

## EFFECTO DE POLIANIONES Y TAMAÑO DE ENCAPSULADOS DE $\alpha$ -TOCOFEROL

Rosales Martínez, P<sup>a</sup> \*, Cornejo Mazón, M<sup>b</sup>, Hernández Sánchez, H<sup>c</sup>.

a,b,c Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Biofísica, Biotecnología de Alimentos (Depto. de Ingeniería Bioquímica). Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, C.P. 11340, México, D.F, México. \* [ninfa83@hotmail.com](mailto:ninfa83@hotmail.com)

### RESUMEN:

La encapsulación de compuestos bioactivos representa un enfoque viable y eficiente para preservar la estabilidad de gran variedad de sustancias activas, ya que constituye un medio de protección para dichas especies químicas lábiles. Se tiene una vasta evidencia científica referente a la sobresaliente capacidad antioxidante de  $\alpha$ -Tocoferol, que ha sido ampliamente estudiada por ser benéfica para limitar procesos patológicos. En el presente trabajo se obtuvieron encapsulados de quitosano conteniendo  $\alpha$ -Tocoferol utilizando como polianión, pirofosfato de sodio (SPP) y Tripolifosfato de sodio (TPP). Posteriormente se realizaron determinaciones de la actividad antioxidante de los encapsulados por medio de dos métodos: DPPH y FRAP. En las determinaciones de la actividad antioxidante en encapsulados de  $\alpha$ -Tocoferol, se obtuvo la mejor respuesta antioxidante mediante el ensayo de FRAP. En la caracterización de cápsulas de quitosano/Vitamina E, se obtuvieron tamaños de partícula menores comparado con las cápsulas formadas con quitosano/SPP o TPP como polianión.

### ABSTRACT:

The encapsulation of bioactive compounds represents a viable and efficient to preserve the stability of many active substances approach as a means of protection for chemical species such labile. There is vast scientific evidence regarding the outstanding antioxidant capacity of  $\alpha$ -tocopherol, which has been widely studied to be beneficial to limit pathological processes. In the present work were obtained encapsulated chitosan containing  $\alpha$ -tocopherol used as polyanion, sodium pyrophosphate (SPP) and sodium tripolyphosphate (TPP). After were performed determinations of antioxidant activity of the encapsulated by two methods DPPH and FRAP. In the determinations of antioxidant activity in encapsulated  $\alpha$ -tocopherol, the best antioxidant response was obtained by the FRAP assay. In the characterization of chitosan capsules / Vitamin E, smaller particle sizes compared with the capsules formed with chitosan / TPP as SPP or polyanion obtained.

### Palabras clave:

Antioxidantes, encapsulación,  $\alpha$ -tocoferol

### Keyword:

Antioxidants, encapsulation,  $\alpha$ -tocopherol.

Área: **Microbiología y biotecnología**

### INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo puede ser considerado como un desequilibrio entre la producción de radicales pro-oxidantes/libres (ROS) y los opuestos antioxidantes. El daño causado por las ROS puede ser debido a su ataque ocasionado en las membranas lipídicas, proteínas/enzimas intracelulares, carbohidratos y el DNA nuclear en las células y tejidos. El cuerpo humano utiliza un sistema de defensa antioxidante para neutralizar los niveles excesivos de especies reactivas de oxígeno, los cuales pueden ser enzimáticos o no. Estos se clasifican en endógenos (se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus células; por ejemplo, Glutathion, coenzima Q, ácido tióctico, superóxidodismutasa (SOD), glutathionperoxidasa (GPX)) y exógenos

(ingresan a través de la dieta como Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol),  $\beta$ -caroteno, flavonoides, licopeno) (Shalaby and Shanab, 2013).

