7011. MICROENCAPSULACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO EMPLEANDO POLEN COMO AGENTE ENCAPSULANTE

Moreno Galvis, Gildardo[1]; Revuelta, Mariana[2,3]; Gómez de Saravia, Sandra[2,4]; Yamul, Diego[5,6,7]; Navarro, Alba[1,8]

[1]Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CIDCA, UNLP- CIC-CONICET), La Plata, Buenos Aires, Argentina.
[2]Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT), CIC-CONICET- Facultad de Ingeniería-UNLP, Buenos Aires, Argentina.
[3]Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), La Plata, Buenos Aires, Argentina
[4]Universidad Nacional Arturo Jauretche (UNAJ), Buenos Aires, Argentina
[5]Facultad de Ciencias Veterinarias, PROANVET, UNICEN, Tandil, Buenos Aires, Argentina.
[6]Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), UNCPBA-CICPBA-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Tandil, Argentina.
[7]Departamento de Tecnología y Calidad de los Alimentos, UNICEN, Tandil, Argentina.
[8]Facultad de Ingeniería (UNLP), La Plata, Buenos Aires, Argentina.
gildardomoreno@quimica.unlp.edu.ar; m.revuelta@cidepint.ing.unlp.edu.ar; s.gomez@cidepint.ing.unlp.edu.ar; karim@vet.unicen.edu.ar; albanavarro@conicet.gov.ar

RESUMEN

El ácido fólico (AF) es una vitamina hidrosoluble fundamental para la síntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo celular. Sin embargo, su aplicación en alimentos está limitada por su alta inestabilidad frente a diversos factores que comprometen su biodisponibilidad. Una alternativa es la encapsulación del AF utilizando microcápsulas vacías de esporopolenina, un biopolímero natural derivado de la exina del polen, caracterizado por su resistencia química, estabilidad térmica, biocompatibilidad y estructura porosa. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un sistema de encapsulación basado en esporopolenina para proteger el AF y mejorar su estabilidad. La esporopolenina fue obtenida a partir de granos de polen apícola comercial mediante un proceso de acetólisis que incluyó tratamiento con acetona a 50 °C, éter dietílico a 25 °C y ácido fosfórico a 70 °C, generando microcápsulas vacías. La carga del AF (20 y 40mg/mL) se realizó mediante impregnación asistida por vacío (40 hPa, 20 °C), permitiendo mejor penetración del compuesto en la estructura porosa del biopolímero. Para determinar el contenido de AF encapsulado se suspendieron las cápsulas en NaOH 0,1 N, se sonicaron, filtraron y diluyeron. Luego el filtrado se calentó a 37 °C y se midió la absorbancia a 306 nm. Usando la curva de calibración, se determinó el contenido de AF y el rendimiento de encapsulación. El sistema fue caracterizado antes y después de la encapsulación mediante las siguientes técnicas: microscopía confocal (MCBL) para observar la morfología e identificar la presencia del AF dentro de las cápsulas, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para detectar grupos funcionales y posibles interacciones físicas o químicas entre el AF y la esporopolenina y análisis térmico (TGA) para evaluar la estabilidad térmica del sistema encapsulado comparado con el AF libre. Además, se realizó un ensayo de almacenamiento durante 6 meses donde el producto encapsulado fue almacenado a 24 °C, 75 % humedad relativa y luminosidad natural para evaluar la

estabilidad del sistema en condiciones reales de conservación. Los resultados revelaron un rendimiento de encapsulación de AF del 29,6 ± 1,8%, con una pérdida del 17,2 % durante el almacenamiento. Los espectros FTIR de las microcápsulas cargadas mostraron que las bandas características del AF (C=O ~ 1700 cm^{-1}) estaban ausentes en la esporopolenina pura. Asimismo, los desplazamientos o cambios de intensidad en bandas clave (~1600 cm^{-1}, ~1200–1000 cm^{-1}), indicarían interacciones entre el AF y la esporopolenina, lo que confirmaría la encapsulación. El análisis de MCBL mostró diferencias estructurales en las cápsulas cargadas, infiriendo que el AF se encontraría encapsulado. El análisis de TGA de AF libre demostró etapas de descomposición a temperaturas bajas (20 °C a 190 °C). Sin embargo, el AF encapsulado reflejó un retardo en su degradación térmica a 220 °C-400 °C, por lo que sería factible su incorporación en alimentos que deban ser sometidos a cocción en horno. La encapsulación de AF en microcápsulas de esporopolenina sugiere que la esporopolenina es un vehículo promisorio para aplicaciones en alimentos funcionales.

