



**UNAP**



FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN  
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TESIS

OPTIMIZACIÓN DE SECADO DE SANGRE BOVINA POR METODOLOGÍA  
DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y FORMULACIÓN DE ALIMENTO PARA  
LARVAS DE PECES CARNÍVOROS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO EN INDUSTRIAS  
ALIMENTARIAS

PRESENTADO POR:

JOYSSY CELESTE GONZALES VASQUEZ  
BRYAM DAVID RAMÍREZ ERAZO

ASESORES

Dra. TERESA DE JESÚS MORI DEL ÁGUILA  
Dr. FERNANDO TELLO CÉLIS

IQUITOS, PERÚ

2019

# ACTA DE SUSTENTACIÓN



**UNAP**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Escuela de Formación Profesional de Ingeniería en  
Industrias Alimentarias

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 026-CGT-FIA-UNAP-2019

En Iquitos, en la Sala de Reuniones de la Decanatura, ubicado en el Campus SL11 Puerto Almendra de la Facultad de Industrias Alimentarias sito al margen derecho del río Nanay, Distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a los 14 días del mes de diciembre de 2019, a horas .....9:00....., se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada : "OPTIMIZACIÓN DE SECADO DE SANGRE BOVINA POR METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y FORMULACIÓN DE ALIMENTO PARA LARVAS DE PECES CARNÍVOROS", aprobado con Resolución Decanal N° 061-FIA-UNAP-2019 presentado por los Bachilleres: JOYSSY CELESTE GONZALES VASQUEZ y BRYAM DAVID RAMIREZ ERAZO, para optar el Título Profesional de Ingenieros en Industrias Alimentarias, que otorga la Universidad de acuerdo a Ley y Estatuto.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N° 0381-FIA-UNAP- 2019 del 19 de noviembre de 2019, está integrado por:

**ROGER RUIZ PAREDES**  
**JORGE AUGUSTO TORRES LUPERDI**  
**ALENGUER GERONIMO ALVA AREVALO**

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas:.....SATISFACTORIAMENTE

El Jurado después de las deliberaciones correspondientes, llego a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la tesis ha sido:.....APROBADO..... con la calificación NOY BOENO

Estando los bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de Ingenieros en Industrias Alimentarias Siendo las .....10:00.... se dio por terminado el acto de sustentación.

**Presidente**

*Ing. Roger Ruiz Paredes*  
Ingeniero en Industrias Alimentarias  
CIP: 41754

**Miembro**

*Jorge Augusto Torres Luperdi*  
Ingeniero en Industrias Alimentarias  
CIP: 23030

**Miembro**

*Alenguer Gerónimo Alva Arevalo*  
Ingeniero en Industrias Alimentarias  
CIP: 45167

**Asesor**

*Fernando Tello Celis*  
Ingeniero en Industrias Alimentarias  
CIP: 47409

**Asesor**

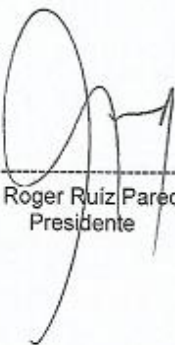
*Elga. Teresa de Jesus Mori Del Aguila Dra.*  
CBP N° 1051



# JURADO CALIFICADOR

## MIEMBROS DEL JURADO

El jurado calificador certifica que el trabajo de investigación "Optimización de secado de sangre bovina por metodología de superficie de respuesta y formulación de alimento para larvas de peces carnívoros" de responsabilidad de los bachilleres JOYSSY CELESTE GONZALES VASQUEZ y BRYAM DAVID RAMIREZ ERAZO; han sido detalladamente revisados por los miembros del jurado, quedando autorizado para la sustentación.



---

Ing. Roger Ruiz Paredes  
Presidente



---

Ing. Jorge Augusto Torres Luperdi  
Miembro



---

Ing. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo  
Miembro

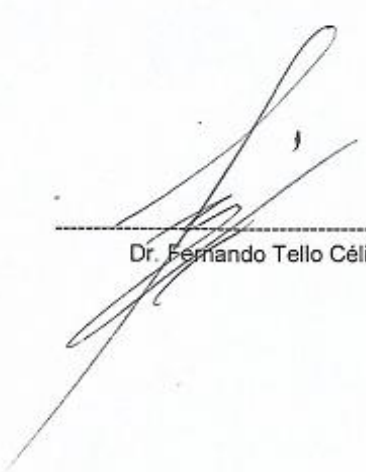
### Autorización de los Asesores

El Doctor Fernando Tello Célis, docente principal adscrito al Departamento de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias y la Dra. Teresa de Jesús Mori Del Águila, docente principal adscrito al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

#### INFORMAN:

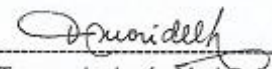
Que los Bachilleres JOYSSY CELESTE GONZALES VASQUEZ y BRYAM DAVID RAMIREZ ERAZO, han realizado bajo nuestra dirección, el trabajo contenido en la memoria intitulada: **Optimización de secado de sangre bovina por metodología de superficie de respuesta y formulación de alimento para larvas de peces carnívoros** y considerando que el mismo reúne los requisitos necesarios para ser presentado, ante el Jurado Calificador, a tal efecto damos pase para su sustentación y posterior obtención del título de: Ingeniero (a) en Industrias Alimentarias.

**AUTORIZAMOS:** A los citados Bachilleres a presentar la Tesis, para proceder a su sustentación cumpliendo así con la normativa vigente que regula el Reglamento de Grados y Títulos en la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.



---

Dr. Fernando Tello Célis



---

Dra. Teresa de Jesús Mori Del Águila

## **Dedicatoria**

Este trabajo va dedicado a Dios, por darme la vida y por haber puesto en mi camino a todas las personas que me ayudaron en este proyecto. A mi padre que desde el cielo me guía y me protege, a mi madre por el apoyo incondicional, a mi hermana y sobrina que estuvieron motivándome siempre incondicionalmente y alentándome a luchar por mis sueños, a mi asesor principal por la paciencia y el apoyo que me brindo hasta el final.

***Joyssy Celeste***

Dedico este trabajo a Dios por las bendiciones y la oportunidad que nos brindó para poder tener esta experiencia de investigación. A mis adorados padres por brindarme su amor y apoyo en los momentos que más los necesité. A todas las personas que contribuyeron a mi formación personal y profesional.

***Bryam David***

## **Agradecimiento**

Agradezco en primer lugar a mis padres y a mi hermana por su apoyo incondicional que me brindaron para lograr mi objetivo.

A mi princesa hermosa que es mi sobrina por haber sido mi motivación y mi alegría en los momentos más difíciles.

A Dios todopoderoso por su infinito amor y bendición.

A mis amigos (as) que me apoyaron con sus tiempo y dedicación en el desarrollo del trabajo de investigación.

A mi ángel del cielo por estar siempre conmigo y haberme enseñado a luchar por mis sueños.

Al Dr. Fernando Tello Célis, por su orientación en la realización de este trabajo. Por su paciencia, amabilidad y carisma para enseñar las cosas, siendo ejemplo de dedicación y exigencia.

Al M.Sc. Rafael Segundo Vela Paredes, por su apoyo en la redacción de la tesis

A todos muchas gracias, ya que sin ellos no podría haber sido fácil lograr el objetivo de terminar el trabajo de investigación.

**Celeste**

Agradezco a Dios, ya que nos dio la voluntad y la oportunidad de realizar este trabajo de investigación para poder lograr ser mejores profesionales.

A mis padres porque están siempre a mi nuestro lado y más cuando los necesite, por mostrar en cada momento su apoyo incondicional ayudándome a desarrollarme completamente en todos los aspectos de la vida.

Al Dr. Fernando Tello Celis, por habernos dado la oportunidad de realizar este trabajo, por su enseñanza, su amabilidad de entrar en su equipo de estudiantes investigadores.

Al M.Sc Rafael Segundo Vela Paredes por asesorarnos en la parte estadística y redacción de tesis.

**Bryam**

## ÍNDICE

<b>PORTADA.....</b>	<b>I</b>
<b>ACTA DE SUSTENTACIÓN .....</b>	<b>II</b>
<b>JURADO CALIFICADOR.....</b>	<b>III</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>V</b>
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIV</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Antecedentes .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Bases teóricas .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Metodología de superficie de respuesta .....	10
1.2.2 Acuicultura .....	11
1.2.3 Microencapsulación.....	11
1.2.4 Aplicaciones en la industria alimentaria .....	12
1.2.5 Técnicas de microencapsulación .....	13
1.2.5.1 Gelificación iónica .....	13
1.2.5.2 Interacción electrostática .....	14
1.2.6 Biopolímeros utilizados como encapsulante .....	14
1.2.6.1 Pectina .....	15
1.2.6.2 Proteínas de sangre bovino.....	16
1.2.6.3 Gelatina .....	18
1.2.7 Bioactivos.....	19
1.2.8 Oxidación lipídica.....	20
<b>1.3 Definición de términos básicos .....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Secado por pulverización .....	20
1.3.2 Metodología de superficie de respuesta .....	22
1.3.3 Microencapsulación.....	22
1.3.4 Gelificación iónica.....	22
1.3.5 Sangre.....	22
1.3.6 Desnaturalización de proteínas .....	23
1.3.7 Larvicultura .....	23
1.3.8 Alimento vivo para larvas de peces .....	23
<b>CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Formulación de la hipótesis.....</b>	<b>24</b>

<b>2.2</b>	<b>Variables y su operacionalización .....</b>	<b>24</b>
2.2.1	Variables independientes .....	24
2.2.1.1	Estudio para la optimización de secado de sangre bovino.....	24
2.2.1.2	Estudio para la formulación y obtención de alimento para larvas de peces .....	24
2.2.2	Variables dependientes .....	24
2.2.2.1	Estudio para la optimización de secado de sangre bovino.....	24
2.2.2.2	Estudio para la formulación y obtención de alimento para larvas de peces .....	24
2.2.3	Operacionalización de variables .....	25
<b>CAPITULO III: METODOLOGÍA.....</b>		<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Tipo y diseño de estudio .....</b>	<b>28</b>
3.1.1	Para el secado de sangre bovino.....	28
3.1.2	Para la producción de micropartículas y recubrimiento con proteínas.....	29
<b>3.2</b>	<b>Diseño muestral .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3</b>	<b>Procedimientos de recolección de datos .....</b>	<b>30</b>
3.3.1	Caracterización de materiales .....	30
3.3.1.1	Determinación de hierro en sangre bovino .....	30
3.3.1.2	Determinación de proteína .....	31
3.3.2	Determinación de lípidos .....	31
3.3.3	Secado de la sangre bovino.....	32
3.3.4	Caracterización de la sangre bovino en polvo .....	33
3.3.5	Producción de micropartículas para alimentación de larvas de peces.....	34
3.3.6	Caracterización de micropartículas obtenidas por gelificación iónica .....	34
3.3.6.1	Tamaño medio de las micropartículas .....	34
3.3.6.2	Morfología y microestructura de las micropartículas .....	34
3.3.6.3	Determinación de humedad en micropartículas .....	35
3.3.6.4	Análisis de ceniza .....	35
3.3.6.5	Determinación de proteína .....	35
3.3.6.6	Eficiencia de encapsulación .....	35
3.3.6.7	Recubrimiento de las micropartículas con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de doncella por interacción electrostática.....	35
3.3.6.8	Secado de las micropartículas.....	36
3.3.6.9	Tiempo de vida útil de las micropartículas (producción de peróxidos) .....	36
<b>3.4</b>	<b>Procesamiento y análisis de los datos .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5</b>	<b>Aspectos éticos.....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Composición centesimal de sangre bovino.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Composición centesimal de biopolímeros .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Secado de sangre bovino utilizando <i>Spray dryer</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4</b>	<b>Selección del modelo apropiado para el contenido de proteína.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5</b>	<b>Optimización de la temperatura y velocidad de flujo sobre porcentaje de proteínas.....</b>	<b>44</b>



