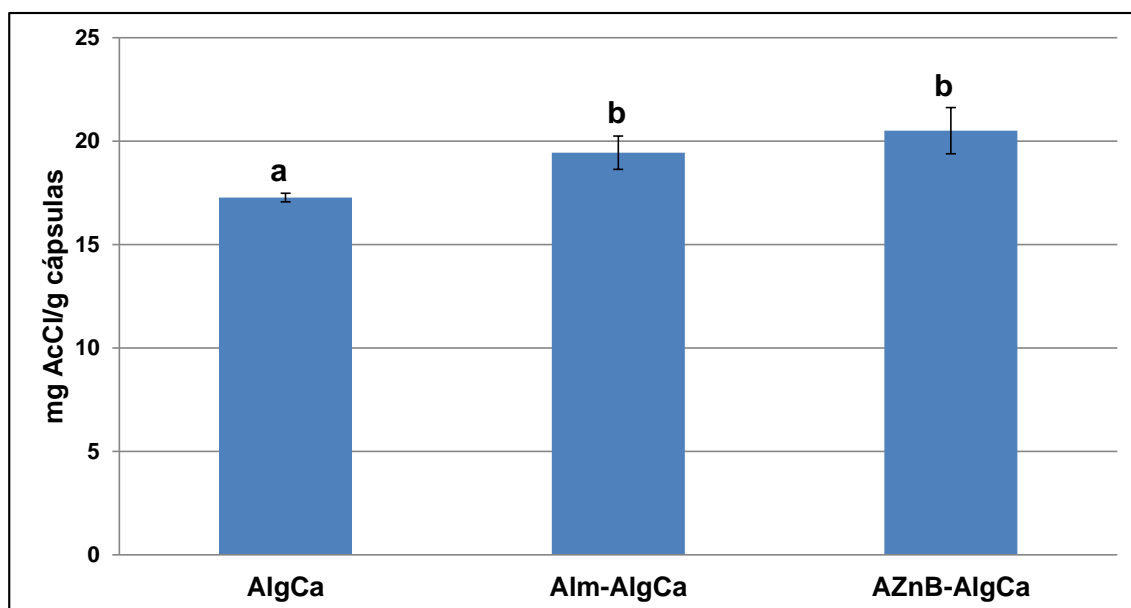


Figura 6.4. Contenido de PT en las cápsulas sin y con agregado de zinc. Letras diferentes sobre las barras corresponden a muestras con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En el sistema compartimentalizado el empleo de almidón cargado con bajas concentraciones de zinc no provocó cambios significativos en el contenido de PT, respecto a las cápsulas de almidón-alginato de calcio.

La determinación de la capacidad antioxidante mediante el método del DPPH<sup>•</sup> no fue posible debido a dificultades experimentales. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la sección 3.3.3 y lo descrito en literatura, existe una relación directa entre el contenido de PT del extracto de yerba mate

y su capacidad antioxidante frente al radical DPPH• (Deladino, y col., 2008). En este sentido, el hecho de que el zinc no haya afectado el contenido de PT en los encapsulados, concuerda con lo observado en la Fig. 6.3, donde el almidón cargado con distintas concentraciones de Zn no modificó el poder antioxidante del extracto.

En los sistemas compartimentalizados diseñados no se alteraron las propiedades características de cada compuesto activo determinadas individualmente, permitiendo el transporte de los mismos en forma efectiva. Además, se conservaron las características morfológicas de los encapsulados lo cual favorece el manipuleo de estos materiales en polvo.

#### 6.3.4. Efecto del zinc en sistemas de almidón y compartimentalizados mediante análisis FT-IR

La Fig. 6.5 muestra los espectros IR obtenidos para el ZnSO<sub>4</sub> y los almidones cargados con distintas concentraciones de zinc. Adicionalmente se muestra el espectro del almidón nativo analizado previamente (sección 4.3.3), para facilitar la comparación.

Los espectros IR de los almidones cargados con diferentes concentraciones de zinc mostraron bandas características presentes en el almidón nativo. Los picos característicos del sulfato de zinc ubicados alrededor de 1115 y 624 cm<sup>-1</sup>, también fueron observados en las formulaciones con media (AZnM) y alta (AZnA) concentración de zinc. Wang, y col. (2004) en el estudio de complejos

quitosano-zinc encontraron señales a 1109 y 618  $\text{cm}^{-1}$  atribuidas al estiramiento de las uniones S-O presentes en el sulfato de zinc.