Palabras clave: ácido fólico, polen, encapsulación

1. Introducción

La fortificación de alimentos con micronutrientes esenciales es una estrategia efectiva y rentable para prevenir deficiencias nutricionales, especialmente en poblaciones vulnerables. En este marco, el ácido fólico (AF, vitamina B9) es clave en la síntesis de ácidos nucleicos, la formación de glóbulos rojos y la prevención de defectos del tubo neural (Saini y col., 2016). Sin embargo, su aplicación en alimentos enfrenta limitaciones tecnológicas, ya que es altamente susceptible al calor, al oxígeno, a la humedad, a la luz y al pH, reduciendo su biodisponibilidad (Mohammed y col., 2021). Ante este desafío, la microencapsulación surge como una herramienta estratégica para proteger compuestos bioactivos y mejorar su estabilidad, además de posibilitar la liberación controlada en el tracto gastrointestinal, aumentando la eficacia fisiológica del compuesto (Deng y col., 2020; Soto-Aguilar y col., 2024).

El éxito de la tecnología de encapsulación depende en gran medida del material encapsulante, y actualmente se busca emplear biomateriales naturales, biodegradables y seguros que no alteren las propiedades sensoriales de los alimentos. En este contexto, la esporopolenina, un biopolímero presente en la exina del polen, se destaca como matriz de encapsulación prometedora. Su red tridimensional de ácidos fenólicos, polienos y carotenoides le confiere gran estabilidad química y térmica, además de resistencia a ácidos, bases y disolventes (Diego-Taboada y col., 2014; Prabhakar, 2018). Tras eliminar el contenido citoplasmático del polen, se obtienen cápsulas huecas con cavidades internas capaces de alojar fármacos, vitaminas y antioxidantes (Deng y col., 2020). Akyüz y col (2017) encapsularon pantoprazol en esporopolenina con una eficiencia cercana al 30 %,

logrando mayor estabilidad térmica. Posteriormente, Mohammed y col (2021) encapsularon AF en esporopolenina de polen apícola, observando protección frente a fotodegradación y descomposición térmica mediante análisis FTIR y TGA. Sin embargo, los estudios son aún limitados y faltan investigaciones sobre la influencia del tipo de polen, las condiciones de carga, la caracterización estructural avanzada y la estabilidad en condiciones de almacenamiento real.

El presente trabajo busca diseñar y validar un sistema de encapsulación de AF en microcápsulas de esporopolenina obtenidas de polen apícola comercial. El método propuesto emplea extracción por acetólisis y carga mediante impregnación asistida por vacío, técnica que favorece la penetración uniforme del AF sin recurrir a solventes ni condiciones agresivas.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Los granos de polen fueron adquiridos en comercios naturistas. Se usó ácido fólico Parafarm® (Buenos Aires, Argentina) con una pureza del 96%, sulfóxido de dimetilo (DMSO) (99% de pureza) Biopack (Buenos Aires, Argentina), hidróxido de sodio (97% de pureza) Anedra (Buenos Aires, Argentina).

2.2. Obtención y encapsulación de ácido fólico en microcápsulas de esporopolenina

Las microcápsulas de esporopolenina se obtuvieron a partir de polen de acuerdo con lo reportado por Tan y col. (2020), mediante un tratamiento secuencial que incluyó la extracción con acetona a 50 °C para eliminar lípidos superficiales, éter dietílico a 25 °C y la digestión con ácido ortofosfórico a 70 °C para remover la intina (polisacáridos). Posteriormente, las esporas se filtraron, lavaron exhaustivamente y secaron a 60 °C, obteniéndose así microcápsulas de esporopolenina libres de nitrógeno (MEL). Estas se almacenaron a 20 °C hasta su posterior utilización.

