



Sistemas de encapsulación y liberación controlada basados en el uso de puertas moleculares

Encapsulation and controlled delivery systems based on molecular gates

María Ruiz-Rico, Édgar Pérez-Esteve, Ana Fuentes y José Manuel Barat

Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia

Resumen

Las partículas mesoporosas de sílice (PMS) son estructuras de dióxido de silicio organizadas de manera que se crean poros entre 2 y 50 nm. El alto volumen de poros y su superficie interna, convierten a las PMS en excelentes soportes para la encapsulación de moléculas bioactivas. Además, la posibilidad de incluir moléculas con función de puerta molecular en su superficie externa permite el diseño de sistemas inteligentes de liberación. Las PMS con puerta molecular muestran "liberación cero" de la molécula encapsulada, pero tras la aplicación de un estímulo externo específico son capaces de liberar su carga como respuesta específica a dicho estímulo.

En este artículo se describen las características de las PMS usadas en la encapsulación de compuestos bioactivos, las puertas moleculares más importantes para crear sistemas de liberación controlada y ejemplos de aplicación de PMS para la encapsulación de ingredientes alimenticios y nutracéuticos. Estas aplicaciones incluyen la modulación de la bioaccesibilidad de ingredientes alimenticios o nutracéuticos, así como la protección de su estabilidad frente a la degradación por agentes externos.

Palabras clave:

Encapsulación.
Liberación controlada. Soportes mesoporosos de sílice. Nutrición.

Abstract

Mesoporous silica particles (MSP) are structures of silicon dioxide arranged so that they are able to create pores between 2 and 50 nm. The high volume of pores and the internal surface of the MSP make them excellent supports for the encapsulation of bioactive molecules. In addition, the possibility of including molecules acting as molecular gate onto their outer surface allows the design of smart delivery systems. Gated-MSP show "zero release" of the encapsulated molecule, but after the application of a specific external stimulus, the cargo is released as a specific response to the stimulus.

This article describes the features of the MSP used in the encapsulation of bioactive compounds, the most important molecular gates to create controlled release systems, as well as examples of application of MSP for the encapsulation and controlled release of food ingredients and nutraceuticals. These applications include the modulation of the bioaccessibility of food ingredients or nutraceuticals as well as the protection of their stability against external agents degradation.

Key words:

Encapsulation.
Controlled release.
Mesoporous silica supports. Nutrition.

Ruiz-Rico M, Pérez-Esteve E, Fuentes A, Barat JM. Sistemas de encapsulación y liberación controlada basados en el uso de puertas moleculares. Nutr Hosp 2018;35(N.º Extra. 4):150-154

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.2142>

Correspondencia:

José Manuel Barat Baviera. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera, s/n. 46022 Valencia
e-mail: jmbarat@tal.upv.es

ENCAPSULACIÓN Y SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA EN NUTRICIÓN HUMANA

La salud está convirtiéndose en un valor personal y social cada vez más importante. Las personas son cada vez más conscientes de la importancia de una nutrición y una actividad física adecuadas frente a las categorizadas como enfermedades relacionadas con la civilización.

En este contexto, la aparición de alimentos funcionales ha abierto nuevas esperanzas para los consumidores, que entienden que sus opciones alimentarias pueden tener consecuencias para su salud, y para la industria alimentaria, que ve en los alimentos funcionales una estrategia para mejorar sus ventas en la actual recesión económica. Sin embargo, la preparación industrial de formulaciones de alimentos que contengan ingredientes funcionales eficaces después de la ingestión y de la digestión no es obvia. Por un lado, la mayoría de los estudios científicos que se ocupan de la evaluación de la funcionalidad de los ingredientes alimentarios se ha realizado *in vitro*, excluyendo así el estudio de los cambios de potenciales compuestos activos durante el procesamiento, el almacenamiento, la ingestión y la interacción con la microflora intestinal. Por otra parte, la manipulación de ciertos componentes bioactivos es muy complicada debido a la falta de compatibilidad con la matriz alimenticia en cuanto a solubilidad, degradación y propiedades sensoriales. En este escenario, la encapsulación, definida como un proceso para atrapar agentes activos dentro de un material portador, es una herramienta útil para mejorar la incorporación de moléculas bioactivas en alimentos superando las limitaciones comentadas.