<b>4.6</b>	<b>Producción de micropartículas por gelificación iónica .....</b>	<b>47</b>
<b>4.7</b>	<b>Caracterización de micropartículas producidas por gelificación iónica .....</b>	<b>48</b>
<b>4.8</b>	<b>Recubrimiento de micropartículas de pectina con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> por interacción electrostática...</b>	<b>49</b>
4.8.1	Caracterización de micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino .....	50
4.8.2	Caracterización de micropartículas de pectina recubiertas con gelatina de piel de <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> .....	51
<b>4.9</b>	<b>Morfología, microestructura y tamaño de micropartículas, con y sin recubrimiento proteico .....</b>	<b>52</b>
4.9.1	Morfología de micropartículas producidas por gelificación iónica .....	52
4.9.2	Morfología de micropartículas producidas por gelificación iónica, recubiertas con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> .....	53
4.9.3	Microestructura de micropartículas con y sin recubrimiento proteico.....	54
4.9.4	Tamaño de micropartículas con y sin recubrimiento proteico.....	55
<b>4.10</b>	<b>Producción de peróxidos en micropartículas para alimentación de larvas de peces .....</b>	<b>57</b>
<b>CAPITULO V: CONCLUSIONES .....</b>		<b>59</b>
<b>CAPITULO VI: RECOMENDACIONES .....</b>		<b>60</b>
<b>CAPÍTULO VII: FUENTES DE INFORMACIÓN .....</b>		<b>61</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1:</b> Factores analíticos y niveles para MSR .....	29
<b>Tabla 2:</b> Planeamiento experimental.....	29
<b>Tabla 3:</b> Composición centesimal de sangre bovino.....	38
<b>Tabla 4:</b> Composición centesimal de los biopolímeros.....	39
<b>Tabla 5:</b> Diseño experimental para secado de sangre bovino con variación de temperatura (T) y velocidad de flujo(mL/min).....	40
<b>Tabla 6:</b> Análisis de los modelos de análisis de DCCR para los % proteína para secado de sangre bovino.....	41
<b>Tabla 7:</b> Análisis de la varianza para la variable % proteína en el secado de sangre bovino por <i>spray dryer</i> .....	44
<b>Tabla 8:</b> Coeficiente de variación para predecir el %proteína en el secado de sangre bovino por <i>spray dryer</i> .....	45
<b>Tabla 9:</b> Caracterización de micropartículas producidas por gelificación iónica.....	48
<b>Tabla 10:</b> Composición centesimal de micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino.....	50
<b>Tabla 11:</b> Contenido de hierro en micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino.....	51
<b>Tabla 12:</b> Composición centesimal de micropartículas recubiertas con gelatina de piel de <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> .....	51
<b>Tabla 13:</b> Tamaño de micropartículas recubiertas con proteína de sangre bovino y gelatina de piel de <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> .....	56
<b>Tabla 14:</b> Variación del índice de peróxido del aceite encapsulado durante 30 días.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1:</b> Estructura química de la gelatina .....	19
<b>Figura 2:</b> SD – <i>Basic Laboratory Scale Spray Dryer</i> .....	21
<b>Figura 3:</b> Estructura de la hemoglobina.....	23
<b>Figura 4:</b> Flujograma de obtención de sangre bovino en polvo.....	33
<b>Figura 5:</b> Superficie de respuesta de % proteína en el secado de sangre bovino por <i>Spray Dryer</i> .....	42
<b>Figura 6:</b> Gráfico de contorno de % proteína en el secado de sangre bovino por <i>Spray Dryer</i> .....	42
<b>Figura 7:</b> Valores observados vs valores predichos del % proteína en el secado de sangre bovino por <i>Spray Dryer</i> .....	43
<b>Figura 8:</b> Diagrama de Pareto de las variables.....	44
<b>Figura 9:</b> A – Superficie de respuesta del valor deseable del % proteína en el secado de sangre bovino por <i>spray dryer</i> . B – Gráfico de contorno del valor deseable del % proteína en el secado de sangre bovino por <i>spray dryer</i> .....	45
<b>Figura 10:</b> Foto de sangre en polvo seco obtenido en secador spray dryer....	47
<b>Figura 11:</b> Foto de micropartícula de pectina sin recubrimiento obtenida por microscopía óptica. Escala 100 µm.....	53
<b>Figura 12:</b> Imagen obtenida por MICROSCOPIA ÓPTICA: MPRSB2 y MPRSB8; micropartículas recubiertas con proteína de sangre bovino de 2 y 8 %respectivamente MPRGD2 y MPRGD8 micropartículas recubiertas con gelatina de piel de <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> de 2 y 8 % respectivamente. Barra MO=100 µm objetivo 40X.....	54
<b>Figura 13:</b> Imagen obtenida por MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) MPGI: micropartículas de pectina conteniendo gotas de aceite. MPRSB8: micropartículas de pectina recubiertas con proteína de sangre bovino 8%.....	55

## ABREVIATURAS

**AOAC:** Association of Official Analytical Chemists

**DCCR:** Diseño Compuesto Central Rotacional

**DBB:** Diseño Box - Behnken

**DCA:** Diseño Compuesto Aleatorizado

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**FAO:** Food and Agriculture Organization

**MEB:** Microscopía Electrónica de Barrido

**MO:** Microscopía Óptica

**MPGI:** Micropartículas Producidas por Gelificación Iónica

**MPRSB2:** Micropartículas Recubiertas con Sangre Bovino 2%

**MPRSB4:** Micropartículas Recubiertas con Sangre Bovino 4%

**MPRSB6:** Micropartículas Recubiertas con Sangre Bovino 6%

**MPRSB8:** Micropartículas Recubiertas con Sangre Bovino 8%

**MPRGD2:** Micropartículas Recubiertas con Gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum* 2%

**MPRGD4:** Micropartículas Recubiertas con Gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum* 4%

**MPRGD6:** Micropartículas Recubiertas con Gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum* 6%

**MPRGD8:** Micropartículas Recubiertas con Gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum* 8%

**MPRSB:** Micropartículas Recubiertas con Sangre Bovino

**MPRGD:** Micropartículas Recubiertas con Gelatina de Piel de *Pseudoplatystoma fasciatum*

**MSR:** Metodología de Superficie de Respuesta

**SB:** Sangre Bovino

**T:** Temperatura

**TBARS:** Thiobarbituric Acid Reactive Substances

**V:** Velocidad de Flujo

## RESUMEN

Una de las actividades económicas de importancia en la región Amazónica es la acuicultura, actividad que se ve afectada por el alto costo para adquirir alimentos para larvas de peces. La actividad del beneficio del ganado bovino genera subproductos como la sangre, que es una fuente de proteínas y hierro de alto valor nutricional, y a su vez contiene numerosas proteínas funcionales y péptidos de elevada bioactividad. Uno de los objetivos planteados es aprovechar la sangre deshidratada por atomización para la utilización como cobertura de micropartículas de pectina por gelificación iónica utilizando pectina de bajo grado de esterificación recubiertas con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de doncella en el intento de mimetizar la composición centesimal encontrada en nauplios de *Artemia*, alimento vivo comúnmente utilizado en la cría intensiva de larvas de peces. Las mayores cantidades de proteína fueron obtenidas en la combinación de temperatura de ~ 135°C a ~ 150°C y velocidad de flujo de 6 a 8 v/s. Las micropartículas producidos por gelificación iónica fueron recubiertas con proteínas de sangre bovino y gelatina de *Pseudoplatystoma fasciatum* (doncella) conteniendo una mezcla de aceites (sacha inchi, pescado y aguaje) se utilizó como activo aceite de sachá inchi. El tamaño de las micropartículas sin recubrimiento proteico midió  $185.25\mu\text{m}\pm 7.45$ . Las micropartículas recubiertas con sangre bovino disminuyeron de tamaño, comparados con el tamaño de las micropartículas recubiertas con gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum* (doncella). La combinación de gelificación iónica y la interacción electrostática produjo una dieta para larvas de peces de ~60% de proteína y ~20% de lípidos. La composición centesimal de las micropartículas mimetizan al del alimento vivo de larvas de peces. Microscopía electrónica de barrido fue utilizado para evaluar la resistencia de las micropartículas al proceso de secado.

**Palabras claves:** Sangre bovino, *Spray drying*, gelificación iónica, metodología de superficie de respuesta.

## ABSTRACT

One of the important economic activities in the Amazon region is aquaculture, an activity that is affected by the high cost of acquiring food for fish larvae. The activity of the benefit of cattle generates by-products such as blood the source of iron. One of the stated objectives is to take advantage of spray-dried dehydrated blood for use as a coverage of pectin microparticles by ionic gelation using low-grade pectin coated with bovine blood proteins and maiden's skin jelly in an attempt to mimic the composition centesimal found in *Artemia nauplii*, a live food commonly used in the intensive rearing of fish larvae. The highest amounts of protein were obtained in the combination of temperature of  $\sim 35^{\circ}\text{C}$  to  $\sim 150^{\circ}\text{C}$  and flow rate of 6 to 8 v/s. The microparticles produced by ionic gelation were coated with bovine blood and maiden skin jelly proteins containing a mixture of oils (sacha inchi, fish and aguaje) sachá inchi oil was used as active. The size of the microparticles without protein coating measured  $185.25\mu\text{m} \pm 7.45$ . Microparticles coated with bovine blood decreased in size compared to the size of the gelatin-coated microparticles of maiden skin. The combination of ionic gelation and electrostatic interaction produced a diet for fish larvae of  $\sim 60\%$  protein and  $\sim 20\%$  lipids. The centesimal composition of the microparticles mimic to the live food of fish larvae. Scanning electron microscopy was used to evaluate the resistance of the microparticles to the drying process.

Keywords: Bovine blood, Spray drying, ionic gelation, response surface methodology.

## INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria genera residuos de contenido nutricional potencialmente utilizables (Mendes et al. 2018). Los alimentos de origen animal como la sangre bovino son fuente de hierro y de mayor biodisponibilidad por contener hierro hemínico y su deshidratación son útiles para la fortificación de alimentos. Además, el hierro se presenta en la naturaleza como hierro hemínico y hierro no hemínico. El hierro hemínico forma parte exclusivamente de alimentos de origen animal ya sea como hemoglobina y/o mioglobina (Martínez et al. 1999).

La base científica indica que la sangre es una de las principales fuentes de hierro, además de tener alto contenido de proteínas. El valor nutricional del polvo de la sangre se debe a la presencia de proteínas (Mullen et al. 2017). También son importantes las proteínas provenientes de la dieta para el mantenimiento de la estructura corporal e imprescindible para el crecimiento, una ingesta adecuada de proteínas mantiene la masa corporal proteica y la capacidad de adaptación a diferentes condiciones metabólicas y ambientales (Lynch et al. 2017). Sin embargo, la sangre producida en los mataderos representa un problema de contaminación ambiental. La sangre líquida contiene aproximadamente 30 g/L de nitrógeno total, demanda química de oxígeno de aproximadamente 400 g/L y demanda biológica de oxígeno de 200 g/L (Beltrán y Perdomo 2007). Actualmente se vierten al alcantarillado del camal municipal de Punchana aproximadamente 45,000 litros de sangre bovino al mes; este residuo se vierte a los afluentes hídricos sin tratamiento previo con un alto índice de contaminación ambiental debido, entre otras cosas al desconocimiento del potencial nutricional de la sangre bovino. Por otro lado, subproductos derivados del sacrificio de ganado bovino en los camales municipales y la comercialización de especies acuícolas se han convertido en un problema de salud pública por la contaminación que genera.