Para el proceso de carga se empleó el método de difusión asistida por vacío. Para ello se suspendieron 300 mg de MEL secas en cada una de 3 soluciones preparadas con 200 mg (MEL1a y MEL1b) y 400 mg (MEL2) de AF disuelto en 10 ml de DMSO. Se agitó la mezcla durante 1 h a 500 rpm. Las suspensiones (MEL1b y MEL2) fueron colocadas en un desecador al vacío (~40 hPa) durante 2 h adicionales para favorecer la difusión del compuesto a través de las paredes porosas de la exina, excepto MEL1a que

se dejó 1,5 h. Finalmente, las microcápsulas fueron secadas a 80 °C y almacenadas a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad hasta su análisis.

2.3. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de ácido fólico

Se suspendieron 10 mg de MEL previamente cargados con AF en 5 mL de NaOH 0,1 N. La suspensión se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y, posteriormente, se sometió a sonicación durante 2 min, en tres ciclos de 40 s cada uno, con una amplitud del 50 %. Finalizada la sonicación, la suspensión se filtró y se tomó una alícuota de 1 mL del filtrado, la cual fue diluida hasta un volumen final de 10 mL con NaOH 0,1 N. La concentración de AF liberado se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis a 306 nm. Se utilizó NaOH 0,1 N como blanco.

A través de las siguientes formulas se evaluó la capacidad de carga (CC%) y la eficiencia de encapsulación (EE%)

$CC\% = \frac{cdc}{\omega ec} * 100$ Donde cdc cantidad de AF cargado y ωec peso de la esporopolenina cargada con AF.

$EE\% = \frac{CPf}{CTf} * 100$ Donde CPf es la carga práctica de AF y CTf es la carga teórica del AF.

2.4. Caracterización de las microcápsulas

2.4.1. Análisis de la microestructura

Se utilizó un microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP5 (Alemania), con fuentes láser de longitudes de onda de excitación de 458 nm, 488 nm y 543 nm. La emisión de fluorescencia se recolectó utilizando filtros específicos para los rangos espectrales 410–481 nm, 491–541 nm y 595–735 nm, correspondientes a las señales emitidas por las estructuras internas y el ácido fólico encapsulado.

2.4.2. Análisis de grupos funcionales

Se utilizó la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) utilizando un equipo Thermo Scientific Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Los espectros infrarrojos se registraron en el rango espectral de 4000 a 400 cm^{-1}, con resolución de 4 cm^{-1} y cada espectro se obtuvo como promedio de 32 escaneos. Los datos se utilizaron para identificar posibles interacciones químicas entre el ácido fólico y la matriz de esporopolenina, así como para confirmar la presencia de grupos funcionales característicos.

2.4.3. Análisis termogravimétrico

El ensayo se llevó a cabo utilizando un analizador térmico TGA Q50 V20.13 Build 39 (Shimadzu, Japón) a fin de evaluar la estabilidad térmica de las microcápsulas. Las muestras (1,5 mg) fueron colocadas en crisoles de platino y calentadas desde temperatura ambiente hasta 800 °C a una velocidad constante de 10 °C/min. El análisis se realizó bajo una atmósfera inerte de nitrógeno con un flujo continuo de 20 mL/min.

2.4.4. Estabilidad durante el almacenamiento en condiciones ambientales

Se evaluó la estabilidad del AF encapsulado almacenando las MEL durante seis meses en condiciones ambientales controladas. Las muestras (1 g) se mantuvieron a 20 °C y humedad ambiente, expuestas a luz natural. Al finalizar, el contenido residual de AF se determinó por UV-Vis para comprobar la eficacia del sistema frente a factores de degradación.

2.5. Análisis estadístico

Se utilizó el software Infostat (Infostat, versión 2014e). Se realizó análisis de varianza y se calcularon las diferencias mínimas significativas para comparar medias a un nivel del 95% mediante la prueba de Fisher. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

3. Resultados y discusión

3.4. Microestructura de las cápsulas de esporopolenina

La Figura 1 muestra las imágenes obtenidas por MCBL de las distintas formulaciones estudiadas.