Los sistemas de encapsulación usados en la industria alimentaria se han basado tradicionalmente en carbohidratos, proteínas o lípidos. Los sistemas clásicos de encapsulación son adecuados para muchas aplicaciones de la industria alimentaria, ya que son biocompatibles, biodegradables y poseen un alto potencial de modificación para lograr las propiedades requeridas. Sin embargo, el principal problema de estos sistemas orgánicos de encapsulación es la baja estabilidad del soporte durante el procesado y el almacenamiento de los alimentos, la limitada capacidad para controlar la velocidad y el sitio de liberación de la carga y la baja capacidad de protección de la sustancia encapsulada a lo largo del procesado del alimento y durante su paso por el tracto gastrointestinal.

Por el contrario, con el rápido desarrollo de la nanotecnología, sistemas de encapsulación nuevos y alternativos, como las partículas mesoporosas de sílice (PMS), están emergiendo con fuerza. Estos soportes basados en partículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con moléculas orgánicas que actúan como puerta molecular permiten la liberación de la molécula cargada en un sitio de acción particular del tracto digestivo. Este hecho favorece la absorción de los compuestos bioactivos en su forma nativa, lo que evita problemas relacionados con la inestabilidad o con propiedades sensoriales desagradables.

PROPIEDADES DE LAS PMS QUE LAS CONVIERTEN EN CANDIDATAS IDEALES PARA LA PREPARACIÓN DE SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN DE INGREDIENTES Y NUTRACÉUTICOS

Las partículas mesoporosas de sílice presentan unas propiedades fisicoquímicas que permiten su uso como soportes para la encapsulación y liberación de ingredientes alimenticios y nutracéuticos. En primer lugar, las PMS exhiben un gran número de mesoporos (con un tamaño de poro de entre 2 y 10 nm), lo que supone un gran volumen de poro (0,6-1 cm³/g) que permite cargar los soportes con una molécula de interés, y un área superficial específica elevada (700-1.000 m²/g), que permite que los soportes puedan ser funcionalizados con diferentes grupos orgánicos. En particular, la funcionalización de las superficies externas de las PMS con moléculas orgánicas, que actúan como puertas moleculares, ya que cambian su conformación en función de factores ambientales (pH, enzimas, tensioactivos, etc.), permite el desarrollo de PMS cerradas que muestran "liberación cero", pero que son capaces de liberar su carga bajo el estímulo adecuado (1). Estas características únicas de las PMS las convierten en excelentes candidatas para diseñar nuevos sistemas inteligentes de liberación en alimentos capaces de preservar las propiedades funcionales de las moléculas encapsuladas, así como de modular su bioaccesibilidad durante la producción, almacenamiento o digestión de los alimentos.

Las "puertas moleculares" se definen como las moléculas orgánicas inmovilizadas en la superficie de las PMS con el objetivo de controlar el transporte de masa de una molécula encapsulada en sus poros en función de un estímulo externo particular que puede controlar el estado de la puerta (cerrada o abierta) *ad lib* (1). Por tanto, las PMS funcionalizadas con puertas moleculares se basan en el uso de un soporte inorgánico que actúa como un nanorrecipiente (para cargar la molécula de interés) y una molécula "tipo puerta" capaz de abrirse o cerrarse tras la aplicación de ciertos estímulos externos (Fig. 1). La elección de ambos componentes, del soporte y de la puerta molecular son determinantes para conseguir una liberación controlada del material híbrido adecuado a la aplicación investigada.



Figura 1.

Representación gráfica de un sistema inteligente de liberación controlada formado por un soporte inorgánico (PMS) (morado) y una molécula orgánica anclada a la superficie del soporte que actúa como puerta molecular (amarillo).