La vitamina E se clasifica como antioxidante interruptor, ya que actúa evitando la reacción en cadena de formación de radicales libres, atrapándolos y reduciéndolos, a diferencia de los antioxidantes preventivos (entre los que se encuentran las enzimas peroxidasas), que evitan la iniciación de la secuencia de reacciones (Traber and Atkinson, 2007). La vitamina E es un componente esencial en la dieta de todos los mamíferos, en estado natural existen 8 isoformas. Todas ellas se encuentran presentes de manera abundante en el germen de trigo y los aceites de girasol, cártamo, maíz y soya; además de encontrarse en almendras, avellanas, cacahuates, espinacas, brócoli, kiwi y mango. Sin embargo, el cocimiento casero, la congelación prolongada y el procesamiento comercial de alimentos destruyen rápidamente estas isoformas (Traber and Atkinson, 2007).

De manera general, los métodos para determinar la capacidad antioxidante total de un compuesto se han dividido en dos grupos principales: 1) ensayos basados en la transferencia de un solo electrón de reacción que muestran a través de un cambio en el color como el oxidante se reduce, y 2) ensayos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno que miden la actividad del antioxidante para eliminar los radicales peroxilo. El poder reductor del antioxidante férrico (FRAP) y el ensayo 2,2-difenil-1 picrilhidrazil (DPPH) incluyen la reacción de transferencia de electrones (Müller *et al.*, 2011).

La encapsulación de compuestos bioactivos representa un enfoque viable y eficiente para aumentar la estabilidad física de las sustancias activas, protegerlos de las interacciones con los ingredientes de alimentos y mejorar su bioactividad, debido al tamaño subcelular. Muchos de estos compuestos bioactivos además de presentar actividad antioxidante (por ejemplo, carotenoides, ácidos grasos omega-3, ácidos grasos, fitoesteroles), son altamente lipofílicos, tienen una pobre absorción y limitada biodisponibilidad (Alishahi *et al.*, 2011).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Obtención de cápsulas de quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol. Gelación ionotrópica (Velasco, 2011).**

Las nanopartículas se prepararon con base en el método de gelación ionotrópica entre el pirofosfato de sodio (SPP) o tripolifosfato de sodio (TPP) y el quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol. El quitosano se disolvió en ácido acético al 1% (v/v) para obtener una solución de quitosano al 0.3% (p/v). La solución de  $\alpha$ -Tocoferol en metanol/hexano (667 mg) fue adicionada a la suspensión de quitosano al 0.3% en proporción 1:1. El TPP o SPP se disolvió en agua a una concentración del 1%. Se adicionó 1 ml de TPP o SPP en 25 ml de solución de quitosano/ $\alpha$ -tocoferol con agitación magnética a temperatura ambiente. La mezcla se agitó por 20 min, después se sometió a sonicación a 1.5 kW por 30 minutos. La suspensión fue inmediatamente centrifugada a 12,000 xg durante 10 minutos. El precipitado se suspendió en agua, y se centrifugó otra vez. Las partículas fueron resuspendidas en agua para su posterior caracterización. La caracterización se realizó determinando tamaño y distribución de partícula mediante el equipo Malvern Zeta Nanosizer, seguido de pruebas de actividad antioxidante.

### **Pruebas de actividad antioxidante a los encapsulados de quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol.**

**Ensayo de actividad del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Müller *et al.*, 2011).**

Se realizó la determinación de actividad antioxidante en el encapsulado de quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol. La reacción se inició por adición de una solución de DPPH (0.1 mM) en metanol con 2.0 ml de la solución encapsulada. La reacción se mantuvo a 25 °C durante 30 min a oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm. Se utilizó como patrón de referencia una curva patrón Trolox. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. La evaluación de la actividad antioxidante, se expresa como porcentaje de acuerdo a la siguiente fórmula. Actividad captadora=  $[1 - \text{abs (muestra)}/\text{abs (control)}] \times 100$