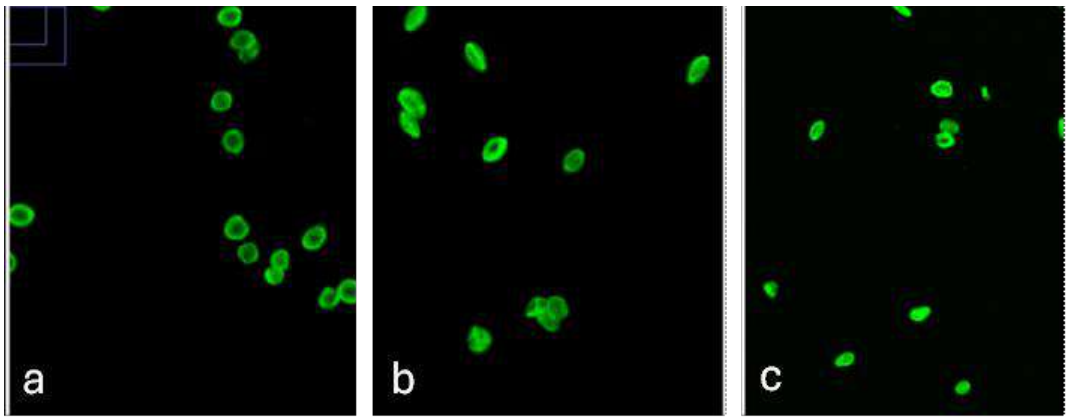

Figura 1. Micrografías de fluorescencia de esporopolenina derivada de polen apícola por MCLB. Las imágenes muestran: (a) MEL, (b) MEL1b, y (c) MEL2.

Las cápsulas MEL 2 presentaron la mayor intensidad media por partícula y un patrón de fluorescencia tanto perimetral como intracápsula, mientras que las MEL exhibieron señal predominantemente en la exina y baja fluorescencia intracapsular, consistente con cápsulas vacías. La MEL1b presenta una intensidad intermedia, con fluorescencia detectada tanto en la periferia como en el interior, aunque de manera menos homogénea que en MEL2. La diferencia en intensidad entre MEL1b y MEL2 indica una mayor eficiencia de encapsulación en MEL2. En contraste, el control MEL exhibe solo autofluorescencia de la esporopolenina, lo cual valida la interpretación de que las señales observadas en MEL1b y MEL2 son atribuibles al material exógeno encapsulado. Este comportamiento concuerda con lo reportado por (Atalay y col., 2022), quienes documentan que la integridad estructural de las cápsulas influye directamente en la capacidad de carga.

3.5. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de AF

La Figura 2 muestra que MEL1a y MEL1b presentaron valores similares (7,86 ± 0,15 % y 7,64 ± 0,18 %; $p > 0,05$), mientras que MEL2 alcanzó una capacidad significativamente mayor (10,89 ± 0,21 %; $p < 0,05$), con un incremento relativo de ~40 %. Este aumento se atribuye al mayor gradiente de concentración durante la impregnación a vacío (Wang y col., 2021). La similitud entre MEL1a y MEL1b sugiere saturación parcial de sitios activos por debajo de 20 mg/mL, consistente con el modelo de Langmuir (Foo & Hameed, 2010).

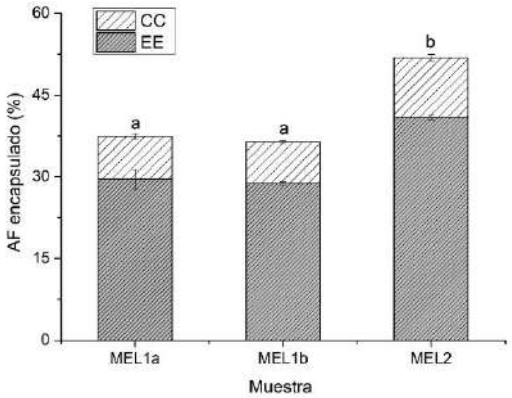

Figura 2. Capacidad de carga (CC%) y eficiencia de encapsulación (EE%) de ácido fólico en diferentes formulaciones (MEL1a, MEL1b y MEL2). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre muestras ($p < 0,05$).