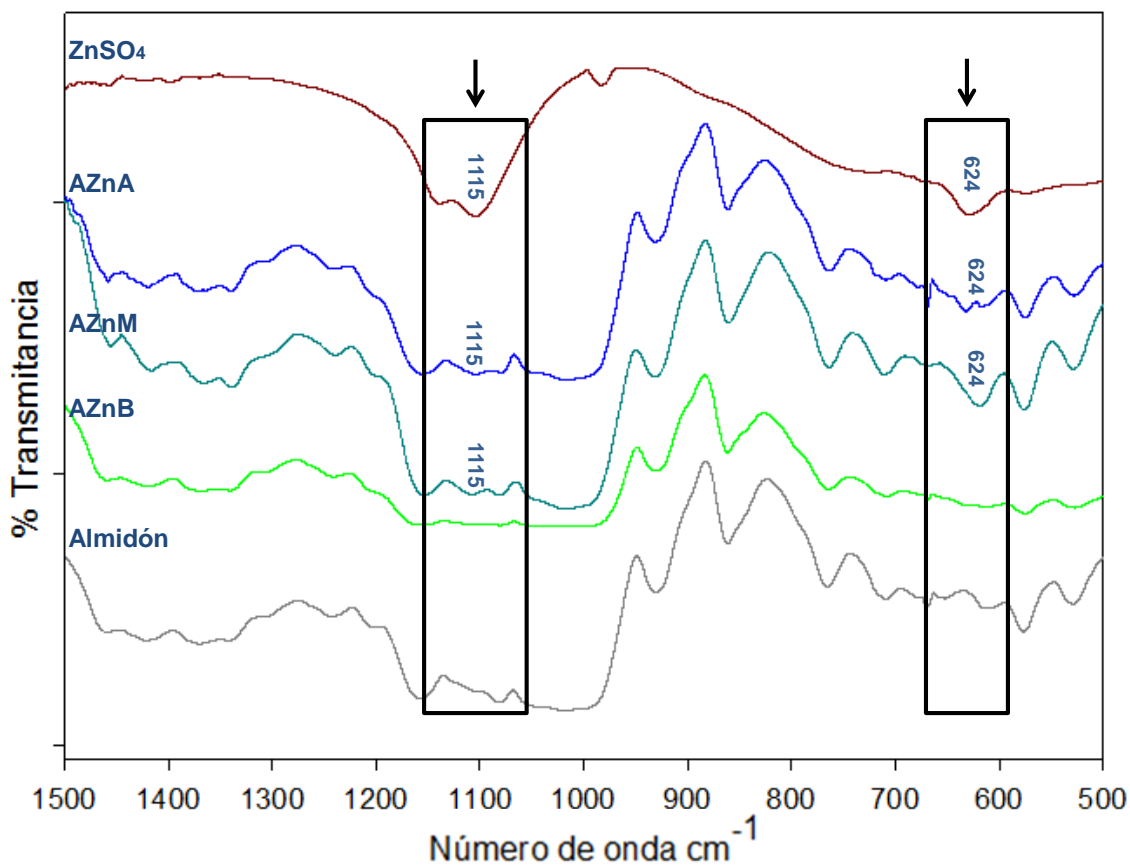


Figura 6.5. Espectros IR de almidones cargados con diferentes concentraciones de zinc.

También se observaron cambios en la intensidad de las bandas ubicadas en la región entre 1200-1000  $\text{cm}^{-1}$  atribuidas a las vibraciones de las uniones C-O y C-C de las unidades constitutivas del polímero de almidón. Staroszczyk, y col. (2010) obtuvieron espectros similares en el estudio del efecto de la aplicación de microondas en la formación de complejos almidón-Zn mediante el análisis de sus espectros IR. Por su parte Ciesielski, y col. (2003) mediante estudios de



Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) evidenciaron la formación de complejos entre el almidón y sales de metales de transición, tales como: Co (II), Cr (III), Cu (II), Fe (III), y Mn (II). Los grupos hidroxilos de las cadenas de amilosa y amilopectina del almidón constituyen sitios potencialmente activos para la unión de metales. El zinc al ser un catión bivalente puede atraer los átomos de oxígeno de las cadenas de los polímeros del almidón que tienen varios pares de electrones libres, formando enlaces intermoleculares (Błaszczak, y col., 2005; Ciesielski, y col., 2004; Tomasik, y col., 2001).