**Ensayo del poder reductor antioxidante férrico (FRAP) (Benzie and Strain; 1996).**

Para esta técnica, se mezclaron 900  $\mu$ L del reactivo FRAP, 90  $\mu$ L de agua destilada, 30  $\mu$ L del testigo o muestra en metanol/hexano. La solución encapsulada utilizada fue la misma que para DPPH. Se mantuvo la temperatura a 37°C y fue monitoreada la reacción a los 30 minutos. Se leyó la absorbancia a 595 nm. Se utilizó como curva patrón Trolox. Cada determinación se realizó por triplicado.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Obtención de encapsulados de quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol.**

Los encapsulados se formaron inmediatamente cuando se mezclaron los diferentes polianiones (SPP/TPP) a la solución de quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol. Alishahi *et al.*, (2011), sugieren que las partículas son formadas debido a los enlaces moleculares entre los grupos fosfato del TPP y los grupos amino del quitosano, ya que la habilidad del quitosano de gelificar rápidamente al contacto con polianiones depende del entrecruzamiento inter e intramolecular mediado por estos polianiones. Durante la preparación de las partículas el TPP es atraído por los grupos amino en el quitosano para crear quitosano entrecruzado iónicamente. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere que se presenta el mismo comportamiento al usar SPP como polianión, ya que también se obtuvieron encapsulados.

**Caracterización de encapsulados de Quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol utilizando como polianión SPP y TPP.**

Se estudió el efecto del tipo de polianión en el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad. En la Tabla I se muestran los resultados del tamaño de partícula y el índice de polidispersidad para las cápsulas obtenidas sin  $\alpha$ -Tocoferol y adicionando el  $\alpha$ -Tocoferol. Se puede observar que los encapsulados formados con quitosano/TPP presentaron mayor tamaño de partícula comparada con las cápsulas formadas con quitosano/SPP como polianión (22950 nm vs 1279 nm) respectivamente. Sin embargo, en el presente trabajo se obtuvieron valores de tamaño de partícula superiores a lo que se reporta en literatura.

Tabla I. Tamaño y distribución de Partícula de Quitosano/  $\alpha$ -Tocoferol /SPP o TPP.

SISTEMA	TAMAÑO PROMEDIO DE PARTÍCULA (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD (PDI)
Quitosano/SPP	1279	0.415

Quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol/SPP	808.85	0.621
Quitosano/TPP	22950	0.875
Quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol/TPP	537.10	0.775

Por otra parte, al adicionar la vitamina E a las cápsulas, se muestra que el tamaño de partícula disminuye claramente en ambos casos utilizando SPP o TPP como polianión. Siendo notoria la disminución en las cápsulas de quitosano/TPP (537.10 nm). En el estudio realizado por Naghibzadeh *et al.*, (2010) obtuvieron encapsulados de quitosano cargadas con  $\alpha$ -Tocoferol y TPP, con un tamaño que oscila entre 277-378 nm. Asimismo, un bajo índice de polidispersidad indica una estrecha distribución de tamaño y generalmente los sistemas con un PDI  $< \sim 0.2$  son considerados monodispersos. En este caso, las cápsulas mostraron un índice de polidispersidad  $> 0.2$ , que indica la formación de mezclas polidispersas de partículas. Sin embargo, los valores de índice de polidispersidad en este estudio fueron mayores al reportado por los trabajos anteriormente citados para encapsulados de quitosano obtenidas por el mismo método.

#### **Pruebas de actividad antioxidante a los encapsulados de quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol.**

Actividad antioxidante de  $\alpha$ -Tocoferol por medio de la técnica del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