En cuanto a la eficiencia de encapsulación, MEL1a y MEL1b mostraron valores cercanos (30,5 ± 1,2 % y 28,9 ± 1,0 %), mientras que MEL2 alcanzó 40,8 ± 1,3 %, evidenciando una mejora significativa atribuida a mayor afinidad matriz-compuesto y a condiciones de impregnación más efectivas, en concordancia con lo reportado por otros autores (Mohammed y col., 2022).

3.6. Análisis por espectroscopía FTIR

El AF mostró bandas características de sus principales grupos funcionales (Figura 3): una intensa en 1695–1715 cm^{-1} atribuida al estiramiento C=O del grupo carboxílico, señales en 1600–1650 cm^{-1} asociadas a vibraciones C=N y C=C del anillo pteridínico (Bakhshi y col., 2013), y bandas entre 1500–1550 cm^{-1} relacionadas con deformaciones N–H (Akhgari y col., 2022). El espectro de la esporopolenina vacía presentó bandas propias de su estructura polimérica aromática: señal moderada en ~1700 cm^{-1} atribuida a carbonilos residuales, bandas en 1600 y 1510 cm^{-1} correspondientes a estiramientos C=C de estructuras aromáticas, señales en 1050–1250 cm^{-1} asociadas a enlaces C–O y C–C de grupos fenólicos, y vibraciones fuera del plano en 800–700 cm^{-1}, típicas de anillos aromáticos sustituidos.

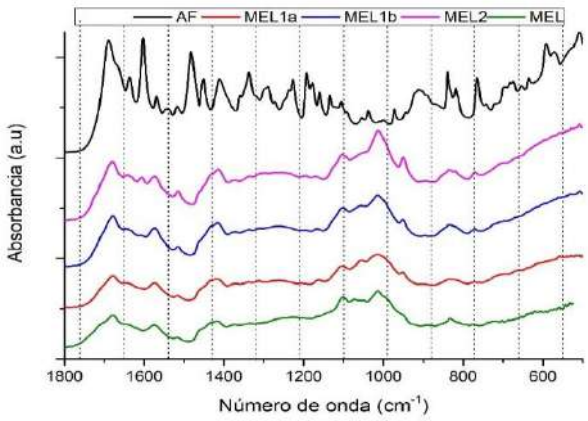

Figura 3. Espectros FTIR (región de la huella dactilar) del ácido fólico (AF), la matriz encapsulante (MEL) y las formulaciones (MEL1a, MEL1b y MEL2)

. Los espectros de las microcápsulas cargadas evidenciaron la combinación de bandas del AF y de la esporopolenina, confirmando la presencia del compuesto en la matriz. Se observó un aumento progresivo en la intensidad de las bandas en torno a 1700 y 1600–1650 cm^{-1}, más notorio en MEL2, lo que indica mayor incorporación de AF. No se observaron nuevas bandas ni desplazamientos significativos que sugieran la formación

de enlaces covalentes, lo que indica que la encapsulación ocurrió principalmente por interacciones físicas. Este comportamiento ha sido reportado previamente en sistemas de encapsulación con biopolímeros naturales, donde la retención de compuestos bioactivos ocurre sin modificar su estructura molecular (Jafari y col., 2025; Mohammed y col., 2022).

3.7. Análisis termogravimétrico (TGA)

Las curvas TGA (Figura 4) se dividieron en tres regiones: desorción de humedad (30–120 °C), degradación del ácido fólico (AF) (220–330 °C) y degradación de la esporopolenina (>330 °C). La muestra MEL mostró baja pérdida inicial de humedad y dos eventos principales a 341,49 °C y 471,79 °C, confirmando su alta estabilidad térmica (Atalay et al., 2022; Diego-Taboada et al., 2014a). El AF puro presentó etapas diferenciadas: eliminación de agua (66–95 °C), degradación inicial (219 °C), un evento principal a 264,40 °C, otro a 315,59 °C y oxidación parcial a 513,05 °C, con un 26 % de residuo estable a 800 °C. En MEL1a se observaron dos eventos: degradación inicial hasta 361,42 °C, vinculada a la liberación de AF superficial, y otro a 480,31 °C asociado a dominios aromáticos más estables, indicando encapsulación y protección parcial del AF (Jafari y col., 2025), con un residuo final del 15 %. En MEL1b aparecieron cuatro eventos entre 220–330 °C, con pérdidas a 260 y 300 °C (~45 %), lo que evidencia fracciones de AF con distinta interacción con la matriz (Aylanc y col., 2025; Diego-Taboada y col., 2014). La degradación >330 °C mostró pérdidas adicionales y un residuo del 10 %, lo que refleja una encapsulación menos eficiente que en MEL1a.