Por otro lado, los sistemas encapsulados conteniendo yerba mate y zinc vehiculizado en el almidón (curva A) mostraron bandas similares al espectro de las cápsulas control (curva B). En ambos casos se observaron señales características del polímero de almidón (Fig. 6.6) (Staroszczyk, y col., 2010).

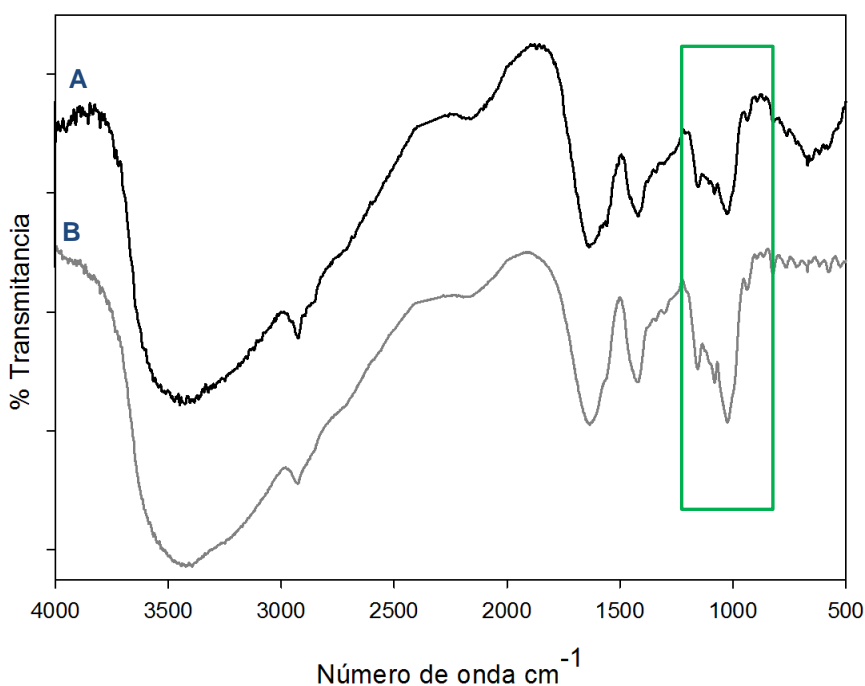


Figura 6.6. Espectros IR de cápsulas compartimentalizadas (A) y cápsulas control (sin adición de zinc) (B).

Al igual que en los almidones cargados con zinc (Fig. 6.5) en las cápsulas conteniendo Zn y extracto de yerba mate simultáneamente, se observaron cambios en la intensidad de las bandas principalmente en la región entre 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ . Sin embargo no se lograron identificar señales atribuibles al complejo almidón-zinc, probablemente debido al bajo contenido de este mineral en los encapsulados.

#### 6.4. Conclusiones parciales

- El almidón de maíz nativo puede constituirse en un vehículo para el transporte de zinc. El método de preparación empleado es fácil, rápido y permite regular la cantidad de zinc a adicionar.
- El análisis SEM-EDX mostró una disposición homogénea del zinc en la superficie del gránulo de almidón.
- El agregado de zinc vehiculizado en almidón a bajas concentraciones, a cápsulas de alginato de calcio con yerba mate permitió la obtención de sistemas compartimentalizados, sin que se afectaran las características individuales de los compuestos activos; ni las características morfológicas de las cápsulas.
- La presencia de zinc y extracto de yerba mate en los sistemas compuestos no afectó el contenido de polifenoles totales del sistema.
- Fue posible obtener un sistema compuesto conteniendo extracto de yerba mate y zinc simultáneamente. Dicho sistema podría ser empleado como ingrediente en la formulación de alimentos para aumentar el aporte de antioxidantes de la dieta y de minerales.

## ***Capítulo VIII. Conclusiones***

---

Se encapsuló un extracto de yerba mate con alto poder antioxidante en diferentes sistemas de encapsulación: alginato de calcio y almidón-alginato de calcio. La incorporación de almidón favoreció el aumento de la eficiencia de encapsulación de extracto de yerba mate, el refuerzo de la matriz y la disminución de la porosidad de las cápsulas, características deseables para el procesamiento, la manipulación y el almacenamiento de los productos en polvo. Además, el empleo de almidón como relleno influyó sustancialmente sobre la cinética de liberación de polifenoles totales en fluido gástrico simulado, mayormente en cápsulas secas. El mecanismo de liberación por difusión resultó ser el más relevante acompañado por la erosión superficial o el hinchamiento, según el caso.