Además, la sangre del ganado vacuno rinde aproximadamente 5% de su peso corporal (Parés et al. 2014). Asimismo, existe una presión global en la industria de alimentos para reducir el impacto ambiental que este produce. Esto a su vez ha incrementado el interés en la recuperación completa y el uso óptimo de los subproductos del procesamiento de alimentos (Galanakis 2016).

La sangre animal contiene en promedio 18% de proteínas y es fuente de aminoácidos esenciales como leucina, lisina y triptófano, además de ser fuente de hierro hemínico (Lynch et al. 2017). Las proteínas de sangre bovino tienen propiedades funcionales deseables por la industria alimentaria, que incluyen capacidad de emulsificación, gelificación, retención de agua y colorante natural (Ofori y Hsieh 2011).

Para recolección de sangre, los animales son sometidos a inspección veterinaria para garantizar que estén aptos para el consumo humano, incluso el ambiente debe estar cerrado libre de contaminación y exclusivo para el sacrificio del animal, para lo cual se utilizara cuchillos especiales para la sangría, que será inmediatamente recepcionado en recipientes limpios. La introducción de métodos eficientes con inversiones y tecnología mínimas favorecería indudablemente un mayor aprovechamiento de la sangre (Beltrán y Perdomo 2007).

La sangre debe obtenerse en condiciones asépticas (preferiblemente por extracción directa). Posteriormente es enfriada de 5 – 10 °C. Procesar la sangre de animales se ha convertido en un tema polémico en la que encontramos grandes ventajas como beneficios económicos, sociales, competitivos y ambientales, creando oportunidades laborales en el rubro de la industria de los alimentos (Ofori y Hsieh 2012).

Se han realizado estudios realizados con la fracción celular seca de la sangre añadidos a los alimentos como una fuente de hierro hemínico, debido a su mayor accesibilidad evitando la acción de inhibidores de la absorción de hierro. Se ha determinado que el producto que se obtiene mediante el secado por atomización de la sangre de bovino tiene mayor contenido proteico 83.7 g/100 g y de hierro 385.2 mg/100 g además de presentar características apropiadas para la panificación y como medio de fortificación para diferentes productos (Lima et al. 2013).

Las propiedades nutricionales y funcionales de las proteínas de diferentes fuentes se han investigado durante años. El valor nutricional de la proteína depende del contenido de aminoácidos esenciales y de la utilización de aminoácidos específicos después de la digestión y absorción (Friedman 1996). En términos de sus propiedades funcionales, las proteínas contribuyen a las



propiedades fisicoquímicas y sensoriales de varios alimentos ricos (Korhonen y Pihlanto 2003).

Los procesos de producción de materias primas e insumos requieren ser optimizados con la finalidad de hacer uso eficiente de las mismas, una de las herramientas para optimizar es la Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) que es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos y establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta (Jacyna, Kordalewska y Markuszewski 2019).

La aplicación de diseños experimentales combinados con la metodología de superficie de respuesta contribuye a mejorar la eficiencia en la producción de alimentos, ya que son metodologías multivariadas que durante la optimización tienen en cuenta las variables y sus posibles interacciones. El uso de estas estrategias permite la máxima información con un número reducido de ensayos experimentales (Wani et al. 2008).

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un procedimiento estadístico que se utiliza con frecuencia para optimizar una respuesta que se ve afectada por uno o más factores, como variables de proceso (Jacyna, Kordalewska y Markuszewski 2019). La optimización es una herramienta eficiente para mejorar procesos de operaciones unitarias utilizando ecuaciones multivariadas que describen los efectos de los factores en una respuesta dada y determinan las interrelaciones entre los factores y los efectos combinados de todos los factores de un ensayo en la respuesta (Madamba 2002). Por esta razón, MSR es ampliamente utilizado en la investigación que incluye el área de alimentos (Chan, Tan y Chin 2019; Ikrang y Umani 2019).

La pesca y la acuicultura son de importancia para la alimentación, nutrición y fuente de empleo de millones de personas, que presenta grandes dificultades para mantener medios de vida razonables. La producción total de pescado alcanzó su máximo histórico de 171 millones de toneladas en 2016, de

las que el 88% se utilizaron para el consumo humano directo, gracias a la estabilidad relativa de la producción de la pesca de captura, la reducción del despilfarro y el continuo crecimiento de la acuicultura. Registrando un consumo *per cápita* de 20,3 kg, cifra que resulta su máximo histórico (SOFIA 2018).

En la región Amazónica se generan varias actividades económicas entorno a la acuicultura, esta actividad económica tiene su principal limitación en la disponibilidad de “semillas” (larvas y alevinos de peces). Esto se debe al ciclo de producción de peces, la fase de larvicultura es la etapa más compleja de manejar debido a que la mayoría de las larvas de peces son dependientes en su primera etapa de la disponibilidad de alimento vivo. En este contexto la sostenibilidad de la acuicultura en la región Loreto depende del abastecimiento de alimento vivo importado, resultando el incremento de los costos de producción.

La dependencia del abastecimiento de alimento vivo (rotíferos, nauplios de *Artemia*), como alimentación inicial es el factor más importante en una acuicultura intensiva, en la que los costos de producción contabilizan una fracción significativa de los costos operacionales totales (Akbari et al. 2010). Así, la sustitución total o parcial de los organismos vivos por dietas inertes se vuelve importante para la reducción de costos de producción, así como para mantener la calidad y la producción de larvas. Diferentes estudios están siendo direccionados para el desarrollo de dietas inertes para satisfacer las necesidades nutricionales de las larvas en explotación intensiva, como sustitución de dietas microencapsuladas (Teshima, Ishikawa y Koshio 2000).

Muchos estudios fueron desarrollados para producir micropartículas nutricionalmente eficientes incluido *spray drying* (Gharsallaoui et al. 2007), gelificación iónica (Benavides et al. 2016), coacervación compleja (Da Silva Soares et al. 2019).

La microencapsulación es un proceso de recubrimiento de materiales que pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos con la finalidad de protegerlos contra condiciones adversas del medio, incluyendo pH, oxígeno, luz y temperatura entre otros (Comunian y Favaro-Trindade 2016).

Entre las técnicas de producción de micropartículas, la gelificación iónica es simple y de bajo costo, ocurre cuando un biopolímero en solución es depositada en una solución catiónica con carga opuesta para interactuar formando una red, atrapando sustancia de interés con diferentes formas y tamaños (Kurozawa y Hubinger 2017). Polisacáridos como pectina de bajo contenido de esterificación son utilizados como material cargador, siendo los iones calcio utilizados como agente de complejación (Sriamornsak 1998).

La producción de micropartículas por gelificación iónica utilizando un equipo con potencial electrostático sobre una solución polimérica es aplicado entre un atomizador, que induce una carga eléctrica en la superficie del líquido y la solución iónica. Este equipo representa una alternativa para producir micropartículas con tamaños de baja dispersión cuando comparados con atomizadores sin la utilización de un campo eléctrico (Lascol et al. 2018).

El pH afecta el grado de ionización de los grupos funcionales de biopolímeros, como las cadenas laterales de aminoácidos, grupos aminos y grupos carboxílicos. Particularmente las proteínas son más solubles en pHs bajos (ácidos) o elevados (alcalinos) como consecuencia de cargas de la misma señal. En reciente estudio demostraron que proteínas como la hemoglobina y la papaina con diferentes puntos isoeléctrico pueden separarse efectivamente en sus mezclas binarias ajustando el pH (Saikia et al. 2019).

Por otro lado, la incorporación de ingredientes para formular alimentos destinado a especies acuáticas incluyen: (1) caracterización, (2) digestibilidad, (3) palatabilidad, (4) utilización de nutrientes, a lo que nos referimos como biodisponibilidad, y (5) funcionalidad de ingrediente, que se relaciona a propiedades físicas y químicas (Glencross, Booth y Allan 2007).

La gelatina de piel de doncella es una proteína de alta masa molar obtenida a partir de la hidrólisis parcial del colágeno, derivado de la piel animal, tejido conjuntivo y huesos (Gómez-Guillen et al. 2011).

La pectina es un biopolímero, derivado de las paredes celulares de las plantas, obtenida por extracción acuosa a partir de la cáscara de algunas frutas que ha llamado la atención debido a sus aplicaciones en diferentes áreas. Debido a su estructura la pectina, puede ser utilizada en una variedad de productos

útiles. Pudiendo mezclarse con otros biopolímeros para hacer un material compuesto. Debido a su conformación química y su mecanismo de reticulación, diferentes hidrogeles basados en pectina han sido preparados para diferentes aplicaciones que incluyen farmacéuticas, biomédicas y para el tratamiento de aguas residuales (Thakur et al. 2019).

La pectina es un biopolímero gelificante que se encuentra principalmente en las paredes celulares de las plantas, es una sustancia importante en el inicio del proceso de crecimiento y maduración celular (Abid et al. 2017). Las principales fuentes de pectina son la cáscara de cítricos y de manzana (Soultani et al. 2014). Las pectinas son categorizados como polisacáridos que consisten en la cadena principal de ácido D-galacturónico y residuos, que están esterificados con diferentes proporciones de alcohol metílico o ácido acético en el ácido carboxílico, intercalados por la inserción de unidades de ramnosa y con las cadenas laterales de azúcares neutros unidos a la columna central (Wang et al. 2016).

El presente trabajo de investigación propone producir dietas inertes conteniendo una mezcla de tres aceites (sacha inchi, aguaje y pescado) utilizando la gelificación iónica con posterior recubrimiento con proteínas globulares presentes en la sangre bovino, como alternativa de recubrimiento será utilizada proteína de estructura lineal (gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum*), mimetizando la composición centesimal del alimento vivo (nauplios de *Artemia*). De este modo, las proteínas de sangre bovino y la gelatina se tornan cruciales para la reducción de costos de producción. El secado de las proteínas de sangre bovino será optimizado utilizando metodología de superficie de respuesta con la finalidad de obtener un producto alimenticio con alto valor nutritivo, económico y ambientalmente amigable, por lo que, para llegar a ese objetivo es necesario plantearse dos interrogantes que servirán de base para la ejecución de la investigación.

Dentro de este contexto, una primera hipótesis, fue optimizar el proceso de secado de sangre bovino utilizando la metodología de superficie de respuesta. La segunda hipótesis fue que las proteínas de sangre bovino en solución pueden ser adsorbidas en la superficie de micropartículas de pectina con la finalidad de producir dietas para larvas de peces carnívoros.

Para probar la primera hipótesis de investigación planteada fue utilizado un diseño factorial y la metodología de superficie de respuesta para optimizar el proceso de secado en atomizador *spray dryer* variando la temperatura de entrada y la velocidad de flujo de alimentación al sistema, considerando que influyen en el proceso de secado de proteínas de la sangre bovino, proporcionando un protocolo para otras aplicaciones en investigaciones relacionadas con estas proteínas.

Para probar la segunda hipótesis, micropartículas de pectina fueron producidos por gelificación iónica y recubiertas con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum*. Factores como la concentración de proteína, humedad, ceniza y hierro fueron evaluados.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la optimización del proceso de secado de sangre bovino por metodología de superficie de respuesta y producir dietas para larvas de peces por gelificación iónica con posterior modificación de su estructura por interacción electrostática con proteínas de sangre bovino (estructura globular) y gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum* (estructura lineal).