Las PMS están compuestas por óxido de silicio (SiO_2), un componente químico “generalmente reconocido como seguro”, lo que garantiza su biocompatibilidad tanto a nivel celular como con los animales superiores. Además de la biocompatibilidad, su composición inorgánica favorece la estabilidad frente a los ataques químicos, biológicos y térmicos que se producen a lo largo de la cadena alimentaria y el proceso digestivo (2). Debido a esta característica, los PMS tienen una ventaja significativa en comparación con la mayoría de los sistemas de encapsulación orgánicos.

Otras características muy importantes a destacar de estos soportes son la capacidad de las PMS de proteger su carga frente a la degradación producida por agentes externos que tienen lugar durante el procesamiento y el almacenamiento de los alimentos (3,4), así como la compatibilidad de las PMS con las matrices alimentarias, ya que la incorporación de estos soportes a alimentos o bebidas no causa efectos adversos sobre la apariencia del producto, el sabor, la textura, la sensación en la boca o su vida útil (5,6).

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE PMS CON PUERTA MOLECULAR QUE RESPONDAN A ESTÍMULOS DIGESTIVOS

La investigación de las estrategias para desarrollar PMS funcionalizadas con puerta molecular que respondan a estímulos digestivos se ha centrado principalmente en el diseño de sistemas híbridos que respondan a cambios de pH o del potencial redox o a la presencia de enzimas digestivas o surfactantes, como las sales biliares (Fig. 2) (7). La estrategia más simple para desarrollar PMS con puerta molecular dependientes de estímulos digestivos se basa en el diseño de un sistema híbrido que responda a los cambios de pH que tienen lugar a lo largo del tracto gastrointestinal.

En el estómago, los jugos gástricos proporcionan un ambiente extremo caracterizado por un medio muy ácido ($\text{pH} = 1-2$). En el intestino delgado, el pH aumenta gradualmente, pasando de 5,7 a 6,2 en el duodeno y a 7,3-7,7 en el íleon. Teniendo esto en