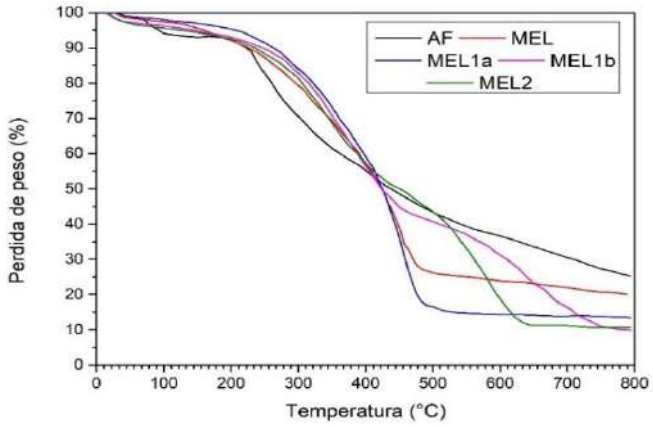

Figura 4. Análisis termogravimétrico (TGA) de ácido fólico puro (AF) y diferentes mezclas con matrices encapsulantes (MEL, MEL1a, MEL1b y MEL2).

Finalmente, MEL2 presentó la mayor pérdida (~65 %) entre 220–430 °C, con un pico a 351 °C, confirmando mayor cantidad de AF encapsulado. La degradación posterior fue menor (~10 %), con un residuo del 12 %, manteniendo similitud con el AF puro, pero con un rango de degradación más amplio, lo que sugiere protección parcial frente a la descomposición térmica.

3.8. Estabilidad durante el almacenamiento

La Figura 5 muestra la pérdida de AF encapsulado durante el almacenamiento. En los primeros 30 días, las pérdidas fueron mínimas (<5 %), indicando adecuada protección inicial. A partir de los 60 días, la degradación aumentó, siendo más marcada en MEL2 (carga alta). A los 180 días, MEL2 alcanzó ~28 %, mientras que MEL1a y MEL1b presentaron menores pérdidas (~22 % y ~18 %, respectivamente).

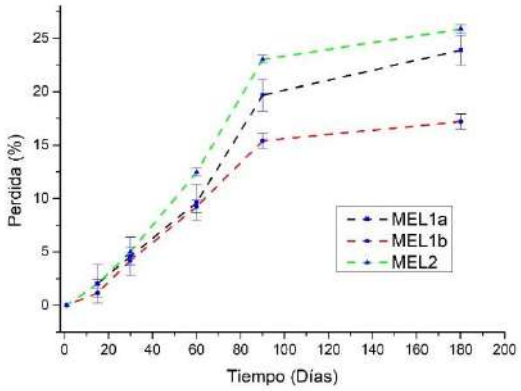

Figura 5. Pérdida de ácido fólico (%) en las formulaciones MEL1a, MEL1b y MEL2 durante el almacenamiento a 25 °C.

Estos resultados evidencian que cargas elevadas superan la capacidad protectora de la esporopolenina, mientras que concentraciones moderadas (MEL1b) favorecen la estabilidad. Optimizar la carga inicial es clave para maximizar la protección durante el almacenamiento.

4. Conclusiones

La esporopolenina de polen apícola demostró ser una matriz eficaz para encapsular ácido fólico, generando microcápsulas con buena integridad y sin restos intracelulares. La impregnación asistida por vacío permitió una alta eficiencia de carga, mientras que FTIR y microscopía confirmaron la presencia del AF sin alterar la estructura. Los análisis TGA evidenciaron un retardo en la degradación térmica y mayor estabilidad en

condiciones de almacenamiento moderado. Estos resultados posicionan a la esporopolenina como biomaterial natural prometedor para alimentos funcionales y programas de fortificación.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el CONICET (PIP 0563) y la Facultad de Ingeniería de (UNLP) a través de la EPEC.

