



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

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

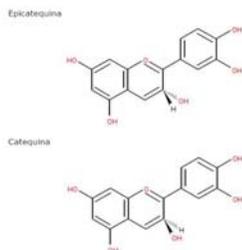
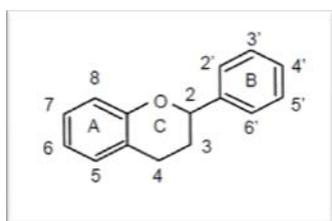
Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional,
Legaria 694. Colonia Irrigación, 11500 México D. F.

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 que produce 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 el cáncer, la artritis reumatoide, Alzheimer, la aterosclerosis y la diabetes [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 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 en el caso de las catequinas. Por ello este proyecto pretende nanoencapsular catequina/epicatequina, flavonoides pertenecientes a los compuestos polifenólicos que se encuentra en los granos de cacao, facilitando de esta forma su absorción en el organismo [4],[5],[7]. Particularmente se utilizará la fibra de este grano y sus cotiledones.



Metodología

Método de extracción de flavonoides por maceración

Se realizó una extracción orgánico-ácida de la fibra de cacao. Dicho extracto contendrá el total de polifenoles extraíbles presentes en la muestra. Para ello, 1 gramo de fibra de cacao se extrajo con 20 mL de solución acuosa de metanol (50% v/v) conteniendo 0,8% de HCl 2N.

Se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente (21-22°C). Posteriormente se centrifugó (15 min, 3.000 rpm) se separaron los sobrenadantes y 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 hará de la siguiente forma: 1 gramo de fibra de cacao se extraerá con 20 mL de solución acuosa de metanol (50% v/v) conteniendo 0,8% de HCl 2N.

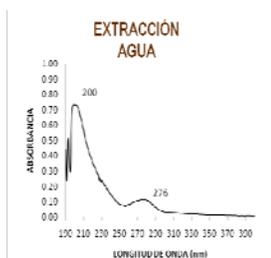
Se colocará a temperatura ambiente (21-22°C) durante 15 minutos en un aparato ultrasonico a 25 kHz, posteriormente tras centrifugar (15 min a 3.000 rpm) se separarán los sobrenadantes y los residuos se extraerán de nuevo con 20 mL de acetona: agua (70: 30 v/v), se realizará nuevamente el proceso de extracción vía ultrasónica durante 15 minutos, después se centrifugará y combinarán los sobrenadantes con los obtenidos anteriormente.

El mismo proceso será repetido utilizando únicamente agua destilada a 55°C como solvente.

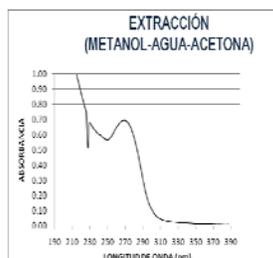
La razón de emplear el método de maceración y vía ultrasónica es para determinar si es posible optimizar el tiempo de extracción y si este repercute significativamente en la cantidad de flavonoides extraídos.

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. (Gráfica 1 y 2)



Grafica 1



Grafica 2

La grafica 1 muestra dos picos característicos en literatura consultada de la catequina que se encuentran en 200-276 nm y la grafica 2 solo muestra un pico en 276 nm, con ello se puede concluir de forma preliminar que la extracción organica-acida presenta una mayor concentración de los compuestos buscados.[8],[9]

Identificación de Flavonoides por prueba fotoquímica colorimétrica

Se tomó una muestra de 0.5 ml del extracto y se aforó con metanol a un volumen de 2 ml. Se preparó una solución de NaOH al 10% y se agregaron 3 gotas al extracto aforado, se visualizó un cambio de coloración (café) y la presencia de precipitación, esta prueba indica que existen flavonoides en nuestro extracto.[8]

Evaluación de Contenido Fenólico Total

El contenido fenólico total se calculará a partir de la capacidad de reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como patrón (0-400 ppm) [3].