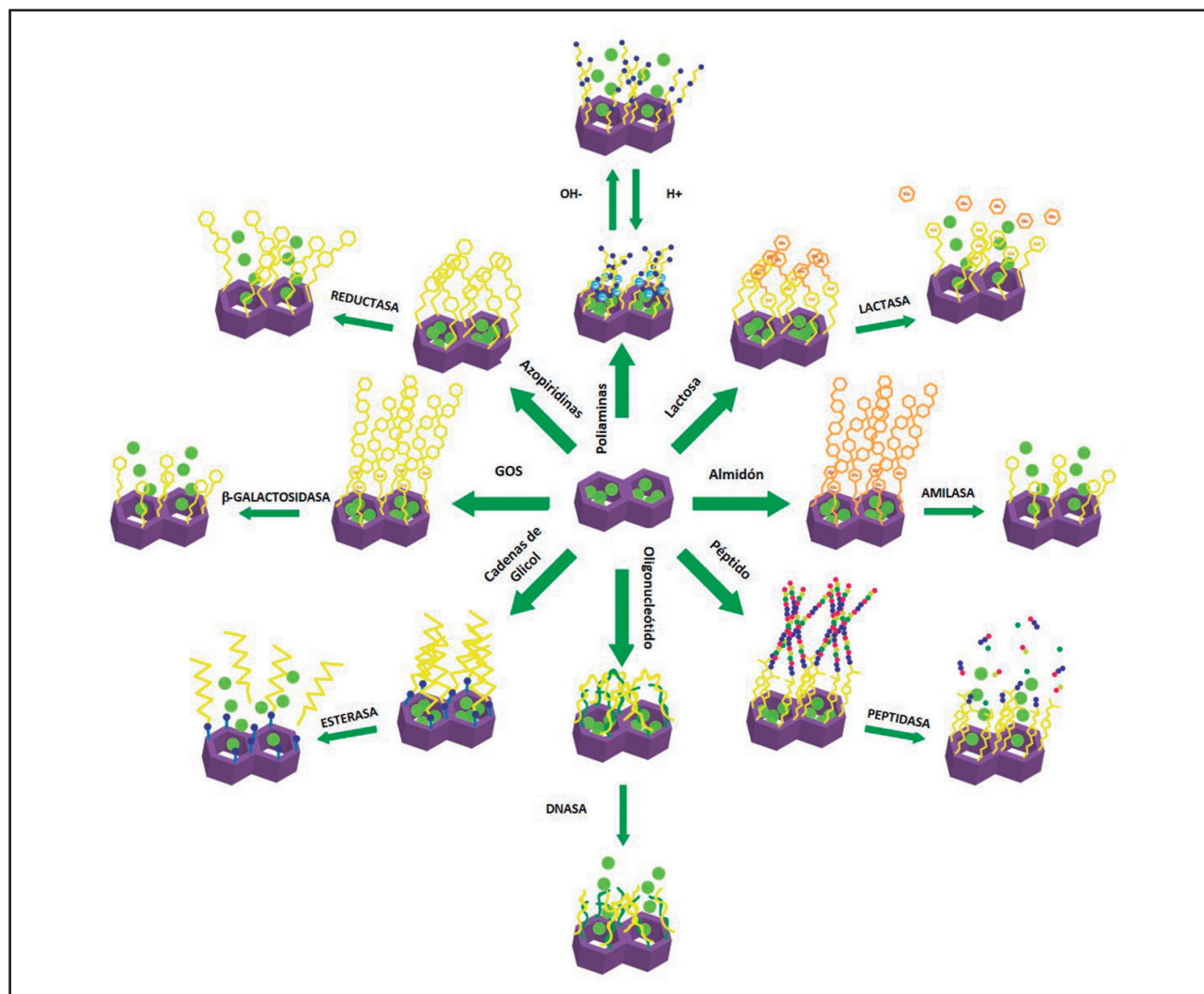


Figura 2.

Estrategias en investigación para desarrollar PMS funcionalizadas con puerta molecular que respondan a estímulos digestivos.

cuenta, se llevó a cabo el diseño de la primera puerta molecular dependiente de pH mediante inmovilización de poliaminas sobre la superficie externa de PMS. El mecanismo de apertura-cierre se basó en los procesos de protonación-desprotonación de las poliaminas en función del pH: con un pH ácido, las repulsiones *coulombianas* entre los grupos aminoprotonados impiden el acceso de los poros (puerta cerrada); con un pH neutro, la interacción de las aminas a través de grupos terminales no protonados permite la apertura de los poros (8). En la siguiente fase, se usó este sistema híbrido para controlar la administración de vitamina B₂ en función de los cambios de pH que imitaban diferentes jugos gastrointestinales. En las condiciones simuladas del estómago (pH = 2), la puerta molecular se mantenía cerrada, impidiendo la liberación de la vitamina, pero bajo las condiciones del intestino (pH = 7) la puerta se abría, permitiendo una liberación sostenida y controlada (9).

Otra estrategia desarrollada se basa en el uso de algunas enzimas presentes a lo largo del tracto gastrointestinal (α -amilasas, lipasas, carboxipeptidasas, esterasas, peptidasas, desoxirribonucleasas, etc.) para activar la liberación de una molécula encapsulada en el sitio de absorción del tracto gastrointestinal debido a la localización selectiva de dichas enzimas (estómago, borde de cepillo, colon, etc.). Como ejemplo de este tipo de estímulo digestivo, se desarrolló un sistema híbrido de PMS funcionalizadas con lactosa a través de un derivado alcoxisilano dependiente de la presencia de enzimas digestivas (sacarasas) en el medio (10). La simulación de las condiciones de la digestión mostró que la liberación de la carga en ausencia de la enzima era despreciable debido a la formación de una densa capa de lactosa unida por puentes de hidrógeno alrededor de los poros de las PMS. Sin embargo, en presencia de la enzima galactosidasa se producía la hidrólisis de los enlaces de la lactosa, lo que permite la liberación de la molécula encapsulada (10).

