



**MÁSTER EN CALIDAD, DESARROLLO E INNOVACIÓN DE ALIMENTOS**  
**UNIVERSIDAD DE PALENCIA**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

TÍTULO:      ENCAPSULACIÓN DE RESVERATROL EN  $\beta$ -GLUCANOS.      APLICACIONES  
A PRODUCTOS NUTRACÉUTICOS

AUTOR:      VIRGINIA GALÁN GUTIÉRREZ

FECHA:      JULIO 2013

## INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1. ANTECEDENTES .....	2
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
3.1. MATERIALES.....	7
3.2. MÉTODOS .....	7
3.2.1. Precipitación por antisolvente supercrítico (Supercritical Antisolvent, SAS).....	7
3.2.2. Determinación de la solubilidad de los $\beta$ - glucanos .....	8
3.2.3. Determinación del peso molecular de los $\beta$ -glucanos .....	9
3.2.4. Caracterización del producto.....	9
3.2.6. Actividad antioxidante (ORAC) .....	10
3.2.7. Perfiles de liberación controlada de resveratrol .....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4.1. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LOS $\beta$ -GLUCANOS .....	11
4.2. PRECIPITACIÓN POR SUPERCritical ANTISOLVENT (SAS) .....	11
4.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PERFILES DE LIBERACIÓN CONTROLADA EN FLUIDOS SIMULADOS.....	15
5. CONCLUSIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	18

## **RESUMEN**

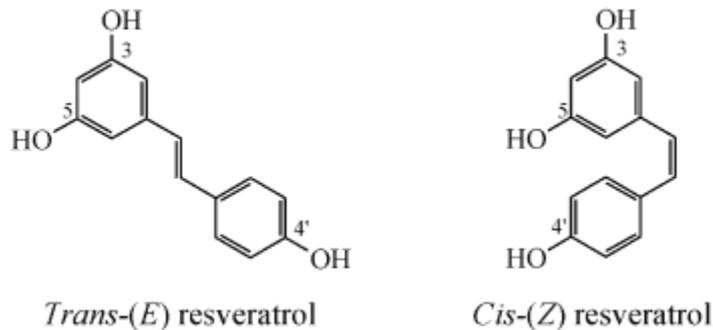
El resveratrol es un compuesto natural presente en diversas plantas y alimentos. Se le atribuyen múltiples efectos protectores frente a algunas enfermedades, debido a sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, su biodisponibilidad es baja, por ello se buscan técnicas que mejoren su absorción. Este trabajo pretende encapsular resveratrol en  $\beta$ -glucanos de cebada, para estudiar su capacidad para disminuir la degradación de éste. El proceso de encapsulación se ha realizado con el sistema de antidisolvente supercrítico (SAS), basado en el uso de fluidos supercríticos y DMSO como disolvente. El rango de presión fue 10-11 MPa; y el de temperatura de 35-50°C. Otros parámetros como el flujo de CO<sub>2</sub>, el de la disolución o la concentración de los  $\beta$ -glucanos y el resveratrol se variaron en los distintos ensayos. Además se realizaron pruebas de liberación controlada en fluidos simulados (gástrico e intestinal) y se determinó su capacidad antioxidante.

## **ABSTRACT**

Resveratrol is a natural compound present in many plants and foods. Multiple protective effects against diseases are attributed to resveratrol due to its antioxidant properties. However, its bioavailability is low, therefore different techniques and encapsulation matrices are being investigated to improve its absorption. This paper aims to encapsulate resveratrol in barley  $\beta$ -glucans for this purpose. The encapsulation process was carried out by supercritical carbon dioxide as antisolvent and DMSO as a solvent for the  $\beta$ -glucans. The pressure range was 10-11 MPa; and the temperature of 35-50 °C. Other parameters such as the flow rate of SC-CO<sub>2</sub>, and solution or the concentration of  $\beta$ -glucan and resveratrol were studied. Furthermore, dissolution tests were conducted in simulated gastric and intestinal fluids and their antioxidant activity was determined.

## 1. ANTECEDENTES

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un compuesto que pertenece a la familia del estilbeno. Podemos distinguir dos isómeros del resveratrol (Figura 1), uno cis- y uno trans-. Parece que ambos realizan las mismas funciones, pero tradicionalmente la forma más estudiada ha sido la trans-, ya que es la forma más estable. (Amri et al., 2012) (Filip et al., 2003) (Chung- Fu et al., 2013)



**Fig-1.** Estructura química del trans- y cis-resveratrol.

Se encuentra de forma común en muchas plantas, pero las fuentes alimentarias son reducidas. Lo encontramos en cacahuetes y derivados, pistachos, fresas y chocolate negro. Pero su principal fuente de extracción es la uva y el vino tinto, ya que éste es macerado junto a la semilla y las pepitas que es donde podemos encontrarlo. (Fernández-Mar et al., 2012)

Entre sus múltiples acciones hay que destacar su actividad antioxidante, principalmente la eliminación de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Se considera que estas especies son causantes de la peroxidación de los lípidos y el daño oxidativo en el ADN y el resto de proteínas corporales. (Jing et al., 2012) (Lucas-Abellán et al., 2011)

Así mismo se han realizado una gran cantidad de estudios que demuestran los efectos protectores que tiene el resveratrol sobre otros procesos biológicos, principalmente sobre enfermedades cardiovasculares y/o procesos cancerígenos. La mayor parte de estos estudios se han desarrollado in-vitro, sin embargo en los ensayos in-vivo realizados con animales ha sido más difícil demostrar esta relación protectora. La razón por la que hay discrepancia entre estos resultados puede ser debido a su baja biodisponibilidad. (Walle, 2011)

Diversos estudios en humanos y animales han demostrado que la biodisponibilidad del resveratrol no conjugado es baja; siendo la absorción oral en humanos de aproximadamente el 75%. Así mismo se ha descrito que la forma de absorción de este compuesto tiene lugar principalmente mediante difusión transepitelial. A pesar de esto el proceso de metabolismo que tiene lugar en el intestino y el hígado hace que su biodisponibilidad real sea menor del 1%. La administración repetida y el aumento de las dosis no han variado de manera significativa estos resultados. (Walle, 2011)

Los metabolitos de resveratrol alcanzan su máxima concentración en plasma a los 30 minutos después de la ingesta, aproximadamente, y su vida media suele ser de unas 9 horas. (Fernández-Mar et al., 2012)

Las propiedades de los extractos naturales activos, como es el caso del resveratrol, se pueden mejorar mediante la formulación adecuada del material portador. Los principales objetivos a la hora de realizar este tipo de formulación pueden ser: la protección del compuesto activo, mejorar su dosificación y su biodisponibilidad y garantizar la funcionalidad del producto. Cuando el compuesto activo se administra por vial oral se deberá elegir un material que lo proteja frente a la degradación que sufrirá en el tracto gastrointestinal y además favorezca su absorción. Entre las sustancias que se utilizan frecuentemente como materiales de transporte de compuestos activos hay que destacar el almidón, la lecitina, las gomas, el polietilenglicol o las proteínas. En este caso las sustancias utilizadas serán los  $\beta$ -glucanos. (Martín, 2013)

Los  $\beta$ -glucanos son polisacáridos sin almidón compuestos por unidades de glucosa unidas por enlaces (1  $\rightarrow$  3) (1  $\rightarrow$  4). Principalmente se encuentran en las paredes del endospermo de diferentes granos de cereal, en su mayoría en los de avena y cebada, en concentraciones del 3-7% del peso. (Benito- Román et al., 2011).