Se obtuvieron almidones adicionados con cantidades variables de zinc, mediante un proceso simple y de bajo costo. Este producto constituye en sí mismo una alternativa para la fortificación o el enriquecimiento de alimentos.

La metodología de compartimentalización aplicada permitió el transporte simultáneo de extracto de yerba mate y zinc, otorgando al sistema características bifuncionales complementarias: el extracto de yerba aporta una alta actividad antioxidante y el zinc constituye un refuerzo para el sistema de defensa antioxidante endógeno, entre otras.

La aplicación de estos encapsulados en formulaciones de alimentos, podría proporcionar ventajas para la preservación de sustancias susceptibles a la oxidación y contribuir al aporte de compuestos con actividad biológica que prevengan el desarrollo de enfermedades.

## *Bibliografía*

---

- Abdullah, E. C., y Geldart, D. (1999). The use of bulk density measurements as flowability indicators. *Powder Technology*, 102(2), 151-165.
- Alipour, S., Montaseri, H., y Tafaghodi, M. (2010). Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded alginate microparticles for pulmonary delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(2), 521-529.
- Anbinder, P. S. (2004). *Encapsulación de antioxidantes de yerba mate*, Tesis de grado de Lic. en ciencia y tecnología de alimentos. Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina.
- Anbinder, P. S., Deladino, L., Navarro, A. S., Amalvy, J. I., y Martino, M. N. (2011). Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems: Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 1, 80-87.
- Anesini, C., Turner, S., Cogoi, L., y Filip, R. (2012). Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 299-304.
- AOAC. (1998). Official methods of analysis (16th ed.). Gaithersburg, EE.UU.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K., y Özyurt, D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- Arifin, D. Y., Lee, L. Y., y Wang, C.-H. (2006). Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(12-13), 1274-1325.
- Aslani, P., y Kennedy, R. A. (1996). Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. *Journal of Controlled Release*, 42(1), 75-82.
- Barba, A. A., d'Amore, M., Chirico, S., Lamberti, G., y Titomanlio, G. (2009). A general code to predict the drug release kinetics from different shaped matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(2-3), 359-368.
- Bastos, D., Saldanha, L., Catharino, R., Sawaya, A., Cunha, I., Carvalho, P., y Eberlin, M. (2007). Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*, 12(3), 423-432.

- Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Cindrić, I. J., Nedović, V., y Bugarski, B. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate - chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*, 44(4), 1094-1101.
- Berens, A. R., y Hopfenberg, H. B. (1978). Diffusion and relaxation in glassy polymer powders: 2. Separation of diffusion and relaxation parameters. *Polymer*, 19(5), 489-496.
- Berte, K. A., Beux, M. R., Spada, P. K., Salvador, M., y Hoffmann-Ribani, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. *J Agric Food Chem*, 59(10), 5523-5527.
- Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., y Fito, P. (2010). Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 22(9), 498-508.
- Błaszczak, W., Valverde, S., y Fornal, J. (2005). Effect of high pressure on the structure of potato starch. *Carbohydrate Polymers*, 59(3), 377-383.
- Boccio, J., y Monteiro, J. B. (2004). Fortificación de alimentos con hierro y zinc: pros y contras desde un punto de vista alimenticio y nutricional. *Revista de Nutrição*, 17, 71-78.
- Boh, B., y Sumiga, B. (2008). Microencapsulation technology and its applications in building construction materials. *RMZ – Materials and Geoenvironment*, 55(3), 329-344.
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzini, L., Lapasin, R., y Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416-423.
- Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., y Gugliucci, A. (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(3), 378-384.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brazel, C. S., y Peppas, N. A. (2000). Modeling of drug release from Swellable polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49(1), 47-58.
- Burkersroda, F. v., Schedl, L., y Göpferich, A. (2002). Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*, 23(21), 4221-4231.