APLICACIÓN DE PMS PARA CONTROLAR LA LIBERACIÓN DE INGREDIENTES Y NUTRACÉUTICOS

Una vez descritos los principales sistemas inteligentes de liberación basados en PMS con puerta molecular, en esta sección se describen algunas de las aplicaciones recientes de PMS funcionalizadas para la encapsulación de ingredientes y nutraceuticos como las vitaminas.

Las vitaminas son uno de los compuestos bioactivos más inestables frente a la degradación por agentes ambientales, por lo que el uso de PMS para su encapsulación es una de las áreas con más ejemplos de aplicación. Uno de los trabajos más extensos en el campo de la encapsulación de las vitaminas usando PMS está siendo la encapsulación de folatos.

Los folatos (vitamina B₉) son esenciales para numerosas funciones corporales (como la síntesis y reparación de ADN, la división celular normal, el mantenimiento de la homeostasis, la prevención de la anemia o el correcto desarrollo fetal) y existen en una gran variedad de alimentos, entre los que se incluyen

frutas, legumbres, verduras de hoja verde, cereales y productos cárnicos y lácteos fermentados. Sin embargo, los folatos son sensibles a agentes ambientales como la temperatura, la presión y la exposición a la luz, por lo que se degradan fácilmente durante el procesamiento y digestión de los alimentos, lo que conduce, por tanto, a la aparición de deficiencias de folatos en la población, por lo que se ha tendido a la fortificación de alimentos o a la suplementación dietética con ácido fólico. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que una alta concentración de ácido fólico no metabolizado en sangre podría producir efectos secundarios sobre la salud, por lo que es fundamental controlar la cantidad que se ingiere. Resulta esencial controlar la ingesta de ácido fólico y modular su biodisponibilidad mediante el control de su bioaccesibilidad a lo largo del tracto gastrointestinal para mantener los efectos positivos de la fortificación o suplementación para prevenir problemas relacionados con la exposición masiva.

Teniendo en cuenta la importancia de la protección y dosificación del ácido fólico y los folatos, el diseño de sistemas inteligentes de liberación para encapsular, transportar y dosificar la vitamina en el intestino delgado de manera sostenible a lo largo del tiempo es un reto para la ciencia actual de la nutrición. Un sistema de liberación inteligente adecuado para la encapsulación del ácido fólico debería ser capaz de encapsular gran cantidad de vitamina, protegerla de la degradación, impedir su liberación durante su paso a través del estómago y liberar la vitamina gradualmente durante su paso a través del intestino. En esta línea, Pérez-Estevé y cols. han estado trabajando en la encapsulación de ácido fólico desde diferentes enfoques: el diseño de un sistema de encapsulación capaz de controlar la liberación de la vitamina tras llegar al intestino delgado, la mejora de la eficiencia de cargado de ácido fólico en PMS, el estudio de la estabilidad de la vitamina encapsulada y la evaluación de la influencia de la incorporación de PMS cargadas con ácido fólico en alimentos modelo.

En primer lugar, se llevó a cabo la encapsulación del ácido fólico usando como soporte inorgánico micropartículas de sílice MCM-41 y la poliamina N1-(3-trimetoxisililpropil) dietilentriamina como puerta molecular dependiente de los cambios de pH del tracto gastrointestinal (11). Los resultados de la simulación de la digestión confirmaron que no se producía liberación de la vitamina durante su paso por el estómago, mientras que la presencia de fluido intestinal simulado producía una liberación progresiva de la vitamina. Con este sistema de liberación inteligente, se consiguieron liberar 95 μ g de ácido fólico por mg de PMS tras la digestión simulada, lo que supone que, con la ingesta de tan solo 4 mg aproximadamente del sistema de encapsulación, se alcanzaría la ingesta dietética recomendada para la mujer embarazada (600 μ g/día de folatos o 360 μ g/día de ácido fólico sintético).