También podemos encontrarlos en las paredes de levaduras como la *Sacharomyces cerevisiae* [(1 $\rightarrow$  3) (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ - D -glucano]. (Vetvicka and Vancikova, 2010)

Estos compuestos pertenecen a un grupo fisiológicamente activo que se denomina modificadores de la respuesta biológica. Han sido ampliamente estudiados por sus propiedades saludables. Los  $\beta$ -glucanos con enlaces (1  $\rightarrow$  3) (1  $\rightarrow$  4) presentan propiedades como la reducción del colesterol en sangre o los niveles de glucosa postprandial; mientras que los que presentan enlaces (1  $\rightarrow$  3) (1  $\rightarrow$  6) son conocidos por su actividad modificadora de la respuesta inmune. La FDA aprobó una declaración sobre las propiedades saludables de la fibra de avena y cebada para la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares. (Comin et al., 2012)

Existen alegaciones acerca de la capacidad que tienen los  $\beta$ -glucanos con enlaces (1  $\rightarrow$  3) (1  $\rightarrow$  4) procedentes de avena para actuar como vehículo de transporte de determinadas sustancias químicas hacia el interior de la piel a través de los diferentes estratos hasta las capas más profundas. (Röding, 2006)

La encapsulación del resveratrol en  $\beta$ -glucanos con enlaces (1  $\rightarrow$  3) (1  $\rightarrow$  6) podría hacer que este compuesto se libere progresivamente, mejorando así su absorción y eficacia, ya que aumenta la respuesta endógena de los individuos. Hay estudios que demuestran que la administración conjunta de algunas moléculas bioactivas con  $\beta$ -glucanos proporciona efectos sinérgicos, en este caso la molécula activa es el resveratrol. (Vetvicka and Vancikova, 2010)

En la literatura reciente encontramos diversos estudios sobre la encapsulación de resveratrol con la finalidad de mejorar su solubilidad y su biodisponibilidad.

Amri et al., (2012) realizaron una revisión sobre las mejores sustancias encapsulantes y métodos para lograr aumentar la biodisponibilidad del resveratrol. Estudiaron diversas formulaciones para conseguir la liberación controlada de resveratrol, entre las que podemos destacar el uso de nanoesponjas de  $\beta$ -ciclodextrinas, nanocápsulas lipídicas, nanopartículas sólidas de naturaleza lipídica o el uso de liposomas en distintas formas.

Guorong et al. (2008) realizaron investigaciones sobre la encapsulación de resveratrol en células cultivadas de *S. cerevisiae*. El rendimiento de encapsulación de resveratrol que obtuvieron fue del 6%. Demostraron que tras el proceso de encapsulación el compuesto no sufría ninguna modificación química. Así mismo los resultados que obtuvieron demostraban que la solubilidad en agua del resveratrol era de entre dos y tres veces más alta y que se mejoraba su biodisponibilidad.

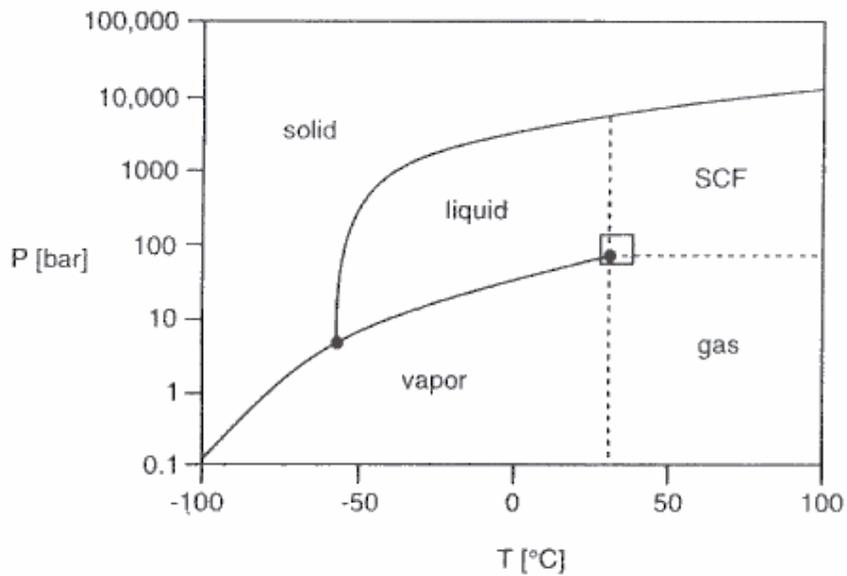
Otros compuestos que se han utilizado frecuentemente para la encapsulación de resveratrol han sido las ciclodextrinas, que son un grupo de oligosacáridos cíclicos derivados del almidón y cuya estructura tiene forma de cilindro. Las investigaciones realizadas demuestran que gracias a su encapsulación se consigue aumentar la concentración total de resveratrol en agua y retrasar su oxidación. (Lucas- Abellán et al., 2006)

Isailović et al. (2013) realizaron investigaciones sobre diferentes métodos de encapsulación de resveratrol en liposomas. El método utilizado consistía en preparar dos tipos de liposomas: unos que contenían resveratrol y otros utilizados como control que estaban vacíos. Para la realización de los análisis se usaron dos métodos: el método de la película lipídica delgada (TF) y el método del Ubiquinol (PRO). Para reducir el tamaño de los liposomas utilizaron una técnica de extrusión y otra de sonicación. En la mayor parte de los casos consiguieron una eficacia de encapsulación superior al 90%, excepto en el caso de los liposomas sometidos a sonicación, cuya eficacia variaba entre el 40 y el 50%. Los resultados que obtuvieron mostraban que los liposomas eran unos buenos portadores de resveratrol, ya que conseguían obtener partículas muy estables y con una liberación del compuesto más prolongada.

Zhou et al, 2010 realizaron ensayos de encapsulación de resveratrol en  $\beta$ -ciclodextrinas utilizando la técnica de SAS. Los resultados que obtuvieron mostraban que con esta técnica se conseguía aumentar la solubilidad del resveratrol de las 30 ppm (0,03 mg/mL) (Jiang, 2008) hasta 25,13 mg/mL en una solución salina normal.

En este caso la metodología utilizada para realizar el proceso de encapsulación ha sido el uso de fluidos supercríticos.

Un fluido supercrítico es una sustancia cuyas condiciones de presión y temperatura son superiores a su punto crítico. Tienen unas características entre las de los gases y los líquidos, ya que son capaces de disolver sustancias como los líquidos y de difundir como los gases. Los compuestos más usados en condiciones supercríticas son el CO<sub>2</sub>, el agua o el etano. En la Figura 2 podemos ver el diagrama de fases que determina las condiciones supercríticas del CO<sub>2</sub> en las que se llevaron a cabo todos los ensayos.



**Fig.2.** Diagrama de fases.

En las últimas décadas se ha observado un aumento significativo en el interés por el estudio de estas técnicas. Las principales áreas de estudio son:

- Como alternativa a los procesos clásicos de separación, como la extracción, la cromatografía o la cristalización.
- En técnicas de polimerización o despolimerización.
- En la producción de partículas, fibras o espumas.