Siendo los objetivos específicos los siguientes: Optimizar el proceso de secado de sangre bovino por metodología de superficie de respuesta. Caracterizar el polvo de sangre bovino mediante el análisis fisicoquímico (humedad, cenizas, proteínas, grasas, carbohidratos, minerales, valor calórico, hierro). Producir dietas de pectina, recubrir con proteínas (sangre bovino y gelatina de piel de doncella) y caracterizar con relación a: tamaño, materia seca, proteína, lípidos, cenizas y morfología. Evaluar el nivel de hierro y la oxidación de lípidos contenidos en la dieta.

## **CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Antecedentes**

En reciente estudio se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando el diseño de Box-Behnken para optimizar los efectos de cuatro factores: la cantidad de metformina en la fase acuosa interna ( $X_1$ ), pH de la fase acuosa externa ( $X_2$ ), cantidad de alcohol polivinílico como tensioactivo en la fase acuosa externa ( $X_3$ ) y la velocidad de agitación ( $X_4$ ), sobre las variables respuesta: eficiencia de encapsulación, tamaño de micropartícula y potencial zeta (Bouriche et al. 2019). Hoy en día, el enfoque de diseño de experimentos (DE) es una metodología utilizada para planificación y realización de experimentos, donde el efecto de cada factor probado en las respuestas estudiadas es sistemáticamente examinado y documentado (Jacyna, Kordalewska y Markuszewski 2019).

En otro estudio, fue optimizando la extracción de proteína de carne de cabra, utilizando la combinación de metodología de superficie de respuesta y el diseño factorial, optimizando la temperatura, el tiempo de extracción y la concentración de extractor, obteniéndose mayor cantidad de proteína extraída cuando comparado con otros métodos reportados en la literatura. El análisis realizado en cromatografía de alta eficiencia mostró que las condiciones de extracción utilizadas no modificaron significativamente la estructura proteica (Coelho et al. 2019).

La acuicultura consiste en la explotación controlada y económicamente rentable de los recursos ícticos, con la finalidad de producir alimento para el consumo humano y de alguna manera evitar la sobreexplotación de peces en el medio natural (SOFIA 2016).

En la actualidad, la producción acuícola bordea los 73,8 millones de TM, la mitad del consumo humano directo, con un valor estimado de US\$ 160,2 millones, siendo el continente asiático el principal productor a nivel mundial (45,4 millones de TM). A nivel regional, la actividad acuícola es liderada por Chile, Brasil y Ecuador que en conjunto suman el 90 por ciento de la producción de América Latina y alcanzan una producción de 2,1 millones de TM. En el caso

chileno destaca la industria salmonera con cosechas que ya superan el millón de TM por año. Por otro lado, en Brasil y Ecuador existe un importante desarrollo de la industria camaronera. En Perú, la actividad acuícola aún es incipiente en comparación de sus pares sudamericanos y representa, por ejemplo, un pequeño porcentaje de la producción regional (4%) y alcanza la quinta parte de las cosechas de Chile (Regalado 2018). En general, la acuicultura peruana se caracteriza por las prácticas de baja intensidad tecnológica. El uso de alimentos comerciales para especies acuícolas es generalizado, pero artesanal. Los alimentos artesanales se utilizan con frecuencia en ciertas granjas de pequeña escala, observando tendencia en la producción de alimentos artesanales por comerciales (Avadí et al. 2015).

Las microalgas, rotíferos, y especialmente los nauplios de *Artemia*, son comúnmente utilizados para alimentar larvas de peces, aunque sus costos son altos. Las dietas producidas por diferentes métodos han sido estudiadas con el objetivo de reemplazar los alimentos vivos (Holt, Webb y Rust 2011).

Varios trabajos de investigación han desarrollado estrategias de alimentación que sustituyan total o parcialmente la etapa de alimentación de larvas con alimento vivo, mediante la producción de dietas inertes (Rodrigues et al. 2014). Las dietas pueden ser obtenidas por diferentes tecnologías o procesos, que incluye la tecnología de microencapsulación. Sin embargo, diferentes son los factores que deben ser tomados en cuenta durante la formulación, resultando necesarios estudios previos para obtener una dieta adecuada.

Las micropartículas con alto contenido de proteínas pueden usarse como dietas para aproximarse a la composición próxima de nauplios de *Artemia* ( $52.20 \pm 8.8$  proteína,  $18.90 \pm 4.5$  lípidos,  $14.80 \pm 4.8$  carbohidratos  $9.7 \pm 4.6$  cenizas; (Léger et al. 1987). En estudio reciente, fueron producidos micropartículas con contenido de proteínas, lípidos, humedad similar a la de los nauplios de *Artemia*, con valores medios de 50, 23 y 85%, respectivamente, que fueron sometidos a ensayo biológico con larvas de paco (Rodrigues et al. 2014).

Los estudios específicos sobre el desarrollo inicial de peces sudamericanos son escasos y están fragmentados. Una de las especies más estudiadas es el pacu (*Piaractus mesopotamicus*), las investigaciones de

larvicultura se destinan al abastecimiento de juveniles de alta calidad en acuicultura (Portella et al. 2014).

## 1.2 Bases teóricas

### 1.2.1 Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una herramienta efectiva y poderoso método estadístico para optimizar procesos reduciendo el número de pruebas experimentales requeridos (Kurunczi et al. 2008). La metodología implica tres pasos: (1) diseño rotativo compuesto central (DRCC), (2) respuesta modelado de superficie a través de análisis de regresión, y (3) factor de proceso optimización utilizando los modelos de superficie de respuesta.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una herramienta estadística útil para encontrar el mejor conjunto de variables independientes o factores que producen la respuesta óptima. A diferencia de los procedimientos univariados tradicionales, en los que cada variable se estudia por separado, los sistemas multivariados proporcionan más información sobre las variables y sus interacciones, todo para un número limitado de experimentos (Candioti et al. 2014). El diseño Box-Behnken (DBB), un tipo de MSR, es una técnica multivariada de segundo orden basada en un diseño factorial incompleto de tres niveles. Unos tres factores BBD consta de tres bloques de cuatro experimentos, donde una variación de dos factores se analiza con el tercer factor establecido en el punto central (Ferreira et al. 2007).

La metodología de superficie de respuesta se utilizó para determinar las condiciones óptimas para la extracción de proteína de la harina de semillas de pimienta. Un diseño compuesto central rotacional que incluye variables independientes como temperatura (30, 35, 40, 45 y 50°C), pH (7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0), tiempo de extracción (20, 30, 40, 50 y 60 min) y una relación disolvente/harina (10: 1, 15: 1, 20: 1, 25: 1 y 30: 1 v/p). La respuesta seleccionada (variable dependiente) que evalúa el proceso de extracción fue el rendimiento de proteína y el modelo de segundo orden obtenido para el rendimiento de proteína reveló un coeficiente de determinación del 96.7%. El rendimiento de proteína se vio afectado principalmente por el pH y la relación disolvente/harina. El rendimiento máximo se obtuvo cuando la temperatura, el pH, el tiempo de mezcla y la relación disolvente/harina fueron 31°C, 8.8, 20 min, 21: 1 (v/m),



respectivamente. Estas condiciones dieron como resultado un rendimiento proteico de 12.24 g de proteína soluble de extracto/100 g de harina de semilla de pimiento rojo desgrasada. La adecuación del modelo se confirmó extrayendo la proteína en valores óptimos dados por el modelo. Estos resultados ayudan a diseñar el proceso de extracción óptima de proteínas de las semillas de pimiento rojo (Kang, Kim y Moon 2016).

Cuando muchos factores e interacciones afectan las respuestas deseadas, la metodología de superficie de respuesta (MSR) es una herramienta efectiva para optimizar el proceso (Coelho et al. 2019). Su uso proporciona la información relevante en el menor tiempo con el menor número de experimentos. Además de analizar los efectos de las variables independientes, esta metodología experimental genera un modelo matemático que describe los procesos químicos o bioquímicos (Ba y Boyaci 2007).

### 1.2.2 Acuicultura

De acuerdo con la FAO; la acuicultura es el cultivo de peces, moluscos, crustáceos o plantas acuáticas en zonas marítimas y continentales. A nivel mundial, la acuicultura se encuentra entre las actividades productivas de mayor crecimiento durante las últimas décadas y actualmente representa solución para satisfacer la demanda mundial de pescado a largo plazo sin poner en riesgo la sostenibilidad de los recursos acuáticos. A diferencia de la pesca de captura tradicional, esta actividad implica algún grado de intervención en el proceso de reproducción o crianza de manera controlada con el objetivo de aumentar su producción (Regalado 2018).

### 1.2.3 Microencapsulación

La microencapsulación se define como una tecnología por la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica conteniendo una sustancia activa, esta membrana, es constituida de componentes con biopolímeros para crear una red con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas (Parra 2011). Asimismo, a partir de esta técnica es posible alterar las propiedades coloidales y de superficie de materiales, siendo capaz de proporcionar protección a la acción de factores externos y controlar sus características de liberación y biodisponibilidad (Jones y McClements 2011).

Las micropartículas tienen potencial para encapsular, proteger y liberar agentes bioactivos, que incluyen fármacos, suplementos y nutraceuticos. La retención y liberación de los bioactivos encapsulados depende de las características como el tamaño de poro de la micropartícula, interacciones atractiva o repulsiva entre bioactivos y biopolímeros (Ye, Georges y Selomulya 2018).

La microencapsulación es aplicado a muchas áreas del conocimiento, en el área de alimentos se ha utilizado para la protección y suministro de bioactivos. En la encapsulación, los componentes (denominados núcleo o activo) se empaquetan dentro de un material secundario (denominado material de pared o encapsulante) y se liberan en pequeñas cantidades (Sanguansri 2018).

#### 1.2.4 Aplicaciones en la industria alimentaria

Diferentes aplicaciones son utilizadas en la industria alimentaria que incluyen reducción de la reactividad del material de relleno con el ambiente externo, control de la liberación, enmascarar sabores; manipulación del producto y protección con relación a los agentes externos, como humedad, luz, calor y/o oxidación (Zhu 2017). La expansión de la microencapsulación en la industria de alimentos revela el creciente potencial de aplicación para materiales como aceites poliinsaturados, enzimas, microorganismos, vitaminas, sales, aminoácidos, aceites esenciales y colorantes. Entre sus aplicaciones, se refiere a la protección de los compuestos de aroma, que pueden ser perdidos por evaporación, oxidación o interacciones con otros compuestos, y una liberación controlada de éstos (Desai y Park 2005). Los estudios revelan una expansión del mercado de encapsulación en alimentos, impulsado por el cambio de hábitos alimentarios, por la creciente demanda por innovaciones tecnológicas y búsqueda de compuestos bioactivos y funcionales, además de la creciente preocupación por la preservación de los alimentos (Doherty et al. 2011).

Un importante desafío en aplicaciones alimenticias es la identificación de matrices que pueden ser fabricados con materiales de grado alimenticio como proteínas y polisacáridos, utilizando métodos de fabricación económicamente viables, que garanticen que estas micropartículas mantengan su funcionalidad en los productos y el tracto gastrointestinal humano (McClements 2017).

### 1.2.5 Técnicas de microencapsulación

Las técnicas de microencapsulación se llevan a cabo a través de procesos físicos o mecánicos que incluyen la co-cristalización, secado, congelamiento, enfriamiento, extrusión. En los procesos químicos se encuentran la coacervación, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica, atrapamiento en liposomas, inclusión molecular y secado por aspersión, siendo esta la más utilizada en la industria alimentaria (Parra 2011).

Por otro lado, el tamaño medio de la micropartícula requerida, las propiedades físicas del agente encapsulante, la sustancia a encapsular, las aplicaciones del material encapsulado propuesto, el mecanismo de liberación deseado y el costo serán los determinantes para la elección del método de encapsulación (Martin et al. 2009).