Una vez desarrollado el sistema de encapsulación se procedió a optimizar el cargado del ácido fólico en las PMS. Las condiciones de síntesis de las PMS permiten obtener soportes de sílice con diversos tamaños de partícula, forma y estructura porosa, por lo que se llevó a cabo el estudio, la comparación de la eficiencia de carga y la cinética de liberación de la vitamina desde cuatro soportes de sílice diferentes (MCM-41, SBA-15, UVM-7 y partículas huecas de sílice) (12). En todos los casos, la puerta molecular

(poliaminas) fue capaz de impedir la liberación del ácido fólico a pH ácido (estómago), mientras que la liberación se producía a pH neutro (condiciones del intestino delgado). El análisis de la cinética de liberación de los diversos soportes de sílice cargados reveló que el soporte MCM-41 era la PMS con un perfil de liberación más sostenido y, por tanto, era el más adecuado para modular la bioaccesibilidad del ácido fólico. Además, los ensayos de viabilidad celular realizados en este estudio mostraron que la exposición al ácido fólico encapsulado no afectaba significativamente la viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento con los cuatro soportes en un rango de concentración de hasta 200 µg/mL.

Por otra parte, se procedió a evaluar la estabilidad de los folatos y del ácido fólico encapsulados en PMS frente a la exposición al pH, a la luz y a la temperatura en comparación con la vitamina libre. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de estabilidad de la vitamina libre y encapsulada tanto en disolución acuosa como en zumos de frutas. Los resultados revelaron que el ácido fólico encapsulado tenía mayor estabilidad tras la exposición a alta temperatura y a las luces visible y ultravioleta, lo que confirma el efecto protector del soporte de sílice mesoporoso (3,4).

Una vez establecidas las características del sistema de encapsulación de ácido fólico basado en PMS, puede afirmarse que este sistema es una alternativa excelente a la suplementación tradicional de esta vitamina, así como a la formulación de alimentos funcionales. Por ello, se llevó a cabo el estudio de la influencia de la adición de PMS sobre las propiedades fisicoquímicas de un alimento modelo mediante la preparación de un nuevo alimento funcional; en concreto, yogur batido enriquecido con ácido fólico encapsulado en PMS con puerta molecular dependiente de cambios de pH (6). En primer lugar, se llevó a cabo el estudio del perfil de liberación del ácido fólico encapsulado para establecer la bioaccesibilidad de la vitamina en el tracto gastrointestinal. Los resultados de la digestión *in vitro* mostraron que el sistema de encapsulación era capaz de inhibir la liberación de ácido fólico tanto en el yogur (pH 4) como en condiciones simuladas de estómago (pH 2), así como de liberar la vitamina de forma controlada a pH neutro (intestino) y modular su bioaccesibilidad. Además, se evaluó la influencia de la adición del ácido fólico encapsulado sobre las propiedades fisicoquímicas y la viabilidad bacteriana del yogur enriquecido durante el almacenamiento en refrigeración (21 días). Los resultados de estos ensayos revelaron que el enriquecimiento con el soporte de encapsulación no alteró las propiedades fisicoquímicas del yogur (pH, color, sinéresis y reología) ni causó ningún efecto sobre la viabilidad de las bacterias lácticas (6).

CONCLUSIONES

La encapsulación de ingredientes y nutracéuticos en partículas mesoporosas de sílice tiene el potencial de resolver algunas de las demandas de la industria alimentaria. El diseño de sistemas de liberación inteligentes basados en la combinación de un soporte inorgánico (PMS) y de una molécula orgánica que actúa como

puerta molecular puede permitir el desarrollo de nuevos alimentos funcionales o sistemas de administración oral capaces de responder a un estímulo que ocurre de forma natural en el tracto gastrointestinal.