Estas investigaciones han dado lugar a la aparición de una gran variedad de técnicas, que se diferencian principalmente en el papel que desempeña el fluido supercrítico o el disolvente orgánico, pudiendo actuar como disolvente, co-disolvente o anti-disolvente. (Sang-Do and Erdogan, 2005) (Jung and Perrut, 2000)

Las técnicas más importantes de formación de partículas mediante el uso de fluidos supercríticos se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1**

Principales técnicas de formación de partículas con fluidos supercríticos.

Proceso	Papel de fluido supercrítico	Papel de disolvente orgánico
GAS	Anti-disolvente	Disolvente
PGSS	Soluto	
RESS	Disolvente	Co-disolvente
SAS	Anti-disolvente	Disolvente
SEDS	Anti-disolvente/ Dispersante	Disolvente/ No disolvente

El sistema de antidisolvente supercrítico (SAS) es una técnica de precipitación que se ha usado frecuentemente para la producción de micro- o nanopartículas, ya que ofrece un mejor control del tamaño de partícula que los métodos convencionales. Esta técnica produce la precipitación de la parte sólida de un soluto orgánico, en general mediante la interacción que se produce entre ésta y un fluido supercrítico que se suministra de forma continua a una cámara de precipitación de alta presión, gracias a esto se produce una mayor relación de sobresaturación de la solución, provocando la nucleación y el crecimiento rápido de las partículas, que adquieren un tamaño más pequeño. De esta forma permite controlar el tamaño de partícula y su morfología mediante las variaciones que se introducen en los parámetros asociados, como la temperatura, la presión de operación y la concentración de la disolución. También permite eliminar el residuo generado por el disolvente de forma fácil y no requiere un procesado posterior de la muestra. Entre los materiales que se han procesado mediante esta técnica podemos destacar productos farmacéuticos, precursores de catalizadores, pigmentos y polímeros. El tamaño medio de las partículas que se pueden obtener mediante esta técnica puede ser de entre 50 nm a varios micrómetros. (Cocero et al., 2008)

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo de este estudio era comprobar la viabilidad de la encapsulación de resveratrol utilizando como soporte  $\beta$ -glucanos de cebada, mediante el uso de fluidos supercríticos. Con esta técnica se pretendía obtener un producto sólido que facilitara su dosificación y que permitiera evaluar de forma posterior la eficiencia de su encapsulación.

Una vez que el resveratrol fuera encapsulado en el interior de los  $\beta$ -glucanos se estudiaría el efecto controlado de su liberación en medio simulado gástrico e intestinal, y se analizaría su actividad antioxidante in-vitro.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

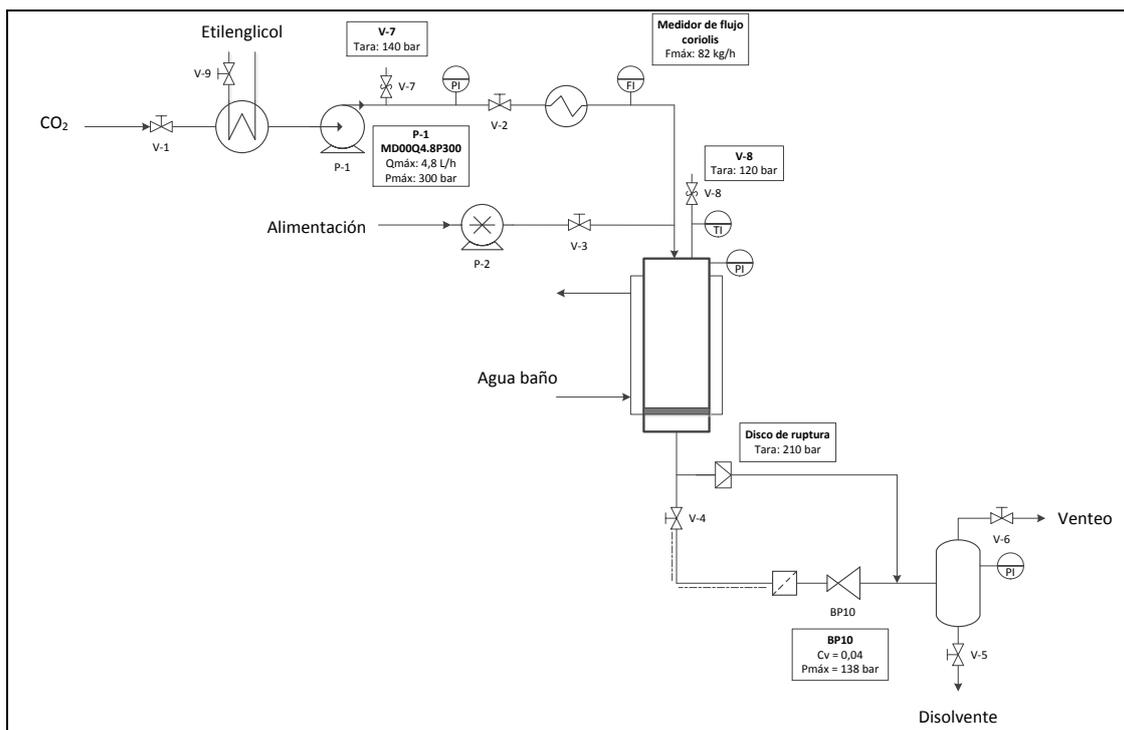
#### **3.1. MATERIALES**

Para la realización de todas las pruebas se han usado  $\beta$ -glucanos de cebada con una pureza del 78% (GLUCAGEL TM, Alkem Laboratories LTD, India) y un peso molecular de 125 kDa (determinado en el laboratorio mediante cromatografía de exclusión de tamaños según el método descrito en el apartado 3.2.3), resveratrol con una pureza del 98% (Pure Bulk, EE.UU) y DMSO (Sigma-Aldrich, España). El CO<sub>2</sub>, con una pureza del 99,5%, fue suministrado por S.E. Carburos metálicos S.A. (España). Para la preparación de los fluidos simulados gástrico e intestinal y para la prueba de la actividad antioxidante (ORAC) se utilizaron reactivos suministrados por Panreac.

#### **3.2. MÉTODOS**

##### **3.2.1. Precipitación por antisolvente supercrítico (Supercritical Antisolvent, SAS)**

El aparato de laboratorio SAS que se ha usado en este trabajo consta de una bomba de HPLC (Gilson, modelo 850) que se utiliza para suministrar la solución líquida, y una bomba de alta presión (Milton Royal) utilizada para bombear el CO<sub>2</sub>. La cámara de precipitación está compuesta por un recipiente cilíndrico con un volumen interno de 1,5 L. La mezcla líquida se pulveriza en el precipitador a través de una boquilla de acero inoxidable con un diámetro de 0,180 mm. La presión de operación está regulada por una válvula manorreductora (GO, BP-66) situada a la salida del precipitador y en la que se produce la expansión de la mezcla de CO<sub>2</sub> y el disolvente hasta presión atmosférica. La separación del líquido y el CO<sub>2</sub> gas se realiza en un recipiente de 2 L. Como medidas de seguridad en caso de sobrepresión la instalación dispone de una válvula de seguridad tarada a 12 MPa y un disco de ruptura tarado a 20 MPa, ambos conectados al recipiente de expansión a baja presión. En la Figura 3 se muestra una representación gráfica de la planta de laboratorio SAS.



