



Nanoencapsulación de polifenoles procedentes de grano de cacao (*Theobroma cacao L.*)

C.N. Quiroz Reyes y M.A. Aguilar Méndez

Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional,
Legaria 694. Colonia Irrigación, 11500 México D. F.

Introducción

Las reacciones de oxidación ocurren en el cuerpo humano, estas se forman como subproductos de la respiración y metabolismo oxidativo en todas las células de los organismos aerobios. A pesar de que el oxígeno es necesario para que las células aerobias generen energía, tiene el inconveniente de producir pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar lesiones en las macromoléculas causando consecuencias citopatológicas del desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de la célula para defenderse de ellos. Esto se encuentra relacionado con un número de enfermedades crónicas como cáncer, artritis reumatoide, Alzheimer, aterosclerosis y diabetes [1,6].

Al mostrarse el cuerpo vulnerable ante estos radicales es necesario una ingesta adecuada de antioxidantes que disminuyan la concentración de estas especies reactivas para prevenir los efectos negativos antes mencionados [1,2].

Los flavonoides (figura 1) han adquirido gran importancia en la última década por sus propiedades antioxidantes y benéficas para el cuerpo humano, esto se le atribuye a su estructura. Sin embargo, la biodisponibilidad de los mismos es limitada debido a interacciones (Fuerzas de Van der Waals) y a la sensibilidad que presentan ante el cambio de pH, esto provoca que tras la ingesta en dieta, una cantidad mínima sea absorbida por el cuerpo y lo demás sea desechado por la orina. Por ello este proyecto pretende nanoencapsular polifenoles que se encuentran en los granos de cacao, facilitando de esta forma su absorción en el organismo [4],[5],[7]. Se utilizará la cascarilla de este grano y sus cotiledones.

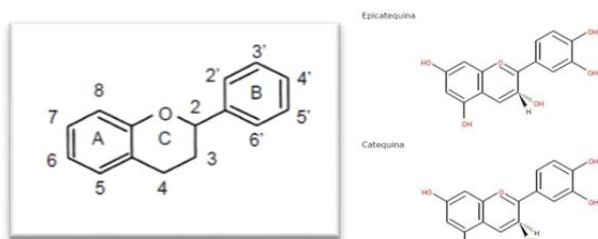


Fig.1. Estructura química de flavonoides

Metodología

Método de extracción de flavonoides por maceración

Se realizó una extracción orgánico-ácida de la cascarilla de cacao y cotiledón. Dicho extracto contendrá el total de polifenoles extraíbles presentes en la muestra. Para ello, 1 gramo de polvo se extrajo con 20 ml de solución acuosa de metanol (50% v/v) conteniendo 0,8% de HCl 2N. Se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente (21-22°C).

Posteriormente se centrifugó (15 min, 3.000 rpm) separando los sobrenadantes. Los residuos se extrajeron de nuevo con 20 ml de acetona:agua (70: 30 v/v), repitiendo la centrifugación y combinando los sobrenadantes con los obtenidos anteriormente.

Se repitió el mismo proceso antes mencionado pero utilizando únicamente agua destilada a 55°C como solvente y con un tiempo de agitación de 2 horas, esto con la finalidad de comparar cual es el solvente más adecuado para la obtención de los flavonoides.

Método por vía ultrasónica

La extracción orgánico-ácida de la fibra de cacao se realizó de la siguiente forma: 1 gramo de cascarilla ó cotiledón se extrajo con 20 ml de solución acuosa de metanol (50% v/v) conteniendo 0,8% de HCl 2N. Se colocó a temperatura ambiente (21-22°C) durante 15 minutos en un aparato ultrasónico a 25 kHz. Posteriormente tras centrifugar (15 min a 3.000 rpm), se separaron los sobrenadantes y los residuos se extrajeron de nuevo con 20 ml de acetona:agua (70: 30 v/v). Se realizó nuevamente el proceso de extracción vía ultrasónica durante 15 minutos y después se centrifugó, combinando los sobrenadantes con los obtenidos anteriormente. También se incrementó el tiempo a 30 minutos y se combinaron los métodos. El mismo proceso fue repetido utilizando únicamente agua destilada a 60-65°C como solvente.

Identificación de Flavonoides (Espectroscopia UV-VIS)

Se realizó un barrido (800-190 nm) en un espectrofotómetro de doble haz para observar la existencia de flavonoides en los extractos.

Evaluación de Contenido Fenólico Total

El contenido fenólico total se calculó a partir de la capacidad de reducción del reactivo de Folin-Ciocolteau utilizando ácido gálico como patrón [3].

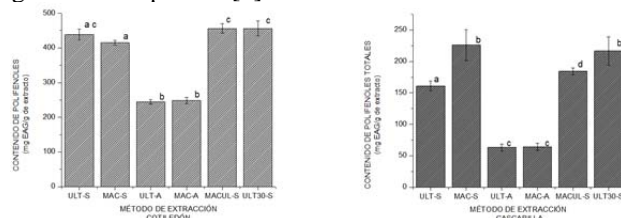


Fig.2. Contenido de Polifenoles totales en cotiledón y cascarilla de cacao las barras que muestran letras diferentes indican diferencias significativas.