Se obtuvo la actividad antioxidante del encapsulado de quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol, el cual se reporta como IC<sub>50</sub> (concentración mínima necesaria para inhibir el 50%), la cual fue de  $244.06 \pm 0.049$   $\mu$ M. En estudios realizados de actividad antioxidante mediante esta técnica en los que se ha utilizado como disolvente metanol/hexano, se encontró lo siguiente: Mishra *et al.*, (2012) reportó un valor de IC<sub>50</sub> de 12.7  $\mu$ M, mientras que Mohamada *et al.*, (2004) reportó un valor de 223  $\mu$ M (IC<sub>50</sub>). Como se puede observar, en el presente trabajo el encapsulado quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol presentó un valor superior de actividad antioxidante comparado con otros estudios. Se ha reportado en literatura que la actividad antioxidante del  $\alpha$ -Tocoferol, se debe a que contiene cuatro grupos hidroxilo que reacciona con DPPH de 5-30 min en valores obtenidos de IC<sub>50</sub> (Mishra *et al.*, 2012). Así mismo, Sánchez-Moreno *et al.*, (1998) realizaron un trabajo usando el mismo método antes mencionado para estimar el poder antirradical, encontrando el siguiente orden de eficiencia antioxidante (de menor a mayor): ácido gálico > ácido tánico > ácido ascórbico > quercetina > BHA > rutina > ácido ferúlico > DL-R-tocoferol > resveratrol.

#### **Actividad antioxidante de encapsulados de quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol por medio de la técnica de poder antioxidante reductor del hierro (FRAP).**

Se obtuvo el resultado para el encapsulado por medio de la técnica de FRAP expresado como  $\mu$ M Eq. Trolox/L, el cual fue de  $794 \pm 0.107$   $\mu$ M Eq. Trolox/L. La eficacia antioxidante determinada por el ensayo FRAP depende de los potenciales redox de los compuestos bioactivos, caracterizados por la complejidad de sus moléculas. A partir del resultado encontrado, es evidente que la capacidad reductora de algunos compuestos, tal como se determina por el ensayo FRAP, parece depender del grado de hidroxilación y grado de conjugación de los compuestos (Benzie and Strain, 1996). La configuración y el número total de grupos hidroxilo presentes en la estructura de un compuesto influyen sobre los mecanismos de su actividad antioxidante (Naso, 2012).

## CONCLUSIONES

En las determinaciones de capacidad antioxidante a los encapsulados de quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol por medio de las técnicas de DPPH y FRAP se observó un gran potencial de actividad antioxidante de este compuesto bioactivo. Respecto a los resultados del tamaño de partícula y el índice de polidispersidad para los encapsulados de quitosano/ $\alpha$ -Tocoferol utilizando SPP y TPP, se obtuvo el menor tamaño utilizando TPP como polianión, confirmando así que la actividad antioxidante del compuesto influye de manera importante en el tamaño de partícula.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alishahi, A., Mirvaghefai, A., Tehranib, M.R., Farahmunda, H., Koshioc, S., Dorkooshb, F.A., Elsabeed, M. 2011. Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. *Food Chemistry*. 126: 935–940.
- Benzie I.F., Strain J.J. 1996. The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”. *The FRAP assay. Analytical Biochemistry*. 239:70-76.
- Mishra K., Ojha H., Chaudhury N.K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*. 130: 1036–1043.
- Mohamada H., Abasa F., Permana D., Lajisa N., Manaf A., Aspollah M., Hinc T., Kikuzakid H., Nakatanid N. 2004. DPPH Free Radical Scavenger Components from the Fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak. (Zingiberaceae). *Z. Naturforsch.* 59c: 811-815.
- Müller L., Fröhlich K., Böhm V. 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*. 129:139–148.
- Naghizadeh, M., Amani, A., Amini, M., Esmaeilzadeh, E., Mottaghi-Dastjerdi, N., Ali Faramarzi, M. 2010. An Insight into the Interactions between  $\alpha$ -Tocopherol and Chitosan in Ultrasound-Prepared Nanoparticles. 1:7.
- Naso, L. 2012. Obtención y estudio de complejos de metales de transición con moléculas bioactivas. Evaluación de sus propiedades enzimáticas y biológicas *in vitro*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias exactas.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76: 270-276.
- Shalaby E.A., Shanab S.M. 2013. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 7(10):528-539.
- Traber M.G., Atkinson J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine*. 43:4–15.
- Velasco, R.V. 2011. Protección del ácido  $\alpha$ -lipoico por la formación de nanocápsulas de quitosano. Tesis doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.