**Fig. 3.** Representación gráfica de la planta de laboratorio SAS.

El experimento de SAS comienza con el paso de CO<sub>2</sub> supercrítico a la cámara de precipitación hasta que se alcanza la presión deseada. Posteriormente se fija un flujo constante. Cuando los parámetros de presión, temperatura y flujo de CO<sub>2</sub> ya son constantes en los valores deseados, se comienza a bombear la muestra. El experimento se da por concluido cuando todo el contenido de muestra ha sido bombeado. Antes de despresurizar la planta se debe pasar una pequeña cantidad de disolvente, seguido del paso de CO<sub>2</sub> a un flujo igual al usado en el ensayo durante al menos 30 minutos, que sirve para eliminar de la cámara el contenido de disolvente que haya podido quedar.

Si no se realizara la purga final con CO<sub>2</sub> el disolvente podría condensarse durante la despresurización y las muestras contenidas en la cámara podrían modificarse.

### 3.2.2. Determinación de la solubilidad de los $\beta$ - glucanos

Para la determinación de la solubilidad de los  $\beta$ -glucanos se usaron los siguientes disolventes: acetato de etilo, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol y tetrahidrofurano (THF).

Adicionalmente se determinó la solubilidad en agua como referencia, ya que es el mejor disolvente para estos compuestos. Sin embargo el agua no es adecuado para la precipitación por SAS, debido a su baja solubilidad en CO<sub>2</sub>-SC en el rango de condiciones de operación típicas de este proceso (35-50°C; 8-15 MPa)

Se tomaron 10 mL de cada uno de los disolventes y 500 mg de  $\beta$ -glucanos. Estas muestras se introdujeron en viales cerrados y se mantuvieron en agitación a 25°C durante 24 horas.

Una vez transcurrido este tiempo se tomaron 2 mL de cada uno de ellos y se filtraron en otro vial (Millipore, 0,45  $\mu\text{m}$ ). Las muestras se mantuvieron en una campana de extracción durante 48 horas. Las muestras que contenían DMSO se mantuvieron durante 4 días en una estufa a 200°C y presión atmosférica, y durante 24 horas en una estufa de vacío a una temperatura de 70 °C y una presión de -0,08 MPa, debido a su elevada temperatura de evaporación (189°C). Tras este proceso se determinó la masa del sólido seco.

Esta operación se realizó por triplicado para cada uno de los disolventes, salvo para el DMSO que se realizaron un total de 6 muestras.

### **3.2.3. Determinación del peso molecular de los $\beta$ -glucanos**

La determinación del peso molecular de los  $\beta$ -glucanos se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC). Se utilizó un sistema de cromatografía que consistía en una bomba isocrática (Waters 1515), un inyector automático (Waters 717), una columna de seguridad (Guard Column Ultrahydrogel Aguas), una columna de GPC (Waters Ultrahydrogel 1000) y un detector de índice de refracción diferencial (Waters 410). La columna se mantuvo a 35°C, y el caudal de la fase móvil (0.1MNaNO<sub>3</sub> 0.02% de NaN<sub>3</sub>) se fijó en 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Los estándares de peso molecular b-glucano se compraron a Megazyme International Ltd. (Irlanda).

### **3.2.4. Caracterización del producto**

La morfología externa del material precipitado se analizó usando un microscopio electrónico de barrido (SEM) (JEOL JSM-820) a alto vacío. Antes de realizar el análisis las muestras fueron recubiertas con oro en atmósfera de argón.

Los perfiles de análisis por calorimetría diferencial se obtuvieron utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC) (Mettler-Toledo 822e). La velocidad de calentamiento fue de 10°C min<sup>-1</sup> en el intervalo de temperatura de -40 a 280°C bajo flujo constante de Nitrógeno (60 mL/min). Para el análisis se tomaron muestras de aproximadamente 5 mg en cápsulas de aluminio cerradas, no herméticas. Las muestras se sometieron a un primer calentamiento y después de ser enfriadas a temperatura ambiente se procedió a realizar el segundo calentamiento. El proceso se realizó en dos etapas porque tras el segundo calentamiento no se observan las curvas de evaporación de la humedad y los disolventes y permite observar mejor los resultados de las muestras.

### **3.2.5. Concentración de resveratrol por UV**

Para determinar la concentración de resveratrol se utilizó un espectrofotómetro (Shimadzu UV-2550). La muestra se disolvió en agua pura a la concentración requerida, con un rango de entre 1,67 y 2,5 ppm de resveratrol. Se realizó un primer barrido para determinar la longitud de onda a la que se obtenía la máxima absorbancia y se determinó en 305 nm.

Mediante el análisis por triplicado de una de las muestras obtenidas en los ensayos se consiguió determinar el porcentaje de encapsulación del resveratrol en los  $\beta$ -glucanos.

### **3.2.6. Actividad antioxidante (ORAC)**

El ensayo ORAC se utilizó para evaluar la capacidad antioxidante frente a los radicales hidroxilo de las muestras. Este ensayo mide la capacidad de las especies antioxidantes presentes en las diferentes muestras para inhibir la oxidación de la fluoresceína (FL) catalizada por AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano)), generando radicales libre peroxilo (ROOH), se llevó a cabo utilizando el método modificado de Ou et al. (2002), que fue descrito previamente por Serra et al. (2011). La composición de la mezcla de reacción fue de 150  $\mu$ L x 100 nM (FL), (25  $\mu$ L x 240mM) AAPH (preparada en 10 mM de tampón fosfato (PBS), pH 7.4) y las muestras a la dilución en PBS a la concentración necesaria, que constituye un volumen total de 200  $\mu$ L. Esta mezcla se colocó en una microplaca de 96 pocillos a una temperatura de 37°C y la reacción se inició con la adición de AAPH. La fluorescencia emitida por la forma reducida de FL se midió con un lector de Fluostar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Germany) y se registró cada minuto a una longitud de onda de emisión de 520 nm y a una longitud de onda de excitación de 485 nm a los 30 minutos. El tampón fosfato se utilizó como blanco y distintas soluciones de Trolox (12.5-200  $\mu$ M) se utilizaron como estándares de control. Los valores finales del ensayo fueron calculados mediante una ecuación de regresión entre la concentración de Trolox y el área bajo la curva de FL. El resultado se expresó como equivalentes de Trolox con capacidad antioxidante por cada gramo de partículas ( $\mu$ mol TEAC/g). Para cada una de las partículas el análisis se realizó al menos en 6 réplicas.

### **3.2.7. Perfiles de liberación controlada de resveratrol**

Para la realización de los perfiles de liberación controlada del resveratrol se utilizaron dos fluidos que simulaban el fluido gástrico y el intestinal.

Para la preparación del fluido gástrico se usó cloruro sódico (2 g/L) y se ajustó el pH a 1,2 con ácido clorhídrico. Para preparar el fluido intestinal se usó fosfato sódico monobásico (6,8 g/L) y se empleó hidróxido sódico para conseguir un pH de 6,8. En ninguno de los dos casos se añadieron enzimas.