Tal y como se ha descrito en esta revisión, los sistemas de encapsulación basados en PMS que se han desarrollado en los últimos años han demostrado que son capaces de mejorar la biodisponibilidad de moléculas bioactivas, proteger la molécula encapsulada frente a la degradación durante el procesado, el almacenamiento y la digestión, enmascarar ciertas propiedades organolépticas no deseadas de la molécula o mejorar su compatibilidad con las matrices alimentarias. Sin embargo, la incorporación de estos soportes de encapsulación en los alimentos todavía es incierta, ya que no existen conocimientos suficientes sobre su potencial toxicidad, a lo que hay que añadir la falta de regulación sobre su uso como aditivos o ingredientes alimenticios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aznar E, Oroval M, Pascual L, Murguía JR, Martínez-Máñez R, Sancenón F. Gated materials for on-command release of guest molecules. *Chemical Reviews* 2016;116(2):561-718.
2. Pérez-Esteve É, Ruiz-Rico M, de la Torre C, Llorca E, Sancenón F, Amorós P, et al. Stability of different mesoporous silica particles during an *in vitro* digestion. *Microporous and Mesoporous Materials* 2016;230:196-207.
3. Ruiz-Rico M, Daubenschütz H, Pérez-Esteve É, Marcos MD, Amorós P, Martínez-Máñez R, et al. Protective effect of mesoporous silica particles on encapsulated folates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2016;105:9-17.
4. Ruiz-Rico M, Pérez-Esteve É, Lerma-García MJ, Marcos MD, Martínez-Máñez R, Barat JM. Protection of folic acid through encapsulation in mesoporous silica particles included in fruit juices. *Food Chemistry* 2017;218:471-8.
5. Pérez-Esteve É, Oliver L, García L, Nieuwland M, de Jongh HH, Martínez-Máñez R, et al. Incorporation of mesoporous silica particles in gelatine gels: Effect of particle type and surface modification on physical properties. *Langmuir* 2014;30(23):6970-9.
6. Pérez-Esteve É, Ruiz-Rico M, Fuentes A, Marcos MD, Sancenón F, Martínez-Máñez R, et al. Enrichment of stirred yoghurts with folic acid encapsulated in pH-responsive mesoporous silica particles: Bioaccessibility modulation and physico-chemical characterization. *LWT- Food Science and Technology* 2016;72:351-60.
7. Pérez-Esteve É, Ruiz-Rico M, Martínez-Máñez R, Barat JM. Mesoporous silica-based supports for the controlled and targeted release of bioactive molecules in the gastrointestinal tract. *Journal of Food Science* 2015;80(11):E2504-16.
8. Casasús R, Marcos MD, Martínez-Máñez R, Ros-Lis JV, Soto J, Villaescusa LA, et al. Toward the development of ionically controlled nanoscopic molecular gates. *Journal of the American Chemical Society* 2004;126(28):8612-3.
9. Bernardos A, Aznar E, Coll C, Martínez-Máñez R, Barat JM, Marcos MD, et al. Controlled release of vitamin B2 using mesoporous materials functionalized with amine-bearing gate-like scaffolds. *Journal of Controlled Release* 2008;131(3):181-9.
10. Bernardos A, Aznar E, Marcos MD, Martínez-Máñez R, Sancenón F, Soto J, et al. Enzyme-responsive controlled release using mesoporous silica supports capped with lactose. *Angewandte Chemie* 2009;121(32):5998-6001.
11. Pérez-Esteve É, Fuentes A, Coll C, Acosta C, Bernardos A, Amorós P, et al. Modulation of folic acid bioaccessibility by encapsulation in pH-responsive gated mesoporous silica particles. *Microporous & Mesoporous Materials* 2015;15:124-32.
12. Pérez-Esteve É, Ruiz-Rico M, de la Torre C, Villaescusa LA, Sancenón F, Marcos MD, et al. Encapsulation of folic acid in different silica porous supports: a comparative study. *Food Chemistry* 2016;196:66-75.