#### 1.2.5.1 Gelificación iónica

La gelificación ionotrópica está basada en la capacidad que tienen los polielectrólitos para formar enlaces cruzados en presencia de contraiones formando hidrogeles (Patil et al. 2010).

La bibliografía refiere dos tipos de gelificación iónica: interna y externa. La gelificación iónica interna produce micropartículas en una solución polimérica adicionando sales de calcio insolubles en una solución polimérica conteniendo material a encapsular, con posterior dispersión de esta mezcla en una fase oleosa que contiene surfactante. Para que se pueda llevar a cabo la gelificación, se añade una solución ácida para la reducción del pH, con el propósito de liberar los iones calcio, permitiendo su interacción con los grupos carboxílicos. La gelificación iónica externa es una técnica que consiste en que las gotas de una solución polimérica negativamente cargada son atomizadas en una solución catiónica, normalmente conteniendo calcio (Silva et al. 2006).

La formación de micropartículas gelificadas incluye la formación de gotas, por el proceso atomización, seguida del endurecimiento de esta. En el momento de la formación, las partículas permanecen bajo agitación por un período denominado tiempo de maduración, pues las conexiones cruzadas se desarrollan lenta y progresivamente de la superficie hacia el interior de la micropartícula gelificada (Ahmed 2015). Micropartículas obtenidas por

gelificación iónica presentan propiedades como la cinética de la formación del gel, volumen, estabilidad y porosidad, así como el índice de difusión de solutos dentro o fuera de la matriz polimérica, son influenciadas por la concentración del polisacárido y de los cationes, por la fuerza iónica y el pH (Ouwerx et al. 1998).

Las micropartículas producidas por esta técnica presentan alto grado de porosidad, característica inadecuada para encapsulación de compuestos de bajo peso molecular como compuestos hidrofílicos, resultando indicadas para inmovilización de compuestos mayores como células y enzimas (Patil et al. 2010). En reciente trabajo se ha producido dietas por gelificación iónica. Las larvas suministradas con dietas experimentales tuvieron un crecimiento menor cuando comparadas con nauplio de *Artemia* o con dieta comercial. Todas las dietas evaluadas, incluidas las experimentales, mostraron altas tasas de ingestión (>90%). Cuando fue administrado dietas experimentales se obtuvo bajas tasas de crecimiento probablemente debido a posible insuficiencia nutricional con respecto al bajo contenido de vitaminas y minerales de estas (Rodrigues et al. 2014).

#### 1.2.5.2 Interacción electrostática

La tasa de liberación del material encapsulado se ve influenciado por la alta porosidad de las micropartículas de pectina, hacia este problema se ha sugerido la formación de complejos estables basada especialmente en la interacción electrostática entre los biopolímeros de cargas opuestas, causando la formación de un complejo cubriendo la superficie de la micropartícula (Thu et al. 1996).

Micropartículas recubiertas por interacción electrostática fueron sometidos a simulación gastrointestinal *in vitro*, estas mostraron resistencia física como vehículo para bioactivos, causando interés en el desarrollo de investigaciones en el ámbito farmacéutico y alimenticio (Matalanis, Grif y McClements 2011).

#### 1.2.6 Biopolímeros utilizados como encapsulante

Proteínas y polisacáridos son biopolímeros ampliamente distribuidos en la naturaleza y se encuentran con gran frecuencia en estructuras fundamentales que conforman diferentes organismos vivos. Cuando se encuentran presentes

en una solución pueden ser segregativas o asociativas, siendo un caso específico de las asociativas la coacervación compleja, con diferentes aplicaciones en la industria alimentaria. La naturaleza de la red de moléculas de los biopolímeros en el interior de los hidrogeles juega un papel importante en la determinación de muchos de sus atributos funcionales, incluyendo retención, liberación, protección, reología, estabilidad y propiedades ópticas. Las cadenas de biopolímero pueden estar unidos entre sí por enlaces covalentes o interacciones físicas, como electrostática, puentes de hidrógeno, o fuerzas hidrófobas. La conformación y la organización de las cadenas dentro de la red de biopolímeros, así como el número, la fuerza y la ubicación de los enlaces cruzados entre ellos determinan muchas de sus propiedades, y por lo tanto deben ser entendidas y controlado para crear hidrogeles con atributos funcionales específicos (McClements 2017).

#### 1.2.6.1 Pectina

La pectina es un polisacárido formado por 150 a 500 unidades de ácidos galacturónicos parcialmente esterificados con grupos metoxilícos, unidos por iones glucosídicas  $\alpha$ -1,4 en la cadena molecular. Es un coloide que tiene la capacidad de absorber gran cantidad de agua. Se encuentra en la mayoría de los cítricos (Wang, Dumas y Gharsallaoui 2019).

La pectina puede ser clasificada como de alto o bajo contenido de esterificación, que se define por el porcentaje de ácidos galacturónicos que son metil esterificados (Wang, Dumas y Gharsallaoui 2019). El grado de esterificación puede ser controlado durante el proceso de extracción de la pectina, variando entre 0-75% en el producto final. Los metil ésteres formados ocupan un espacio similar, pero son más hidrofóbicos y consecuentemente tienen un efecto diferente en la estructuración (Cao y Li 2018).

La formación de geles de pectinas de bajo contenido de metoxilación (<50% de grupos metil esterificados) es el resultado de conexiones cruzadas entre los iones divalentes, como el calcio, y los grupos carboxilo del ácido D-galacturónico. Un modelo "caja de huevos" se utiliza para describir la formación de la red de gel con iones de calcio, siendo inducida de la misma forma que los geles de alginato (Braccini y Perez 2001).

La pectina también se clasifica de acuerdo con el grado de amidación, que consiste en el porcentaje de grupos carboxilo del ácido galacturónico que reaccionan con amoníaco. Pectina amidada con bajo contenido de esterificación, forma geles más firmes por la acción de iones calcio, que a la pectina no amidada necesitando, por lo tanto, de una menor concentración de calcio para gelificar (Ovodov 2009).

Las propiedades del gel se ven afectadas por el tipo de pectina (grado de esterificación), arreglo de ésteres metílicos, concentración del polisacárido e ión divalente, método de preparación del gel, además el tiempo de reacción debe ser suficiente para la unión cooperativa de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Braccini y Perez 2001).

Su capacidad de formación de complejos con otros polímeros ocurre en función de su balance de cargas. En pH por encima de 2.9 se encuentra cargada negativamente, en pH por debajo de este valor, no hay disociación del polisacárido, por lo tanto, sin cargas, debido a su valor de pKa de 2.9. La pectina en estado natural o modificada, a través de sus características electrostáticas y capacidad de formación de gel asociada a otros polímeros naturales o sintéticos ha sido estudiada como material para producir micropartículas (Ralet et al. 2001).

#### 1.2.6.2 Proteínas de sangre bovino

La industria alimentaria en los últimos años ha recibido presión global para minimizar el impacto ambiental de sus actividades, consecuentemente mejorar su sostenibilidad. Esto ha llevado a un aumento de interés en la recuperación y utilización de subproductos generados de los procesos de producción (Morone, Falcone y Lopolito 2019). La sangre bovina generada en los mataderos es uno de los materiales subutilizados y se ha identificado como una fuente de moléculas de alto valor para aplicaciones en áreas como la industria alimentaria, biomédica y farmacéutica (Lafarga et al. 2016).

Las aplicaciones de la microencapsulación son múltiples y ha sido ampliamente utilizada para proteger diferentes minerales incluido el hierro de la oxidación formando una membrana impermeable como barrera para difusión de oxígeno, así como enmascarar el sabor indeseable causado por la sal de hierro y para aumentar la biodisponibilidad (Souza et al. 2012).

#### 1.2.6.2.1 Procesamiento de la fracción celular de la sangre

A pesar de su potencial para el uso en la nutrición humana, el color marrón oscuro que la hemoglobina imparte en las formulaciones de alimentos en gran medida restringe su uso como materia prima o ingrediente en la industria alimentaria (Fontes et al. 2004). Con miras a extender el uso de la hemoglobina, varios esfuerzos se han centrado en su decoloración. La mayoría de las técnicas se basan en la transformación de hierro heme ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en hierro no heme ( $\text{Fe}^{3+}$ ), debido a que el hierro no heme tiene un color amarillo brillante que puede ser más adecuado para la inclusión en formulaciones alimenticias. La hemoglobina contiene un grupo de prótesis heme que tiene un átomo de hierro en su centro, que es responsable del color. Tradicionalmente, la preparación de una globina incolora se ha basado en la división de la proteína y restos de pigmento de la hemoglobina. Los disolventes orgánicos como la acetona son los más comúnmente utilizados debido a su eficacia para eliminar el heme; sin embargo, también se han usado etanol, butatona y metiletilcetona (Wismer-Pedersen 1988).

#### 1.2.6.2.2 Funcionalidad de las proteínas de la sangre

La investigación sobre la funcionalidad de las proteínas de la sangre ha sido llevada a cabo desde la década de 1970, y su excelente técnica se ha demostrado que las propiedades se deben a los efectos combinados de los tres principales tipos de proteínas: albúmina sérica, globulinas y fibrinógeno. La sangre total y las proteínas celulares están limitadas para su uso como ingrediente alimenticio debido al sabor desagradable y el color que imparten al producto final. La fracción de plasma tiene características más deseables debido al poco color o sabor que posee, resultando más apropiado para incorporar en los alimentos sin alterar las propiedades sensoriales del producto final. Las principales propiedades funcionales y, por lo tanto, el uso de proteínas plasmáticas como agentes emulsionantes y aglutinantes, gelificación, bajo tratamiento térmico, y como solubilidad, espumado o levadura. Por lo tanto, el uso de proteínas sanguíneas como ingredientes en la formulación de alimentos procesados es una opción para agregar valor para estos productos (Ramos-Clamont et al. 2003).

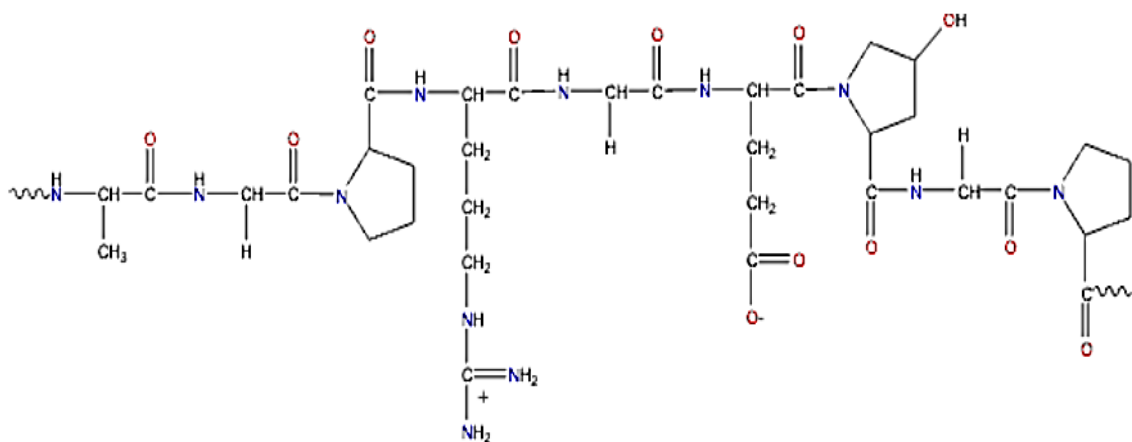
### 1.2.6.3 Gelatina

La gelatina es una proteína obtenida por hidrólisis ácida o alcalina de los tejidos conjuntivos del colágeno de animales, representa el 30% del conjunto proteico de los seres vivos (Hanani 2016). Posee estructura constituida por un conjunto de cadenas polipeptídicas ( $\alpha$ ) helicoidales, que forman una red con uniones triple hélice por puentes de hidrógenos y enlaces hidrofóbicos (Xu et al. 2013). Industrialmente, la gelatina se obtiene a partir de pieles y huesos de cerdo y vacuno, siendo la piel de cerdo la principal fuente de obtención representando el 44% de la gelatina producida a nivel mundial; mientras que sólo alrededor del 1% de la producción procede de especies distintas a la porcina y vacuna (Ahmad y Benjakul 2011). La gelatina se clasifica de acuerdo con su proceso de obtención. Tipo A, extraídos mediante condiciones ácidas cuyo punto isoeléctrico esta entre 7.0 a 9.4. El tipo B, extraídos por hidrólisis en medio alcalino, donde su punto isoeléctrico está entre 4.6 a 5.2 (Xu et al. 2017).