Determinación de la Capacidad Secuestradora de Radicales Libres (DPPH)

Se tomó una alícuota de 2 ml de extracto (se diluyó y filtró previamente 1 mg de extracto seco/ml de metanol) ó estándar, se mezcló con 500µL de Buffer Tris-HCl 0.1M y agitó con



Memorias en extenso

vortex por 5 segundos. Posteriormente se agregaron 2 ml de 200µM de DPPH preparado previamente en metanol. Se mezcló vigorosamente durante 5 segundos en vortex y dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La absorbancia fue leída a una longitud de 517 nm y el porcentaje de reducción de DPPH fue calculado de la siguiente manera.

Efecto de reducción %

$$= \left[1 - \frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de control}} \right] * 100$$

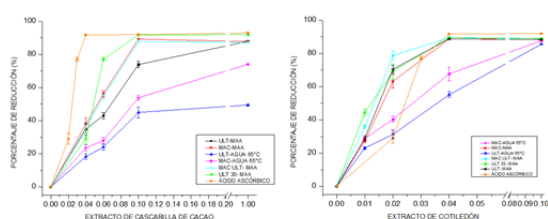


Fig.3 Efecto de reducción del radical DPPH

Nanoencapsulación (Doble-Emulsión)

Este proceso se realizó a través del método de doble emulsificación, en este caso, en la primera emulsificación w/o el aceite fue sustituido por una fase orgánica (acetona), la primera emulsificación se efectuó agregando a la fase orgánica (acetona/metanol/extracto seco) la fase acuosa (agua/gelatina) sometiéndolas a proceso de homogenización empleando un equipo Ultraturrax durante 5 minutos. A través de este proceso se tiene la fase miscible en agua fuera de la fase orgánica y el polímero como nanoencapsulante. Esta fue nuestra primera emulsión, la cual fue agregada a la fase acuosa dos, que consistió en agua (2-5ml) con un agente estabilizante en este caso Tween 80 (0.1-0.5 ml), esta segunda emulsificación también fue sometida a un proceso de homogenización constante durante 5 minutos.

El solvente orgánico remanente en la nanoemulsión fue removido por evaporación a 15 psi de presión y 40°C de temperatura.

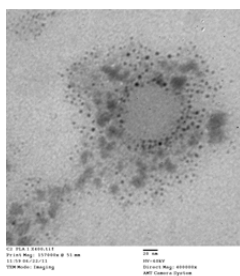


Fig.4. Nanocapsulas obtenidas con pLa

Resultados y Discusión

Los resultados en cada caso muestran que los mejores métodos para extraer polifenoles de la cascarilla de cacao (Fig. 2) fueron: Maceración (2-2) y Ultrasonido (30-30), respecto al cotiledón encontramos: Ultrasonido (15-15), Maceración-Ultrasonido y Ultrasonido (30-30), esto se puede atribuir a la consistencia de los sólidos que se utilizaron para la extracción. En el caso del polvo extraído del cotiledón, este presentó una consistencia más suave que el obtenido de la cascarilla de cacao, tal propiedad permitió que no existiera gran resistencia u oposición al paso de las ondas ultrasónicas a través de la estructura facilitando la obtención de polifenoles. Por ello con una mínima exposición durante 15 minutos a 25kHz fue suficiente para obtener una cantidad altamente significativa, no así el caso de la cascarilla de cacao, ya que tiene una consistencia más dura y fibrosa que requiere de un esfuerzo mecánico mayor.

En cuanto a la actividad antioxidante (Fig.3) encontramos que los extractos obtenidos con mezcla orgánica-ácida mostraron una mayor actividad antioxidante frente a los extractos obtenidos con agua destilada a temperatura constante 60-65°C así como el cotiledón frente a la cascarilla. En cuanto al tamaño de nanocápsulas estas fueron caracterizadas por TEM y el tamaño osciló entre 250-450nm (Fig. 4).

Referencias

[1]Hertog, M.G.L., Feskens, (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. *The Lancet*, 342 (8878), 1007-1011.
 [2]Knekt, P. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*, 312, 478-481.
 [3]Lecumberri E. (2006). Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de animales de experimentación. *Nutrición Hospitalaria*, 21(5), 622-628.
 [4]Seigo Baba, Naomi Osakabe, Midori Natsume (2001). In Vivo Comparison of the Bioavailability of (+)-Catechin, (-)-Epicatechin and their mixture in orally administered rats. *The Journal of Nutrition*, 131, 2885-2891.
 [5]M. Arlorioa, J.D. Coisson (2005). Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Research International*, 38, 1009-1014.
 [6]C.E. Mora-Huerta, H. Fessi (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385, 113-142.
 [7]Azizah Othman, Amin Ismail, Nawalyah Abdul Ghani a, Ilham Adenan(2005). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry* 100, 1523-1530.