En estos ensayos se utilizaron tres tipos de muestras: resveratrol puro, una mezcla física de resveratrol y  $\beta$ -glucanos y una muestra de resveratrol encapsulado.

La temperatura a la que se mantuvieron las muestras durante la prueba fue de 37°C. El volumen utilizado para cada una de ellas fue de 0,1 L y la concentración de resveratrol de 25 mg/L. La toma de las muestras se realizó a los 5, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos, tomando cada vez 2 mL de muestra y reponiendo en cada uno de los casos el fluido inicial en la misma cantidad. Las muestras se filtraron con filtros de teflón con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LOS $\beta$ -GLUCANOS

Los resultados obtenidos en las pruebas de solubilidad de los  $\beta$ -glucanos se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2**

Datos solubilidad  $\beta$ -glucanos

<b>Disolvente</b>	<b>Media (mg/mL)</b>	<b>Desviación estándar</b>
Acetato	2,6	0,3
Acetona	0,28	0,06
Agua	24,5	0,3
DMSO	14,8	0,9
Etanol	ND	ND
THF	1,40	0,19

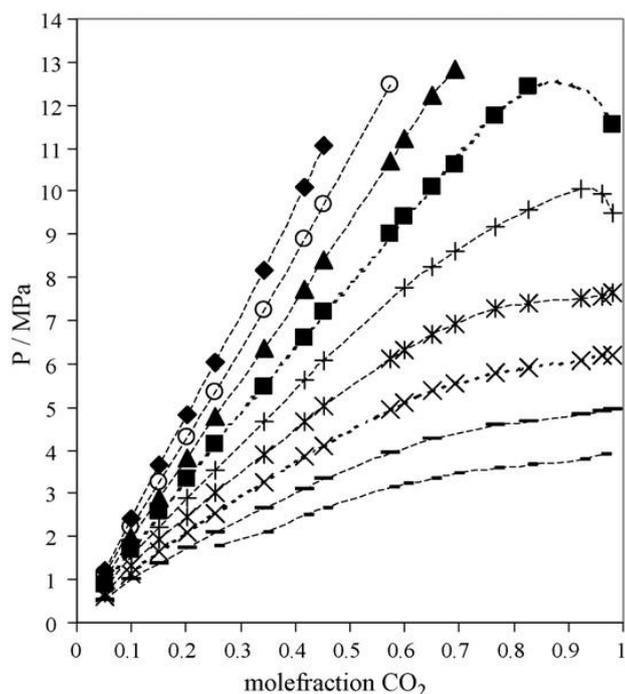
Como se puede observar el disolvente que presentaba mejores datos de solubilidad era el DMSO, por esta razón se determinó como el mejor disolvente para la realización de las pruebas de precipitación por SAS. A pesar de que el DMSO presenta una solubilidad un 37% menor que la del agua, ésta es muy superior a la del resto de los disolventes analizados.

### 4.2. PRECIPITACIÓN POR SUPERCRITICAL ANTISOLVENT (SAS)

La influencia de las principales variables que condicionan el proceso, la presión y la temperatura, está determinada por las propiedades supercríticas del  $\text{CO}_2$ .

La presión de trabajo se fijó en valores de entre 10 y 11 MPa, ya que éste es el límite máximo al que permite trabajar el equipo.

La elección de la temperatura de trabajo estaba determinada por el equilibrio de fase que se muestra en el diagrama de la Figura 4. La temperatura que nos permitía alcanzar las condiciones de una única fase para la mezcla de  $\text{CO}_2$ -SC y DMSO a la presión elegida y obtener unas partículas secas era de entre 34 y 35 °C.



**Fig.4.** Diagrama del equilibrio de fases. De menor a mayor la presión de las isoterma corresponden a 5, 15, 25, 35, 55, 65, 75 y 85 °C.

En las siguientes tablas se muestran los experimentos que se llevaron a cabo. Para su realización se modificaron las distintas variables de trabajo: concentración de  $\beta$ -glucanos, flujo de la disolución, flujo de  $\text{CO}_2$  y temperatura.

**Tabla 3**

Experiencias realizadas con  $\beta$ -glucanos y distintas variables de trabajo con la técnica SAS

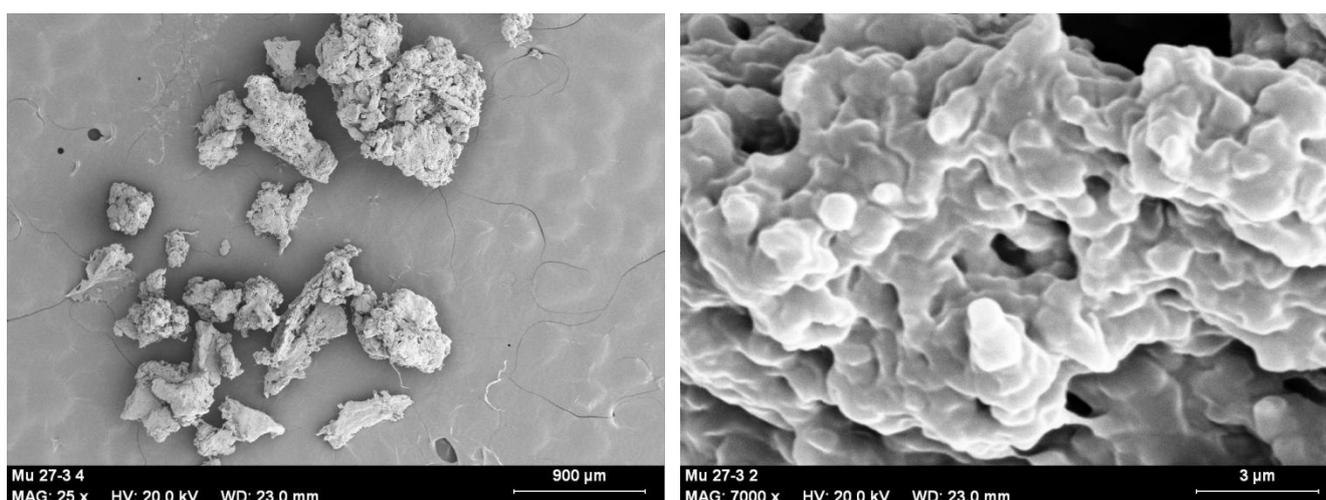
Ensayo	Concentración (mg/ml)	F. dis. (ml/min)	F. $\text{CO}_2$ (kg/h)	T. (C°)
A	2	2	2,5	34-35
B	5	2	2,5	37
C	5	2	2,5	38
D	5	2	2,5	50
E	5	2	2,5	34-35
F	5	2	5	34-35
G	5	4	2,5	34-35
H	10	2	2,5	34-35

Para realizar la co-precipitación de resveratrol con  $\beta$ -glucanos se seleccionaron las condiciones de trabajo utilizadas en los ensayos anteriores en las que el producto obtenido presentaba unas mejores características visuales, es decir, aquellas en las que las muestras tenían un aspecto de polvo seco. La concentración de resveratrol se escogió de manera que las partículas obtenidas tuvieran una proporción 1:1 de resveratrol:  $\beta$ -glucanos.