Durante el proceso de extracción, el uso de tiempo prolongados, mejora el rendimiento de la gelatina, sin embargo, dichos tiempos, producirá una gelatina con cadenas cortas, la cual es un indicativo de baja calidad. La gelatina es soluble bajo condiciones de temperaturas mayores de 40°C y en medios ácidos con pH entre 3.0 a 4.0. Pueden presentar cargas positiva o negativa de acuerdo con el pH en que se encuentre, teniendo como referencia su punto isoeléctrico (4.5 a 5.3). Bajo estas condiciones la gelatina puede llegar a formar complejos la cual es ampliamente utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica (Ratanavaraporn et al. 2010).

La producción industrial de gelatina procedente de subproductos de la pesca ha ido incrementando en los últimos años (Gómez-Guillén et al. 2009). Esto responde a la creciente demanda de gelatinas de fuentes distintas a las procedentes de especies terrestres, así como a la gran cantidad de residuos ricos en colágeno generados por la industria pesquera. De estos, los recortes de pieles, espinas y escamas son las principales fuentes de colágeno.





**Figura 1.** Estructura química de la gelatina (Chaplin, 2012).

### 1.2.7 Bioactivos

Numerosos agentes bioactivos utilizados en las industrias farmacéutica y alimenticia requieren ser protegidos con la finalidad mitigar los problemas asociados con la solubilidad en agua, inestabilidad química y / o baja biodisponibilidad oral. Las micropartículas gelificadas están encontrando una utilización creciente para la encapsulación, protección y liberación controlada de Bioactivos lipofílicos. Estas partículas a menudo pueden fabricarse a partir de biopolímeros de grado alimenticio (como proteínas y polisacáridos) utilizando operaciones de procesamiento simples (como la complejación, precipitación antisolvente, homogeneización, inyección, cizallamiento y procesamiento térmico) (Zhang et al. 2015).

En nuestro país el sachá inchi (*Plukenetia volubilis L.*) se encuentra en estado silvestre en diversos lugares de San Martín, Ucayali, Huánuco, Amazonas, Madre de Dios y Loreto. La semilla de sachá inchi está compuesta de fitoesteroides, compuestos fenólicos. Actualmente son de gran importancia los compuestos fenólicos por sus propiedades como antioxidantes y por sus atributos sensoriales que brindan a los alimentos: sabor, color, y por brindar estabilidad por su resistencia a la oxidación lipídica. Asimismo, son excelentes conservadores naturales brindando estabilidad al alimento desplazando a otros conservadores sintéticos (Chirinos et al. 2013).

El aceite de pescado es fuente de ácidos grasos omega-3, ácido eicosapentaenoico (EPA; 20: 5 n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA; 22: 6 n-3).

Los ácidos grasos omega-3 son beneficiosos para la salud, mejoran la función cardíaca, la depresión, la función cognitiva y la sangre, así como disminuyen la presión arterial, mejoran el rendimiento de la resistencia, las respuestas antioxidantes y antiinflamatorias, y la efectividad contra el dolor muscular (Ochi y Tsuchiya 2018).

El aceite de *Mauritia flexuosa* (aguaje) contiene alto contenido de carotenoides fuente importante de sustancias antioxidantes que pueden ser útiles en el desarrollo de nuevos productos para prevenir enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Nobre et al. 2018).

#### 1.2.8 Oxidación lipídica

La oxidación de los lípidos se puede dar por la presencia de oxígeno, luz y temperatura. La oxidación implica la disminución de la calidad de los alimentos, debido a la formación de malos olores y sabor desagradable denominado como rancidez, así mismo genera compuestos tóxicos (radicales libres) siendo muy nocivos para la salud (Tian, Decker y Goddard 2013). La reacción de lípidos con el oxígeno se denomina peroxidación lipídica, y se puede dividir como autooxidación propiamente dicha y la catálisis promovida por lipoxigenasas (Tian, Decker y Goddard 2013).

### 1.3 Definición de términos básicos

#### 1.3.1 Secado por pulverización

El secado por pulverización es una técnica basada en la eliminación rápida de solvente de un sistema, produciendo partículas con varias propiedades que puede ser específicamente diseñado. Debido a la gran cantidad de fármacos poco solubles en agua presentes en el mercado actual, esta técnica genera partículas de fármaco con mejor solubilidad (Davis y Walker 2018).

El secado por pulverización de sustancias alimenticias y farmacéuticas ha recibido la debida atención por investigadores de la ciencia alimentaria y farmacéutica. Durante el proceso se produce la deshidratación de las gotas de solución de proteína en segundos. Finalmente, las partículas secas son transportadas al ciclón u otros dispositivos de recolección y se recoge el polvo. Similar a las soluciones sin proteínas, los parámetros de proceso más importantes en el secado por atomización de proteínas incluyen temperatura de

entrada y salida, flujo de caudal y flujo de aire en la cámara de secado y, el tiempo (Schmitz et al. 2011). Varios métodos de secado se han investigado para obtener proteínas secas en polvos, elegir una técnica adecuada continua siendo un desafío en la industria de alimentos (Emami et al. 2018).

El proceso de secado por pulverización produce tensiones que interrumpen la estructura terciaria, y posteriormente la hélice  $\alpha$  y las láminas  $\beta$  de proteínas nativas transformándose en formas aleatorias desplegadas. Cuando una proteína es desplegada, los sitios hidrofóbicos se exponen y posteriormente interactúan con interfaces y otros polipéptidos desplegados. La proteína desplegada permite la posterior interacción tales como proteína-proteína interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y disulfuro-sulfhidrido. Estas interacciones resultan en agregación, coagulación, y, finalmente en precipitación (Anandharamakrishnan, Rielly y Stapley 2007).



Figura 2 – SD-Basic Laboratory Scale Spray dryer  
Fuente: Manual de secador “*Spray dryer*” SD-BASIC

### 1.3.2 Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie respuesta (MSR) es una técnica estadística utilizada para diseño de experimentos que proporciona información relevante en tiempo corto con bajo costo. El principio básico de MSR es relacionar las propiedades del producto con la ecuación de regresión que describe las interrelaciones entre los parámetros de entrada y las propiedades del producto (Anuonye 2012).

Tradicionalmente la optimización es lograda por el monitoreo de la influencia de un factor a la vez. Sin embargo, utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR), la optimización es realizada simultáneamente y en una manera más precisa obteniendo modelos polinómicos capaces para describir dentro de un rango experimental de prueba de condiciones óptimas que maximicen uso de criterio de respuesta (Almeida et al. 2008).

### 1.3.3 Microencapsulación

La microencapsulación es un proceso mediante el cual las sustancias bioactivas de los alimentos se introducen en una matriz para impedir que se pierdan, para proteger de la reacción de otros compuestos o frenar reacciones de oxidación a causa de la luz u oxígeno (Bakry et al. 2016).

### 1.3.4 Gelificación iónica

La gelificación iónica es una técnica que se considera de bajo costo y no requiere equipo especializado, alta temperatura y disolventes orgánicos. Sin embargo, este método es más adecuado para encapsular materiales hidrofóbicos (Kurozawa y Hubinger 2017).

### 1.3.5 Sangre

La sangre es un líquido generalmente de color rojo, que circula por las arterias y venas del cuerpo del animal y que tiene importantes funciones fisiológicas como distribuir oxígeno y otras sustancias a las células del organismo, así como recoger de éstas los productos de desecho. Se compone de una parte líquida o plasma y de células en suspensión: eritrocitos, leucocitos y plaquetas. La sangre tiene varios usos importantes: consumo humano (alimenticio y farmacéutico), animal e industrial (Lafarga et al. 2015).

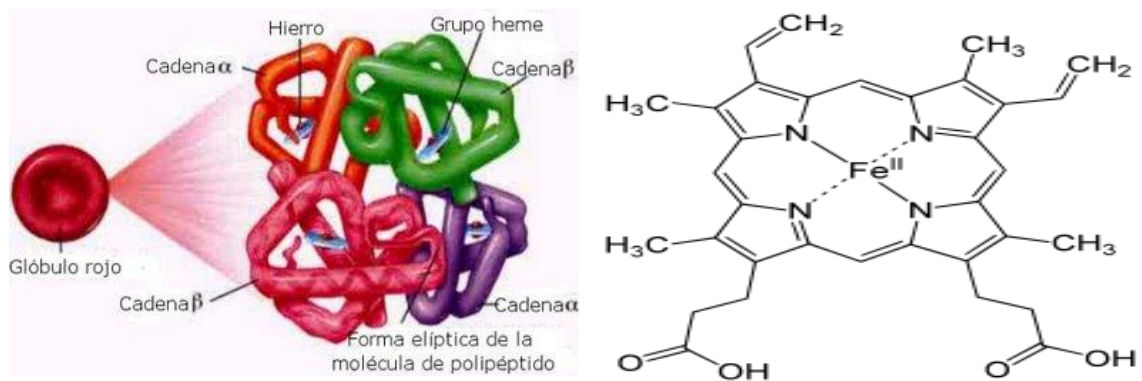


Figura 3. Estructura de la hemoglobina

Fuente: Lafarga et al. (2015).

### 1.3.6 Desnaturalización de proteínas

La desnaturalización de la proteína implica la pérdida de sus estructuras secundarias y terciarias. Esto generalmente ocurre por aplicación de factores externos, como las térmicas, las tensiones interfaciales y relacionadas con la deshidratación son las más importantes que causan desnaturalización de proteínas (Genene et al. 2019).

### 1.3.7 Larvicultura

La larvicultura es una alternativa para mejorar la supervivencia inicial de la larva, en este sistema las larvas se crían en condiciones de laboratorio por un número de días o semanas, alimentados con cantidades adecuadas de alimento vivo de alta calidad, y cuando las larvas alcanzan una etapa de desarrollo avanzado se transfieren al exterior a estanques fertilizados (Portella et al. 2014).

### 1.3.8 Alimento vivo para larvas de peces

Rotíferos y Artemia se utilizan intensamente como el alimento vivo dominante para las etapas larvas de las especies de peces de agua dulce y marina. El suministro inconstante y la ocurrencia de cambios en la composición bioquímica de estos organismos (que varían según el lugar de recolección), a menudo conduce a una nutrición sub-óptima de las larvas (Tesser y Portella 2011).

## CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 2.1 Formulación de la hipótesis

La optimización del proceso de pulverización de sangre bovino mediante la metodología de superficie de respuesta permitió obtener alto nivel proteico de sangre bovino en polvo y los niveles de proteína en solución influenciaron en la cantidad de proteína adsorbida en la superficie de las micropartículas.

### 2.2 Variables y su operacionalización

#### 2.2.1 Variables independientes

##### 2.2.1.1 Estudio para la optimización de secado de sangre bovino

Temperatura de entrada

Velocidad de flujo

##### 2.2.1.2 Estudio para la formulación y obtención de alimento para larvas de peces

Tipo de proteína: Sangre bovino, gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum*.