- Carini, M., Facino, R. M., Aldini, G., Calloni, M., y Colombo, L. (1998). Characterization of phenolic antioxidants from Maté (*Ilex Paraguayensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12(22), 1813-1819.
- Ciesielski, W., Lii, C.-y., Yen, M.-T., y Tomasik, P. (2003). Interactions of starch with salts of metals from the transition groups. *Carbohydrate Polymers*, 51(1), 47-56.
- Ciesielski, W., y Tomasik, P. (2004). Werner-type metal complexes of potato starch. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(6), 691-698.
- Cilla, A. (2010). *Actividad antioxidante y biodisponibilidad mineral de zumos de frutas adicionados de minerales y/o leche, Tesis Doctoral*. Universitat de València, Valencia, España.
- Cóccaro, G. (2010). *Alimentos Funcionales y Novel Food: Alternativas para el diseño de alimentos y su marco legal*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina.
- Champagne, C. P., y Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Chan, E.-S., Lee, B.-B., Ravindra, P., y Poncelet, D. (2009). Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), 63-72.
- Chan, E.-S., Lim, T.-K., Voo, W.-P., Pogaku, R., Tey, B. T., y Zhang, Z. (2011a). Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness. *Particuology*, 9(3), 228-234.
- Chan, E.-S., Wong, S.-L., Lee, P.-P., Lee, J.-S., Ti, T. B., Zhang, Z., Poncelet, D., Ravindra, P., Phan, S.-H., y Yim, Z.-H. (2011b). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83(1), 225-232.
- Chan, E.-S., Yim, Z.-H., Phan, S.-H., Mansa, R. F., y Ravindra, P. (2010). Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 195-201.
- Chan, L. W., Jin, Y., y Heng, P. W. S. (2002). Cross-linking mechanisms of calcium and zinc in production of alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1-2), 255-258.
- Das, S., Chaudhury, A., y 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(1-2), 11-20.
- Datamonitor. (2008). Functional Food, Drinks & Ingredients: Consumer Attitudes & Trends. Exploring the drivers and inhibitors of functional food and drink consumption in Europe, North America and Asia. . In *Report. from: <http://www.marketresearch.com>*.
- Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., y Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 388-395.
- Day, M., Parker, I. B., Bell, J., Fletcher, R., Duffie, J., Sing, K. S. W., Nicholson, D., J. Rouquerol, F. R. g.-R. K. S. W. S., y Unger, K. K. (1994). Modelling of mercury intrusion and extrusion. In *Studies in Surface Science and Catalysis*, vol. Volume 87 (pp. 225-234): Elsevier.
- Deladino, L. (2010). *Encapsulación de antioxidantes de yerba mate para su incorporación en alimentos funcionales, Tesis Doctoral*. Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Buenos Aires.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., y Martino, M. N. (2007a). Co-crystallization of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) and mineral salts within a sucrose matrix. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 573-580.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., y Martino, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71(1), 126-134.
- Deladino, L., Navarro, A., y Martino, M. N. (2007b). Encapsulation of active compounds: Ionic gelation and cocrystallization as case studies. In C. E. Lupano (Ed.), *Functional Properties of Food Components*, (pp. 125-157).
- Draguet, K. I. (2000). *Handbook of hydrocolloids* (Phillips G.O. y Williams ed.). New York, Washington, DC
- Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Jacques, R. A., Caramao, E. B., y Mondello, L. (2009). High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7213-7221.
- Duthie, G. G., Gardner, P. T., y Kyle, J. A. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62(3), 599-603.

- Falguera, V., Aliguer, N., y Falguera, M. (2012). An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products? *Food Control*, 26(2), 274-281.
- Fang, Z., y Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
- Fernández, P. P., Sanz, P. D., Martino, M. N., y Molina-García, A. D. (2008). Partially-gelatinised starches by high hydrostatic pressure as oligoelement carriers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6, 129-137.
- Ferrari, C. C., Germer, S. P. M., Alvim, I. D., Vissotto, F. Z., y de Aguirre, J. M. (2012). Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(6), 1237-1245.
- Filip, R., López, P., Giberti, G., Coussio, J., y Ferraro, G. (2001). Phenolic compounds in seven South American Ilex species. *Fitoterapia*, 72(7), 774-778.
- Filip, R., Lotito, S. B., Ferraro, G., y Fraga, C. G. (2000). Antioxidant activity of Ilex paraguariensis and related species. *Nutrition Research*, 20(10), 1437-1446.
- Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S. I., y Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Fundueanu, G., Nastruzzi, C., Carpov, A., Desbrieres, J., y Rinaudo, M. (1999). Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials*, 20(15), 1427-1435.
- Gabbott, P. (2008). A Practical Introduction to Differential Scanning Calorimetry. In *Principles and Applications of Thermal Analysis*, (pp. 1-50): Blackwell Publishing Ltd.
- Gal, A., y Nussinovitch, A. (2007). Hydrocolloid carriers with filler inclusion for diltiazem hydrochloride release. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(1), 168-178.
- Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., y Vasheghani-Farahani, E. (2010). Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iranian Polymer Journal*, 19(5), 375-398.
- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., y Marchioni, E. (2009). Microencapsulation of Lactobacillus plantarum spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1), 103-105.