**Tabla 4**Experiencias realizadas con resveratrol y  $\beta$ -glucanos con la técnica SAS

Ensayo	Concentración $\beta$ -glucanos (mg/ml)	Concentración Resveratrol (mg/ml)	F. dis. (ml/min)	F. CO <sub>2</sub> (kg/h)	T. (C°)
I	5	5	2	2,5	34-35
J	5	5	2	5	34-35

En la Figura 5 se muestran las partículas que se obtuvieron en uno de los ensayos, observadas mediante SEM.

**Fig.5.** Imágenes obtenidas con el SEM pertenecientes a la muestra F.

Como podemos observar en las imágenes anteriores las partículas encapsuladas de resveratrol y  $\beta$ -glucanos no se han formado adecuadamente. En la primera de las imágenes observamos los agregados de partículas de entorno a 1mm. La segunda imagen corresponde a las partículas submicrónicas fusionadas que han dado lugar a los agregados, pese a ser las condiciones en las que se obtenían partículas con mejor aspecto visual y con un mayor flujo de CO<sub>2</sub> para favorecer la eliminación de disolvente.

Reverchon et al. (2000) realizaron ensayos con la misma técnica pero con dextranos y obtuvieron micropartículas de 0,1 mm de diámetro. Los dextranos son polisacáridos de glucosa unidos mediante enlaces  $\alpha$  1-6. Esta variabilidad en los resultados puede deberse a las diferencias de peso molecular y de viscosidad de las disoluciones en el disolvente orgánico de ambos compuestos, ya que en el caso de los  $\beta$ -glucanos estos dos parámetros son más altos.

El análisis de las partículas mediante DSC pretendía usarse para determinar si la estructura de los  $\beta$ -glucanos era amorfa o semi-cristalina, pero debido a la forma de los perfiles obtenidos esta característica no se pudo observar. Por el contrario esta prueba nos permitió determinar que en todas las muestras analizadas había una cantidad de DMSO que no se había eliminado y estaba incluida en la matriz de estas partículas. Esto se debe a que el  $\text{CO}_2$  no ha conseguido extraer todo el disolvente de las muestras. El valor medio del porcentaje de DMSO que ha quedado es de entre un 20 y un 30% en masa.

En la Figura 6 se muestra uno de los resultados del análisis de DSC. El pico 1 corresponde al dato de la humedad de la muestras, mientras que el pico 2 corresponde al DMSO, cuyo punto de ebullición es de  $189^\circ\text{C}$ . Todos los análisis realizados mostraban resultados similares.

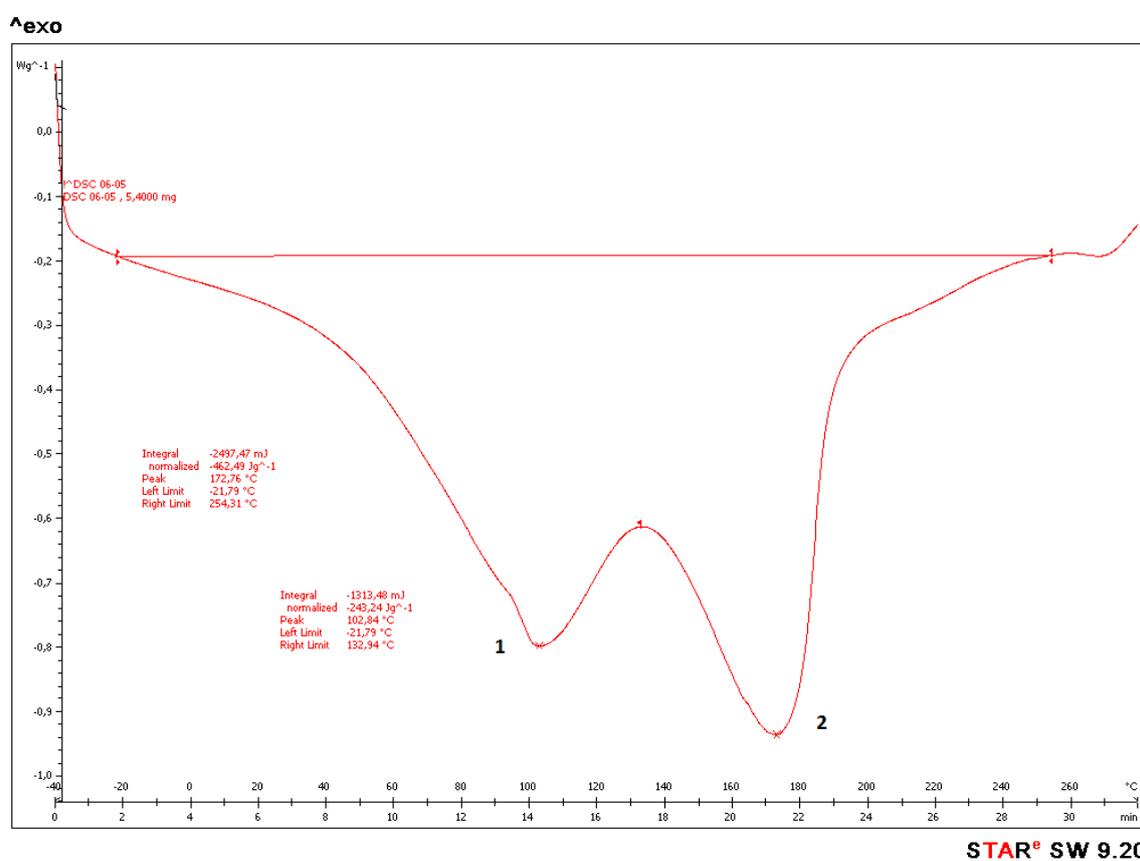


Fig.6. Resultados análisis DSC pertenecientes a la muestra E

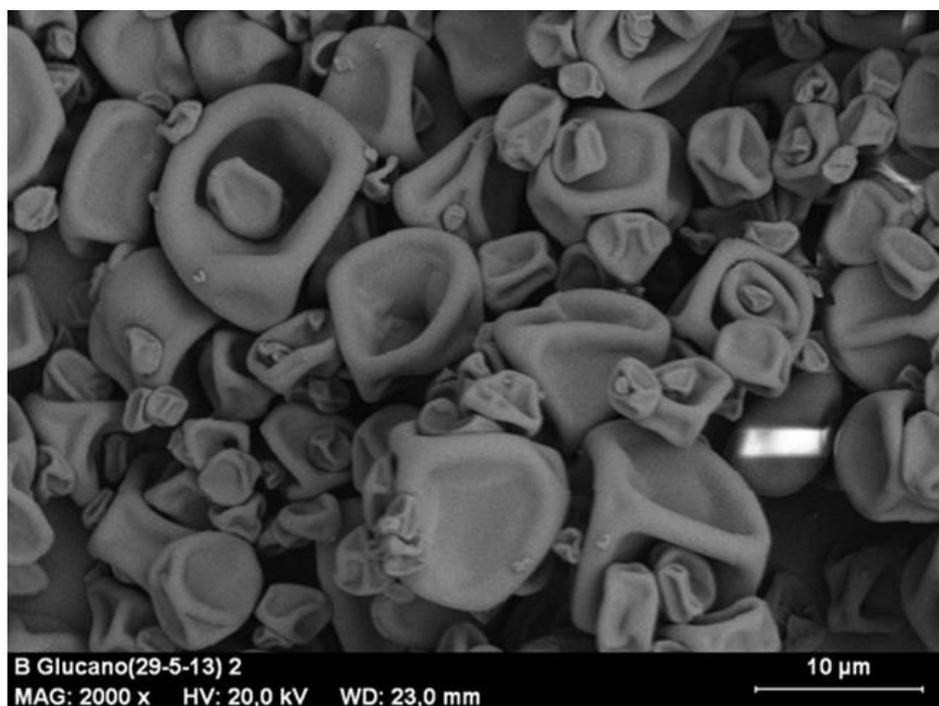
La pureza del resveratrol usado se determinó por espectrofotometría UV-VIS mediante el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de la Ley de Lambert Beer ( $A = \epsilon \cdot l \cdot C$ ). El coeficiente de extinción molar que se obtuvo fue de  $33190 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , dato que concuerda con el encontrado en la bibliografía (Jiang, 2008). Por esta razón se puede afirmar que el resveratrol usado era puro, con un valor próximo al 100%.