Niveles de proteína en solución (2, 4, 6 y 8%).

#### 2.2.2 Variables dependientes

##### 2.2.2.1 Estudio para la optimización de secado de sangre bovino

Porcentaje de proteína (%)

##### 2.2.2.2 Estudio para la formulación y obtención de alimento para larvas de peces

Análisis fisicoquímico

Análisis de hierro

Determinación de peróxidos

### 2.2.3 Operacionalización de variables

Variables	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicador	Escala de medición	Categorías	Valores de las categorías	Medio de verificación
<b>Independientes</b>							
Temperatura	Magnitud referida a la noción de calor medible mediante un termómetro	Cuantitativa	°C	Razón	Bajo	130°C	Cuaderno de apuntes
					Medio	152.5°C	
					Alto	165°C	
Velocidad de flujo	Cantidad de fluido que circula a través de una sección del ducto	Cuantitativa	mL/min	Razón	Bajo	3 v/t	Cuaderno de apuntes
					Medio	7 v/t	
					Alto	11 v/t	
Tipo de proteína	Proteínas de fuente animal	Cuantitativa	Análisis fisicoquímico	Razón	Sangre bovino	>17%	Reporte de análisis
					Piel de doncella	>11%	Reporte de análisis
Concentración de la proteína	Cantidad de soluto (proteína) presente en una solución	Cuantitativa	Porcentaje	Intervalo	Bajo	2	Reporte de análisis
					Medio	4 - 6	Reporte de análisis
					Medio	8	Reporte de análisis
<b>Dependientes</b>							
Proteínas de sangre bovino	Moléculas formadas por aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos	Cuantitativa	Análisis fisicoquímico	Razón	Proteína integral de sangre bovino en polvo	>80%	Reporte de análisis
Micropartículas (dietas)	Cantidad de sustancia oxidada por efecto de la temperatura, luz u oxígeno	Cuantitativa	Análisis fisicoquímico	Razón	Proteína	>50%	Reporte de análisis
					Lípido	>20%	
					Humedad	~80%	
					Ceniza	~3%	
					Índice de peróxidos	~1.5mg MDA/kg de muestra	

### **CAPITULO III: METODOLOGÍA**

La recolección de la sangre bovino fue realizada en el Camal Municipal, localizado en el distrito de Punchana de la ciudad de Iquitos. Los análisis y ensayos experimentales fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio de Investigación de Control de Calidad del CIRNA, ubicado en el distrito de San Juan y en el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la planta piloto de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, ubicada en el distrito de Iquitos, provincia de Maynas.

#### **Material y equipos**

##### **Material**

El material encapsulante utilizado fue pectina cítrica de baja masa molar y bajo contenido de metoxilación amidada (lote SK62227, CPKelco, Limeira, SP, Brasil). Para interacción electrostática se utilizó sangre bovino (SB), procedente del camal municipal de Punchana, Iquitos, Perú, aceite *Salmo* (salmón), *Plukenetia volubilis* (sacha inchi) y *Mauritia flexuosa* (aguaje) como material de relleno, cloruro de calcio anhidro (lote: K47117278604, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), ácido clorhídrico (lote: K476888817611, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), ácido sulfúrico (lote: K47246131 545, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), cloroformo (lote: K47769245, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), hidróxido de sodio (lote: K47498778, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), metanol (lote: I821009608, Merck Peruana S.A., Lima, Perú). Agua destilada y los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

##### **Equipos**

- **Agitador magnético** (VELP CIENTIFICA, MOD. ARE, CODIGO: F20500162, ITALIA).  
Descripción: Construida en aleación de aluminio y revestida con una protección espacial. Velocidad: de 50 hasta 1500 rpm, temperatura: 370 °C, Potencia: 630 W, Voltaje: 115 V o 230 V / 50 -60 Hz, Peso: 2,6 kg.
- **Potenciómetro** (IWAUKCE, MOD. CODIGO: F0042163, USA).  
Descripción: Basada en medidor de pH/temperatura microprocesador con autonomía extendida (-2.00-16.00 pH), compensación automática de



temperatura, calibración atómica en 2 puntos y  $\pm$  exactitud de 0.02 pH. El medidor se suministra con soluciones de electrodos de pH y de calibración.

- **Homogenizador Ultra Turrax** (IKA-WERKE, MOD. T25 DIGITAL, CODIGO: 03289027, GERMANY).
- **Balanza Analítica** (OHUAS, MOD. AX324, CODIGO: B734566620, USA).  
Condiciones: controles de ajuste para el medio ambiente: tres filtros y seguimiento de cero. Capacidad: 210 g, sensibilidad: 0.1 mg, calibración: Digital externa, peso neto: 4.5 Kg.
- **Vortex (Mini Shake)** (IKA, MOD. MSI Mini Shaker CODIGO: 05-011148, GERMANY).
- **Destilador de Nitrógeno** (GESSELLSEHA, MOD. GLF, CODIGO: 11993916, GERMANY)
- **Mufla** (NABERTHERM, MOD.MORE THAN HEAT 30-3000°C, CODIGO: 67228077-0015, GERMANY)
- **Centrífuga** (HETTICH MOD. 320R, CODIGO: 0004500-02, HOLANDA)
- **Microscopio Óptico** (ZEISS, MOD. CARL ZEISS, CODIGO: 3150001630, GERMANY).
- **Estufa** (MEMMERT, LOADING MODELS 30-750, CODIGO: E24 899).
- **Baño María** (MARCONI, MOD. MA184, CODIGO: 91510539, ITALY).
- **Congelador** (COLDEX, MOD. CH10P, CODIGO: 01610791102, PERÚ).
- **Refrigeradora (Respirómetro de aluminio)** (Marca MONTERO, MOD. ND, CODIGO: ND).
- **Tamiz** (MOD. TEST SIEVE, CODIGO: 7061974).
- **Secador de Spray para Planta Piloto** (Modelo: SD-Basic Laboratory Scale Spray Dryer, Serie: SDB1117158).

### 3.1 Tipo y diseño de estudio

El presente trabajo fue de tipo experimental, realizado en dos partes: secado de sangre bovino y producción de micropartículas (dietas).

#### 3.1.1 Para el secado de sangre bovino

El diseño del estudio para la optimización de secado de sangre bovino fue conducido a través de la técnica metodológica de superficie de respuesta (MRS), se aplicó para optimizar los parámetros de procesamiento para el secado de sangre bovino. Para la cual fue utilizado un procedimiento Box-Wilson, comúnmente denominado diseño compuesto central rotacional (DCCR), para evaluar la relevancia de dos factores: temperatura de entrada ( $X_1$ ) y velocidad de flujo ( $X_2$ ) sobre la respuesta: proteína integral de sangre bovino en polvo. El DCCR consistirá en 4 experimentos de planeamiento factorial, así como, 4 puntos axiales y 5 repeticiones en los puntos centrales, para ajustarse a un modelo polinomial de segundo orden. Los cálculos indicaron que se requieren 13 experimentos para este procedimiento. Los puntos axiales proporcionaron para estimar la curvatura del modelo. Cuatro réplicas en el centro del diseño serán usadas para estimar la suma de cuadrados de "error puro". Los valores codificados de las variables independientes y el diseño del test esta resumido en la Tabla 1. La ecuación polinomial de segundo orden es:

$$Y_i = a_o + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{12}X_1X_2$$

**Donde:**

$Y_i$  ( $i = 1-2$ ) es la respuesta prevista para el %humedad y %proteínas. El  $a_o$  es la respuesta ajustada en el punto central;  $a_1$  y  $a_2$  son términos lineales;  $a_{12}$  es el efecto de interacción,  $a_{11}$  y  $a_{22}$  son efectos cuadrados.  $X_1$  y  $X_2$  son las variables independientes.

**Tabla 1.** Factores analíticos y niveles para MSR

	-1.41	-1	0	+1	+1.41
X <sub>1</sub> (°C)	130	135.1	147.5	159.9	165
X <sub>2</sub> (mL/min)	3	4.2	7.0	9.8	11

**Tabla 2.** Planeamiento experimental

Orden	Variables		Respuesta
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	%Proteína
1	-1	-1	
2	1	-1	
3	-1	1	
4	1	1	
5	-1.41	0	
6	1.41	0	
7	0	-1.41	
8	0	1.41	
9	0	0	
10	0	0	
11	0	0	
12	0	0	
13	0	0	

### 3.1.2 Para la producción de micropartículas y recubrimiento con proteínas

Las micropartículas fueron producidas por gelificación iónica utilizando pectina (2.5% m/m) y una mezcla de aceites (45% del total de sólidos). El estudio del recubrimiento proteico sobre la superficie de las micropartículas fue abordado mediante el diseño completamente aleatorizado (DCA) con un solo factor, siendo el factor **“Concentración de proteína”** a ser analizada, teniendo cuatro niveles

y cuatro repeticiones, totalizando 16 experimentos. La variable respuesta fue la cantidad de proteína adsorbida.

### 3.2 Diseño muestral

Se consideró como población a los ganados bovinos recepcionados en el Camal Municipal de Punchana, así como los aceites *Plukenetia volubilis* (sacha inchi), *Salmo* (salmón) *Mauritia flexuosa* (aguaje) producidos y comercializados en la localidad. La muestra de sangre fue obtenida de ganado bovino machos y hembras que presentaron condiciones óptimas de sanidad.

### 3.3 Procedimientos de recolección de datos

Las diferencias entre los promedios de las respuestas de la producción y caracterización de micropartículas fueron evaluadas utilizando Análisis de la Varianza (ANOVA) y se encontró diferencias estadísticas entre los tratamientos a un  $P < 0.05$  fue aplicado la prueba Tukey con ayuda del programa estadístico SAS versión 9.0.

#### 3.3.1 Caracterización de materiales

La sangre bovino y las materias fueron analizadas con relación al contenido de proteína, materia seca y cenizas según metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2012) y con relación al contenido de lípidos, según la metodología de (Bligh y Dyer 1959).

##### 3.3.1.1 Determinación de hierro en sangre bovino

El análisis de hierro fue determinado siguiendo la metodología de la Purdue University (Analysis of iron in foods, s.f.), fueron pesados 2.5 g de sangre deshidratada en polvo para incineración en mufla hasta obtener cenizas. Posteriormente, las cenizas fueron homogenizadas con 10 mL de 2 M HCl y 10 mL de agua destilada. En seguida, la mezcla fue filtrada (papel filtro) donde fue adicionado 2.5 mL de 0.1 M de tiocianato de potasio. Esta mezcla fue analizada en espectrofotómetro de UV-Visible para lectura de la absorbancia a longitud de onda de 458 nm. Para determinar la concentración de hierro fue construido una curva patrón de hierro 0.01 M  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , el cual fue preparado en solución de 0.1 M HCl y mezclado con 2.5 mL de 0.1 M de tiocianato de potasio. Las concentraciones (mM/L) del patrón de fierro serán 0.00, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00%, donde fue medida la absorbancia a 458 nm.

### 3.3.1.2 Determinación de proteína

El contenido de proteína fue determinado de acuerdo con la metodología AOCS Ac 4-91 (2002). Se pesó 0.25g de muestra en un balón de digestión. Adicionando 7mL de ácido sulfúrico concentrado, 0.125g de sulfato de cobre y 2.5g de sulfato de sodio, el balón fue colocado en el digestor hasta la aparición de una coloración azul verdoso transparente. Posteriormente, el balón fue enfriado a temperatura ambiente, añadiendo 70mL de agua destilada e hidróxido de sodio al 33%. Seguidamente se procedió a destilar la solución, recepcionando el contenido nitrogenado (50mL) en un matraz Erlenmeyer y que mediante la adición de 7mL de ácido bórico y gotas de azul de metileno como indicador se procedió a titular con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.025N, obteniendo el porcentaje de nitrógeno que mediante un factor de conversión se tendrá el porcentaje de proteína.