- George, M., y Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan: a review. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 1-14.
- Goh, C. H., Heng, P. W. S., y Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 1-12.
- González-Paredes, A., Clarés-Naveros, B., Ruiz-Martínez, M. A., Durbán-Fornieles, J. J., Ramos-Cormenzana, A., y Monteoliva-Sánchez, M. (2011). Delivery systems for natural antioxidant compounds: Archaeosomes and archaeosomal hydrogels characterization and release study. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(2), 321-331.
- González de Mejía, E. G., Song, Y. S., Heck, C. I., y Ramirez-Mares, M. (2009). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 23-34.
- Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., y Tsaknis, J. (2008). Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *European food research and technology*, 226(3), 583-590.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 330-347.
- Harris, R., Lecumberri, E., Mateos-Aparicio, I., Mengíbar, M., y Heras, A. (2011). Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 803-806.
- He, J., Zhong, C., y Mi, J. (2005). Modeling of Drug Release from Bioerodible Polymer Matrices. *Drug Delivery*, 12, 251-259.
- Heck, C. I., y González de Mejía, E. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *Journal of Food Science*, 72(9), R138-R151.
- Heck, C. I., Schmalko, M., y González de Mejía, E. (2008). Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8394-8403.
- Huang, X., y Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2-3), 121-136.

- Huguet, M. L., y Dellacherie, E. (1996). Calcium alginate beads coated with chitosan: Effect of the structure of encapsulated materials on their release. *Process Biochemistry*, 31(8), 745-751.
- Ishikawa, M., Sueishi, Y., Endo, N., Oowada, S., Shimmei, M., Fujii, H., y Kotake, Y. (2012). Cyclodextrin encapsulation of the functional group diminishes an antioxidant's free radical scavenging rates. *International Journal of Chemical Kinetics*, 44(9), 598-603.
- Isolabella, S., Cogoi, L., López, P., Anesini, C., Ferraro, G., y Filip, R. (2010). Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chemistry*, 122(3), 695-699.
- Jaiswal, R., Sovdat, T., Vivan, F., y Kuhnert, N. (2010). Profiling and Characterization by LC-MSn of the Chlorogenic Acids and Hydroxycinnamoylshikimate Esters in Maté (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5471-5484.
- JustFood. (2008). Global market review of functional foods – forecasts to 2013. In Report. from: <http://www.just-food.com/store/product.aspx?id=44028&lk=pop>.
- Kačuráková, M., y Mathlouthi, M. (1996). FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: characterization of the glycosidic bond. *Carbohydrate Research*, 284(2), 145-157.
- Kaunisto, E., Marucci, M., Borgquist, P., y Axelsson, A. (2011). Mechanistic modelling of drug release from polymer-coated and swelling and dissolving polymer matrix systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1), 54-77.
- Khokhar, S., y Owusu Apenten, R. K. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. *Food Chemistry*, 81(1), 133-140.
- Kizil, R., Irudayaraj, J., y Seetharaman, K. (2002). Characterization of Irradiated Starches by Using FT-Raman and FTIR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3912-3918.
- Klein, J., Stock, J., y Vorlop, K. D. (1983). Pore size and properties of spherical Calcium alginate biocatalysts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 18(2), 86-91.
- Kopcha, M., Lordi, N., y Tojo, K. J. (1991). Evaluation of release from selected thermosoftening vehicles. *J. Pharm. Pharmacol*, 43, 382-387.
- Korsmeyer, R. W., Von Meerwall, E., y Peppas, N. A. (1986). Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. II. Verification of theoretical models. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 24(2), 409-434.