Se comprobó que a esa longitud de onda no había interferencias con los  $\beta$ -glucanos ni con el DMSO a la concentración utilizada.

La concentración de resveratrol determinada en las partículas obtenidas fue de 230 mg resveratrol/g partícula ( $\pm 20$  mg/g), que equivale a un valor medio de eficiencia de encapsulación de resveratrol de 45% ( $\pm 4\%$ ).

#### 4.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PERFILES DE LIBERACIÓN CONTROLADA EN FLUIDOS SIMULADOS

Puesto que el producto que se obtuvo mediante la técnica SAS no cumplía con los requisitos de concentración residual de disolvente orgánico (DMSO), las pruebas de actividad antioxidante (ORAC-FL) y los perfiles de disolución en fluidos biológicos simulados se realizaron con un producto obtenido mediante la técnica de secado en spray con aire caliente (130°C), partiendo de una suspensión acuosa de resveratrol y  $\beta$ -glucanos. Este producto tenía una concentración de resveratrol de 27 mg/g de partícula.



**Fig.7.** Imágenes de las partículas obtenidas mediante secado en spray

Los resultados obtenidos para la prueba de la actividad antioxidante se muestran en la Tabla 5.

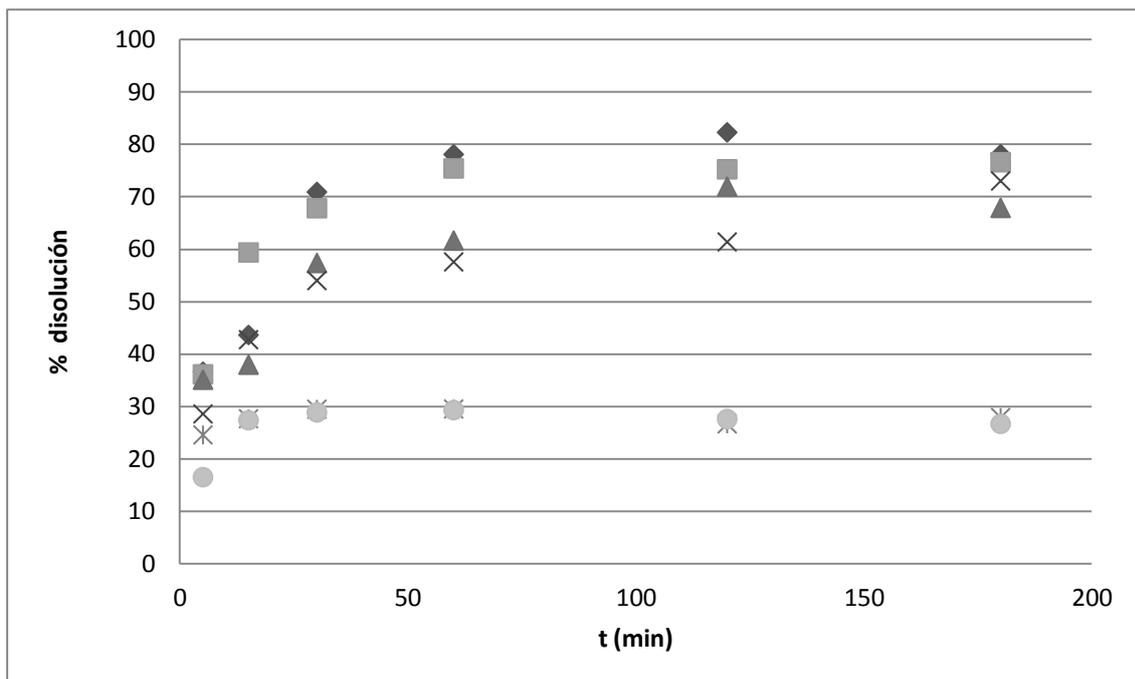
**Tabla 5**

Resultados de las pruebas de la actividad antioxidante

<b>Muestra</b>	<b>Resultado</b>
Resveratrol puro	17000 ( $\pm 1800$ ) $\mu\text{mol TEAC/g}$
$\beta$ -glucano puro	300 $\mu\text{mol TEAC/g}$
Formulado secado en spray	30000 ( $\pm 4000$ ) $\mu\text{mol TEAC/g}$
Mezcla física (resv. + $\beta$ -glucano)	22620 $\mu\text{mol TEAC/g}$

Los resultados obtenidos en la prueba de ORAC son positivos, ya que la encapsulación del resveratrol en los  $\beta$ -glucanos incrementa sustancialmente el valor de la actividad antioxidante. El resultado obtenido para los  $\beta$ -glucanos no era el esperado, ya que en la forma pura no presentan actividad. A pesar de esto es necesario repetir los análisis, ya que se han presentado dificultades a la hora de realizar la disolución de las muestras y los valores de la desviación estándar son elevados.

Los resultados obtenidos en las pruebas de liberación controlada en fluidos simulados se muestran en la Figura 8.



**Fig.8.** Resultados de las pruebas de liberación controlada en fluidos simulados. Resveratrol puro: (◆) Fluido gástrico, (■) Fluido intestinal. Mezcla física: (▲) Fluido gástrico, (X) Fluido intestinal. Formulado seco en spray: (×) Fluido gastrointestinal, (●) Fluido intestinal

La desviación entre los resultados de ambos test fue inferior al 10%; en algunos casos este valor es superior, por lo que se plantea desarrollar una mejora en el protocolo de análisis para realizar las pruebas mediante HPLC para la identificación del resveratrol de forma independiente.

Hay que destacar que los valores de disolución del  $\beta$ -glucano se mantuvieron prácticamente constantes durante todo el test, siendo de un 30% para el fluido gástrico y de un 50% para el intestinal. Este factor se tuvo en cuenta a la hora de calcular la concentración de resveratrol, ya que en esta cantidad si se observan interacciones entre ambas señales.

Para la muestra de resveratrol solo no se observan cambios significativos en la disolución entre el fluido gástrico y el intestinal, obteniendo unos valores de disolución de aproximadamente hasta un 80% de la cantidad inicial. Para la muestra física de  $\beta$ -glucanos y resveratrol observamos que la cantidad disuelta es similar que la de la muestra anterior, aunque hay que destacar que el proceso es más lento posiblemente por la dificultad a la hora de disolver los  $\beta$ -glucanos. En el caso de la muestra obtenida por secado en spray el valor de disolución es solo del 30%, lo que representa un resultado positivo, ya que el compuesto queda protegido especialmente en el fluido gástrico y teniendo en cuenta que la absorción del compuesto tiene lugar a nivel intestinal.