6. Referencias

Akhgari, A., Iraji, P., Rahiman, N., Farouji, A. H., & Abbaspour, M. (2022). Preparation of stable enteric folic acid-loaded microfiber using the electrospinning method. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 25(3), 405–413.

Akyuz, L., Sargin, I., Kaya, M., Ceter, T., & Akata, I. (2017). A new pollen-derived microcarrier for pantoprazole delivery. Materials Science and Engineering: C, 71, 937–942.

Atalay, F. E., Culum, A. A., Kaya, H., Gokturk, G., & Yigit, E. (2022). Different Plant Sporopollenin Exine Capsules and Their Multifunctional Usage. ACS Applied Bio Materials, 5(3), 1348–1360.

Aylanc, V., Ertosun, S., Peixoto, A. F., Santamaria-Echart, A., Russo-Almeida, P., Vale, N., Freire, C., & Vilas-Boas, M. (2025). Development of natural sporopollenin microcapsules: from bee pollen to versatile biomaterials. Emergent Materials, 1–16.

Bakhshi, P. K., Nangrejo, M. R., Stride, E., & Edirisinghe, M. (2013). Application of Electrohydrodynamic Technology for Folic Acid Encapsulation. Food and Bioprocess Technology, 6(7), 1837–1846

Deng, Z., Pei, Y., Wang, S., Zhou, B., Hou, X., Li, J., Li, B., & Liang, H. (2020). Designable Carboxymethylpachymaran/Metal Ion Architecture on Sunflower Sporopollenin Exine Capsules as Delivery Vehicles for Bioactive Macromolecules. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(47), 13990–14000.

Diego-Taboada, A., Beckett, S. T., Atkin, S. L., & Mackenzie, G. (2014). Hollow Pollen Shells to Enhance Drug Delivery. Pharmaceutics 2014, Vol. 6, Pages 80-96, 6(1), 80–96.

Foo, K. Y., & Hameed, B. H. (2010). Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. Chemical Engineering Journal, 156(1), 2–10.

Jafari, Y., Sabahi, H., & Rezayan, A. H. (2025). Stability and loading properties of Curcumin encapsulated in saffron pollen. Food Chemistry Advances, 7, 101009.

Mohammed, A. S. Y., Dyab, A. K. F., Taha, F., & Abd El-Mageed, A. I. A. (2021). Encapsulation of folic acid (vitamin B9) into sporopollenin microcapsules: Physico-chemical characterisation, in vitro controlled release and photoprotection study. Materials Science and Engineering: C, 128, 112271.

Mohammed, A. S. Y., Dyab, A. K. F., Taha, F., & Abd El-Mageed, A. I. A. (2022). Pollen-derived microcapsules for aspirin microencapsulation: in vitro release and physico-chemical studies. RSC Advances, 12(34), 22139–22149.

Prabhakar, A. K. (2018). Pine pollen for molecular encapsulation and oral delivery applications [Doctor of Philosophy, Nanyang Technological University]

Saini, R. K., Nile, S. H., & Keum, Y. S. (2016). Folates: Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability. Food Research International, 89, 1–13.

Soto-Aguilar, D., Scholten, E., Fogliano, V., & Madadlou, A. (2024). All-aqueous emulsions stabilized by sporopollenin exine capsules. Food Hydrocolloids, 148, 109447.

Tan, E. L., Potroz, M. G., Ferracci, G., Wang, L., Jackman, J. A., & Cho, N. J. (2020). Hydrophobic to superhydrophilic tuning of multifunctional sporopollenin for microcapsule and bio-composite applications. Applied Materials Today, 18, 100525.

Wang, Y., Sun, L., Guo, J., Shi, K., Shang, L., Xiao, J., & Zhao, Y. (2021). Pollens derived magnetic porous particles for adsorption of low-density lipoprotein from plasma. Bioactive Materials, 6(6), 1555–1562.