- Lao, L. L., Peppas, N. A., Boey, F. Y. C., y Venkatraman, S. S. (2011). Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1), 28-41.
- Li, Y., Huang, C., Cen, Y., Xu, S., y Xu, S. (2000). Preparation of tea polyphenols sustained-release microcapsule. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 23(5), 281-284.
- Lin, C.-C., y Metters, A. T. (2006). Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(12-13), 1379-1408.
- Lucinda-Silva, R. M., Salgado, H. R. N., y Evangelista, R. C. (2010). Alginate-chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 260-268.
- Maffei Facino, R., Carini, M., y Mariani, M. (2007). Extractos de mate descafeinado y uso de los mismos. In *Oficina española de patentes y marcas*. España.
- Mastromatteo, M., Mastromatteo, M., Conte, A., y Del Nobile, M. A. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 591-598.
- Millone, M. V., Olagnero, G. F., y Santana, E. C. (2011). Alimentos funcionales: análisis de la recomendación en la práctica diaria. *Diaeta*, 29 (134), 7-15.
- Mintel. (2009). Mintel Predicts Consumer Behaviour Trends for 2010. In *Report from Mintel International Group Limited*.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., José Núñez, M., y Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171.
- Mourtzinis, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A., y Karathanos, V. T. (2007). Encapsulation of Olive Leaf Extract in  $\beta$ -Cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8088-8094.
- Munin, A., y Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793-829.
- Ndhlala, A., Moyo, M., y Van Staden, J. (2010). Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules*, 15(10), 6905-6930.
- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 503-515.
- Nori, M. P., Favaro-Trindade, C. S., Matias de Alencar, S., Thomazini, M., de Camargo Balieiro, J. C., y Contreras Castillo, C. J. (2011). Microencapsulation of propolis

- extract by complex coacervation. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 429-435.
- Nussinovitch, A. (2010). *Polymer Macro-and Micro-gel Beads: Fundamentals and Applications* (Springer ed.). New York.
- Olagnero, G., Genevois, C., Irei, V., Marcenado, J., y Bendersky, S. (2007). Alimentos funcionales: Conceptos, Definiciones y Marco Legal Global. *Diaeta*, 25(119), 33-41.
- Onwulata, C. I. (2011). Encapsulation of New Active Ingredients. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 183-202.
- Onwulata, C. I. (2012). Microencapsulation and functional bioactive foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, no-no.
- Peppas, N. A., y Khare, A. R. (1993). Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11(1-2), 1-35.
- Peppas, N. A., y Sahlin, J. J. (1989). A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, 57(2), 169-172.
- Pirt, S. J., y Whelan, W. J. (1951). The determination of starch by acid hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2(5), 224-228.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., y Gordon, M. (2001). Antioxidants in Food - Practical Applications. In): Woodhead Publishing.
- Pongjanyakul, T., y Rongthong, T. (2010). Enhanced entrapment efficiency and modulated drug release of alginate beads loaded with drug-clay intercalated complexes as microreservoirs. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 409-419.
- Portsmouth, R. L., y Gladden, L. F. (1991). Determination of pore connectivity by mercury porosimetry. *Chemical Engineering Science*, 46(12), 3023-3036.
- Pothakamury, U. R., y Barbosa-Cánovas, G. V. (1995). Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 6(12), 397-406.
- Powell, S. R. (2000). The antioxidant properties of zinc. *J Nutr*, 130(5S Suppl), 1447S-1454S.
- Puttipatkhachorn, S., Pongjanyakul, T., y Priprem, A. (2005). Molecular interaction in alginate beads reinforced with sodium starch glycolate or magnesium aluminum silicate, and their physical characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 293(1-2), 51-62.

- Rassis, D. K., Saguy, I. S., y Nussinovitch, A. (2002). Collapse, shrinkage and structural changes in dried alginate gels containing fillers. *Food Hydrocolloids*, 16(2), 139-151.
- Ren, W., y Li, J. (2009). preparation and quality evaluation of freeze-dried tea polyphenol liposome. *Chin. J. Biol*, 22, 609-612.
- Ritger, P. L., y Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 37-42.
- Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88(2), 133-138.
- Rousseau, I., Le Cerf, D., Picton, L., Argillier, J. F., y Muller, G. (2004). Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS) from calcium alginate gel beads. *European Polymer Journal*, 40(12), 2709-2715.
- Salgueiro, M. J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M. I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R., y Boccio, J. (2000). Zinc as an essential micronutrient: A review. *Nutrition Research*, 20(5), 737-755.
- Sarmiento, B., Ferreira, D., Veiga, F., y Ribeiro, A. n. (2006). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers*, 66(1), 1-7.
- Sartori, C., Finch, D. S., Ralph, B., y Gilding, K. (1997). Determination of the cation content of alginate thin films by FTi.r. spectroscopy. *Polymer*, 38(1), 43-51.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., y Bitsch, R. (2002). Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radical Research*, 36(2), 177-187.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth*, 9(7), 671-675.
- Schott, H. (1992). Kinetics of swelling of polymers and their gels. *J Pharm Sci*, 81(5), 467-470.
- Shi, P., He, P., Teh, T. K. H., Morsi, Y. S., y Goh, J. C. H. (2011). Parametric analysis of shape changes of alginate beads. *Powder Technology*, 210(1), 60-66.
- Shoaib, M. H., Tazeen, J., Merchant, H. A., y Yousuf, R. I. (2006). Evaluation of drug release kinetics from ibuprofen matrix tablets using HPMC. *Pak J Pharm Sci*, 19(2), 119-124.
- Siepmann, J., y Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 328-343.