Para seguir investigando en este aspecto se podrían realizar test in-vitro de absorción de partículas por células epiteliales del intestino (Caco2) (Almeida et al., 2010)

## **5. CONCLUSIONES**

A la vista de los resultados obtenidos podemos afirmar que esta técnica no es adecuada para la encapsulación del resveratrol en  $\beta$ -glucanos, puesto que en todas las muestras que se han obtenido aparece una cantidad de DMSO que no se ha eliminado y esto hace que la aplicación del producto resultante inviable.

Estos resultados posiblemente puedan deberse a la elevada viscosidad que presentan las disoluciones de  $\beta$ -glucanos en DMSO.

Por esta razón es necesario desarrollar otras técnicas alternativas que permitan eliminar todo el disolvente de las muestras.

Ya que la morfología de las partículas obtenidas mediante la técnica de secado en spray es adecuada, así como el contenido en  $\beta$ -glucano y los resultados preliminares de los test de disolución y actividad antioxidante han resultado positivos, se podría estudiar de forma más sistemática este proceso, para conocer los límites de encapsulación, analizar el disolvente residual y la posible degradación de trans-resveratrol a cis- por efecto de las condiciones de trabajo.

Desde hace algunos años se están realizando investigaciones con fluidos supercríticos que permiten obtener proteínas con formulaciones de polvo seco, en las que se utilizan azúcares como estabilizadores. El mayor inconveniente que se presentaba fue que para esta técnica se necesitaban flujos muy altos de  $\text{CO}_2$ , debido a la baja solubilidad que presenta el agua en el  $\text{CO}_2$ . Como solución a este problema se usó etanol, que actúa como modificador de manera que se disminuye la cantidad de  $\text{CO}_2$  necesaria para el proceso. (Bouchard et al., 2008)

## BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, A. P. C., Matías, A. A., Nunes, A. V. M., Nogueira, I. D., Bronze M. R., Duarte, C. M. M. (2010). Drug Delivery Systems Prepared by SCF Technology for Enhanced Bioavailability and Cellular Uptake of Model Antioxidant Compounds. 12th European Meeting on Supercritical Fluids, 9th - 12th May 2010, Graz, Austria.
- Amri, A., Chaumeil, J. C., Sfar, S. & Charrueau, C. (2012). Administration of Resveratrol: What Formulation Solutions to Bioavailability Limitations? *Journal of Controlled Release* 158 (2), 182-193.
- Benito-Román, O., Alonso, E. & Lucas, S. (2011). Optimization of the  $\beta$ -Glucan Extraction Conditions from Different Waxy Barley Cultivars. *Journal of Cereal Science* 53 (3), 271-276.
- Bouchard, A., Jovanović, N., Hofland, G. W., Jiskoot, W., Mendes, E., Crommelin, D. J. A., Witkamp, G. J. (2008). Supercritical fluid drying of carbohydrates: Selection of suitable excipients and process conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68, 781–794
- Chun-Fu, W., Jing-Yu, Y., Fang, W. & Xiao-Xiao, W. (2013). Resveratrol: Botanical Origin, Pharmacological Activity and Applications. *Chinese Journal of Natural Medicines* 11 (1), 1-15.
- Cocero, M. J, Martín A., Mattea F. & Varona, S. (2009). Encapsulation and Co-Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Fundamentals and Applications. *The Journal of Supercritical Fluids* 47 (3), 546-555.
- Comin, L. M., Temelli, F. & Saldaña, M. D. A. (2012). Barley Beta-Glucan Aerogels Via Supercritical CO<sub>2</sub> Drying. *Food Research International* 48 (2), 442-448.
- De Marco, I. & Reverchon, E. (2011). Influence of Pressure, Temperature and Concentration on the Mechanisms of Particle Precipitation in Supercritical Antisolvent Micronization. *The Journal of Supercritical Fluids* 58 (2), 295-302.
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B. & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive Compounds in Wine: Resveratrol, Hydroxytyrosol and Melatonin: A Review. *Food Chemistry* 130 (4), 797-813.
- Filip, V., Plocková M., Šmidrkal, J., Špičková, Z., Melzoch, K. & Schmidt, Š. (2003). Resveratrol and its Antioxidant and Antimicrobial Effectiveness. *Food Chemistry* 83 (4), 585-593.
- Guorong, S., Liqun, R., Huazhong, Y., Hua, X., Hua, Y., & Runa, J. (2008). Stabilization and Encapsulation of Photosensitive Resveratrol within Yeast Cell. *International Journal of Pharmaceutics* 349 (1–2), 83-93.
- Isailović, B. D., Kostić, I. T., Zvonar, A., Đorđević, V. B., Gašperlin, M., Nedović, V. A. & Bugarski, B. M. (2013). Resveratrol Loaded Liposomes Produced by Different Techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* (0).

- Jiang, Y. L. (2008). Design, synthesis and spectroscopic studies of resveratrol aliphatic acid ligands of human serum albumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16, 6406–6414
- Jing, L., Chang, L., Yun-Feng, C., De-Yu, Y. & Cui-Rong, S. (2012). The Antioxidant Effect of Imine Resveratrol Analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (17), 5744-5747.
- Jung, J. & Perrut, M. (2001). Particle Design using Supercritical Fluids: Literature and Patent Survey. *The Journal of Supercritical Fluids* 20 (3), 179-219.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, I, López-Nicolás, J.M., & Núñez-Delicado, E. (2007). Cyclodextrins as Resveratrol Carrier System. *Food Chemistry* 104 (1), 39-44.
- Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M.T., Zafrilla, M. P., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, E. (2011). Comparative Study of Different Methods to Measure Antioxidant Activity of Resveratrol in the Presence of Cyclodextrins. *Food and Chemical Toxicology* 49 (6), 1255-1260.
- Martín, A., Rodríguez-Rojo, S., Navarrete, A., De Paz, E., Queiroz, J. & Cocero, M.J. (2013). Post-extraction Processes: Improvement of Functional Characteristics of Extracts. In *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. RSC Publishing.
- Reverchon, E., Della Porta, G., De Rosa, I., Subra, P. & Letourneur, D. (2000). Supercritical antisolvent micronization of some biopolymers. *Journal of Supercritical Fluids* 18, 239–245
- Röding, J. (2006).  $\beta$ - (1,3)-  $\beta$ - (1,4)- Glucan as carrier for chemical substances. WO 2006/015627.
- Sang-Do, Y. & Erdogan, K. (2005). Formation of Polymer Particles with Supercritical Fluids: A Review. *The Journal of Supercritical Fluids* 34 (3): 287-308.
- Vetvicka, V. & Vancikova, Z., (2010). Synergistic effects of glucan and resveratrol. *African Journal of Biochemistry Research* 4 (4), 105-110
- Walle, T., (2011). Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1215, 9-15.
- Zhou, R., Wang, F., Guo, Z. & Zhao, L., (2012). Preparation and characterization of resveratrol/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent technology. *Journal of Food Process Engineering* 35, 677–686.