Nanoencapsulación (Doble-Emulsión)

Este proceso se realizará a través del método de doble emulsificación, en este caso, en la primera emulsificación w/o el aceite, será sustituido por una fase orgánica que contenga un solvente que sea total o parcialmente miscible en agua, este proceso se efectuará vía ultrasónica, no se debe de dejar de tomar en cuenta que en la primera emulsificación también se agrega el polímero que encapsulará nuestros flavonoides obtenidos del extracto de cacao, en este caso ha sido designada la gelatina por sus propiedades estabilizadoras y fácil reconocimiento en el cuerpo, las relaciones serán aproximadamente de (0.5-2.5mg) de flavonoides/0.15-0.5 de ml de agua, para la fase orgánica esta se compondrá de un 5-10% de polímero (gelatina), del surfactante de un 5-7% (Tween 20) y del solvente de 1.5-5 ml (acetato de etilo).

A través de este proceso se tiene la fase miscible en agua dentro de la fase orgánica y el polímero como nanoencapsulante, la primera emulsión es agregada a la fase acuosa dos, esta consiste en agua (2-5ml) con un agente estabilizante en este caso alcohol polivinílico (1-5%), esta será nuestra segunda emulsificación.

Posteriormente esta segunda emulsión será sometida a difusión al ser vertida a un recipiente que contenga un solvente (alcohol Etílico) en continua agitación con ello se provocará la precipitación de las nano cápsulas. El solvente (alcohol etílico) será eliminado por evaporación.[6]

Evaluación antioxidante de extracto y nanocapsulas

Método del radical DPPH* (1,1-difenil-2-picril-hidracil). Se hará reaccionar 50 µL de muestra con 950 µL de DPPH (100 µM) en etanol al 96%, la absorbancia será monitoreada a 515 nm, a intervalos de 30 segundos durante 10 minutos. Para la determinación de la actividad antioxidante, los resultados serán expresados en términos de IC₅₀, K₂ y Poder Antirradical

a) *Coefficiente de inhibición (IC50).* Se determinará mediante un análisis de regresión del porcentaje de remanente versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50% del radical DPPH.

$$\%DPPHrem = [DPPH_f / DPPH_i] \times 100$$

Donde (DPPH)_f es la absorbancia del radical DPPH al final de la reacción, (DPPH)_i es la absorbancia del radical al inicio de la reacción. El valor de IC₅₀, será expresado en términos de Ácido Ascórbico Equivalente (AAE)

b) *Constante de velocidad K2.* El valor de K₂ es un parámetro que diferencia a los compuestos de acuerdo a la reactividad intrínseca. Los valores de cinética de absorbancia obtenidos por la decoloración del DPPH para cada concentración de las soluciones de trabajo: $A = (t + 1)^b$ (4)

Donde: A, es la absorbancia en cualquier tiempo t; a y b, son constantes; t, es el tiempo de reacción.

c) *Poder antirradical.* El poder antirradical, referido a la eficiencia de un antioxidante, fue evaluado de acuerdo a la metodología descrita por Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995).

Referencias

- [1]Hertog, M.G.L., Feskens, (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease.
- [2]Knekt, P., (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study.
- [3]Lecumberri*,(2006)Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de animales de experimentación
- [4]Seigo Baba*,1, Naomi Osakabe*, Midori Natsume* (2001),In Vivo Comparison of the Bioavailability of (+)-Catechin, (-)-Epicatechin and Their Mixture in Orally Administered Rats.
- [5]M.Arlorioa,*,J.D.Cor'sson (2006) Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from Theobroma cacao hulls extracted with supercritical CO₂.
- [6]C.E. Mora-Huerta, H. Fessi (2009). Polymer-based nanocapsules for drug delivery
- [7]Azizah Othman a, Amin Ismail a,*, Nawalyah Abdul Ghani a, Ilham Adenan(2005), Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans
- [8]B.García(2005) Absorción in vivo de oligómeros de epicatequina, Universitat Rovira I Virgili
- [9]M. Rosales, R. F. González, N.E. Rocha,(2009) Evaluación química y capacidad antioxidante de extractos polifenólicos de cortezas de Pinus cooperi, P. engelmannii, P. leiophylla y P. teocote.