- Siepmann, J., y Siepmann, F. (2012). Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J Control Release*, 161(2), 351-362.
- 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., y 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(6), 818-826.
- Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C. O., y Waterhouse, G. I. N. (2012). Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; a FTIR and HPLC investigation. *Food Chemistry*, 131(3), 802-810.
- Smigielska, H., Lewandowicz, G., Goslar, J., y Hoffmann, S. K. (2005). Binding of the trace elements: Cu(II) and Fe(III) to the native and modified nutritive potato starches studied by electron paramagnetic resonance. *Acta Physica Pol*, 108(2), 303-331.
- Smigielska, H., y Thanh-Blicharz, J. L. (2010). Research on zinc fortified potato starch and on its use in dessert production. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 9(2), 217-226.
- Staroszczyk, H., y Janas, P. (2010). Microwave-assisted synthesis of zinc derivatives of potato starch. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 962-969.
- Stojanovic, R., Belacak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V., y Bugarski, B. (2012). Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3), 685-696.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., y Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 47-55.
- Szakály, Z., Szente, V., Kövér, G., Polereczki, Z., y Szigeti, O. (2012). The influence of lifestyle on health behavior and preference for functional foods. *Appetite*, 58(1), 406-413.
- Taha, M. O., Nasser, W., Ardakani, A., y AlKhatib, H. S. (2008). Sodium lauryl sulfate impedes drug release from zinc-crosslinked alginate beads: Switching from enteric coating release into biphasic profiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 350(1-2), 291-300.
- Tapiero, H., y Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(9), 399-411.

- Terpinc, P., Čeh, B., Ulrih, N. P., y Abramovič, H. (2012). Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Industrial Crops and Products*, 39(0), 210-217.
- Tomasik, P., Anderegg, J. W., Baczkowicz, M., y Jane, J. L. (2001). Potato starch derivatives with some chemically bound bioelements. *Acta Pol Pharm*, 58(6), 447-452.
- Tsakiroglou, C. D., y Payatakes, A. C. (1990). A new simulator of mercury porosimetry for the characterization of porous materials. *Journal of Colloid and Interface Science*, 137(2), 315-339.
- Turkmen, N., Sari, F., y Velioglu, Y. S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4), 835-841.
- USP 34. (2011). United States Pharmacopeia -National Formulary 29. In Rockwell, MD, EE.UU.
- Valerga, J., Reta, M., y Lanari, M. C. (2012). Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 28-35.
- Vilivalam, V. D., Illum, L., y Iqbal, K. (2000). Starch capsules: an alternative system for oral drug delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3(2), 64-69.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., y Harding, S. E. (2010). Materials for Encapsulation In N. J. Zuidam y V. Nedovic (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, (pp. 31-100): Springer New York.
- Wang, Q., Hu, X., Du, Y., y Kennedy, J. F. (2010). Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 842-847.
- Wang, X., Du, Y., y Liu, H. (2004). Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan–Zn complex. *Carbohydrate Polymers*, 56(1), 21-26.
- Wasburn, E. (1921). Dynamics in capillary flow. *Physical Review*, 17(3), 273-283.
- 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(3), 99-114.
- Wootton-Beard, P. C., y Ryan, L. (2011). Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44(10), 3135-3148.

- Yang, J.-S., Xie, Y.-J., y He, W. (2011). Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 33-39.
- Yim, Z. H., Tiong, C. B., Mansa, R. F., Ravindra, P., y Chan, E. S. (2010). Release kinetics of encapsulated herbal antioxidants during gelation process. *J. Applied Sci*, 10, 2668-2672.
- Zago, M. P., y Oteiza, P. I. (2001). The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(2), 266-274.
- Zhang, L., y Kosaraju, S. L. (2007). Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *European Polymer Journal*, 43(7), 2956–2966.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., y Xie, S. (2010). DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263-271.