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{V \times N \times \text{factor}}{P.M. (g)} \times 100$$

V = Volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizado para titular la muestra

N = Normalidad del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

P.M. = Peso de la muestra

Factor N<sub>2</sub>= 0.014

El porcentaje de proteína se calculó: % Proteína = % nitrógeno x 6.25

Factor para conversión de nitrógeno en proteína (6.25 para proteínas de sangre bovino y 5.55 para gelatina).

### 3.3.2 Determinación de lípidos

Se realizó de acuerdo con la metodología de Bligh & Dyer (1959), fue pesado 5g de muestra (micropartículas) en tubo de vidrio con capacidad 70mL. Seguidamente se adicionó 10mL de cloroformo, 20mL de metanol y 8 mL de agua, siendo agitado por 30 min para solubilizar de manera homogénea la muestra. Posteriormente, se adicionado 10mL de cloroformo y 10mL de sulfato de sodio al 1.5%, agitándolo vigorosamente por 2 min. Los tubos conteniendo la solución y muestra fue centrifugado a 1000 rpm por 2 min para promover separación de fases. Fue retirada la fase metanólica quedando la fase

clorofórmica para filtrar. Finalmente, con la ayuda de una pipeta volumétrica fue separado 5mL de la fase clorofórmica y depositada en un vaso precipitado de 10 mL previamente secado. Se dejó volatizar el solvente en una estufa a 100 °C por 2 horas.

$$\% \text{ lipidos totales} = \frac{\text{P.L ( g )} \times 4 \times 100}{\text{P.M ( g )}}$$

P.L.: Peso de lípidos

P.M.: peso de la muestra

### 3.3.3 Secado de la sangre bovino

El secado de sangre bovino por pulverización fue realizado en equipo *Spray Dryer*, marca LabPlant, modelo SD-BASIC (Hunmanby Filey, North Yorkshire, Reino Unido), con aguja de 1.0 mm de diámetro, flujo de aire de 73 mm.m<sup>3</sup>/h, 0.6 bar de presión de aire y 12 g/min de flujo de masa que se determinó en pruebas preliminares, siendo el flujo máximo donde no se produjo goteo de la muestra en la cámara de atomización. Este equipo está disponible en el Laboratorio de Ingeniería de la Facultad de Industrias Alimentarias.

La recolección de sangre bovino provino de aquellos animales que fueron sometidos a inspección veterinaria antes de ser sacrificados para que sean aptos para el consumo humano. Para la recolección de sangre se limpió la superficie del animal donde se realizó el recojo para evitar el contacto de la vasija recolectora con la piel del animal. Para impedir la coagulación de la sangre se utilizó EDTA en la proporción de 3 g por litro de sangre mezclándola por 2 minutos para mantener la sangre en estado líquido.

Posteriormente, los envases conteniendo la sangre bovino fueron trasladados a las instalaciones de la Planta Piloto de la Facultad de Industrias Alimentarias, para deshidratación en el pulverizador (*Spray dryer*) de acuerdo a los siguientes parámetros: temperatura de entrada 130-165 °C y temperatura de salida 90°C a presión de 1 atmosfera por 40 minutos, de esta manera se obtuvo sangre bovino en polvo, además el tratamiento térmico asegura la estabilidad microbiológica convirtiéndole el insumo apto para consumo humano. Finalmente, se realizaron las determinaciones proximales y contenido de hierro.

## Proceso de obtención de sangre bovino en polvo

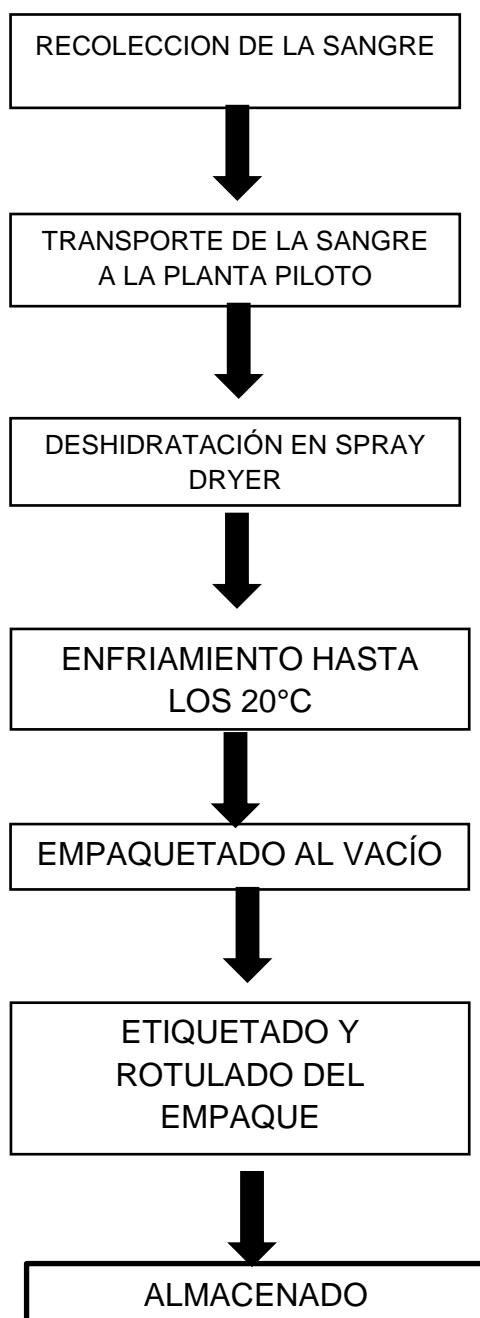


Figura 4. Flujograma de obtención de sangre bovino en polvo

### 3.3.4 Caracterización de la sangre bovino en polvo

La sangre bovino en polvo fue caracterizado con relación al contenido de proteína, materia seca y cenizas según metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2012) y con relación al contenido de lípidos, según la metodología de Bligh y Dyer (1959).

### 3.3.5 Producción de micropartículas para alimentación de larvas de peces

Las micropartículas fueron producidas por gelificación iónica, utilizando emulsión de pectina (2.5% m/m), conteniendo aceite (*Plukenetia volubilis*, *Salmo*, *Mauritia flexuosa* 2.0625% m/m), a temperatura ambiente utilizando homogeneizador Ultra Turrax a 18000 rpm durante 5 minutos. La emulsión fue atomizada sobre una solución de cloruro de calcio (2.5% m/m) con pH ajustado para 4.0 utilizando un atomizador de doble flujo con orificio de 1.0 mm de diámetro, variando la altura de 12 cm entre el atomizador y la solución de cloruro de calcio, presión de aire de 0.250 kgf/cm<sup>2</sup> y velocidad de atomización de 555 mL/hora. Durante la atomización, la emulsión permaneció en agitación constante a temperatura ambiente. Las dietas atomizadas fueron agitadas en solución de cloruro de calcio por 30 minutos. Posteriormente, las dietas fueron separadas y lavados en tamiz de malla de acero ( $\Phi$  75  $\mu$ m) con agua destilada (pH 4.0). Fueron realizadas tres producciones independientes de dietas. Una fracción de las dietas húmedas fue congelada y liofilizada. Las micropartículas secas fueron acondicionadas en frascos con tapa y almacenadas en refrigeración.

### 3.3.6 Caracterización de micropartículas obtenidas por gelificación iónica

Las micropartículas fueron caracterizadas con relación al contenido de proteína, humedad y cenizas según metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2012) y en relación al contenido de lípidos, según Bligh & Dyer (1959).

#### 3.3.6.1 Tamaño medio de las micropartículas

Las determinaciones del tamaño medio de las micropartículas fueron realizadas por microscopía óptica utilizando microscopio óptico (ZEISS – Primo Start) con captación de imágenes a través de cámara digital controlada por el ZEN. Las imágenes digitalizadas de 300 micropartículas por muestra fueron evaluadas con auxilio del programa Microcal Origin pro 9.1 (Microcal Software, Inc., MA, USA).

#### 3.3.6.2 Morfología y microestructura de las micropartículas

La observación de la morfología y microestructura de las dietas húmedas y liofilizadas fueron realizadas por microscopía óptica (MO) y por microscopía electrónica de barrido (MEB), respectivamente.



### 3.3.6.3 Determinación de humedad en micropartículas

La humedad en micropartículas gelificadas fueron determinadas por eliminación de agua utilizando estufa a 105°C por 6 horas, de acuerdo a la metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2012).

### 3.3.6.4 Análisis de ceniza

La determinación de la ceniza fue determinada según la metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2012). Se pesó 5 g de muestra y colocados en crisoles de porcelana previamente tarados para realizar incineración en mufla a temperatura de 550°C durante 5 horas. Pasado el período de tiempo, los crisoles fueron colocados en una campana de desecación para enfriamiento, posteriormente fueron pesados para cuantificar.

### 3.3.6.5 Determinación de proteína

El contenido de proteína contenida en las micropartículas gelificadas y recubiertas fue determinado de acuerdo con el método KJELDAHL (AOAC, 2012), se utilizó 6.25 y 5.55 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.

### 3.3.6.6 Eficiencia de encapsulación

Para la determinación del aceite total en micropartículas fue realizado de acuerdo al procedimiento siguiente: Adicionar una solución de citrato de sodio en la concentración de 3% (m/m) a 5 g de micropartículas húmedas, para liberación del aceite. Después de esta etapa, la cuantificación del aceite fue realizada según la metodología de Bligh y Dyer (1959). La eficiencia de encapsulación fue determinada por la relación:

$$EE(\%) = \frac{\text{Aceite total en las micropartículas (g) / sólidos totales (g)}}{\text{Aceite inicial (g) / sólidos totales (g)}} \times 100$$

### 3.3.6.7 Recubrimiento de las micropartículas con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de doncella por interacción electrostática

El recubrimiento de las dietas húmedas obtenidas en el ítem 3.3.5, fue realizado adicionando 50 g de micropartículas para 200 mL de solución acuosa de proteínas (sangre bovino o gelatina de piel de doncella) ajustado a pH 4.0.

Fueron utilizadas concentraciones optimizadas para las soluciones proteicas. Las micropartículas se mantuvieron en las soluciones conteniendo proteína durante 30 minutos, en agitación constante (400 rpm) a temperatura ambiente (Cuando las micropartículas fueron recubiertas con gelatina de piel de doncella la temperatura utilizada fue de 50°C). Las micropartículas fueron posteriormente lavadas en tamices de mallas de acero ( $\Phi$  75  $\mu$ m) con agua destilada (pH 4.0) para remover la proteína que no fue adsorbida en la superficie de las micropartículas. Fueron realizadas tres producciones independientes para cada tipo de micropartículas. Las micropartículas fueron analizadas en triplicado con relación a su contenido de hierro, lípidos y proteína.

### 3.3.6.8 Secado de las micropartículas

El secado de las micropartículas gelificadas fue realizado en un Liofilizador LABCONCO FreeZone 12 plus. Las condiciones de secado fueron: Temperatura inicial: -40 °C, Temperatura final: 25°C/2 horas, tiempo total del ciclo de secado: 48 horas y Presión: 0.125 minibar.

### 3.3.6.9 Tiempo de vida útil de las micropartículas (producción de peróxidos)

La estabilidad oxidativa fue realizado espectrofotométricamente de acuerdo como indica el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), descritas por Sorensen y Jorgensen (1996) y Vyncke (1970). Seguidamente se pesó 5 gramos de muestra triturada en tubos con tapa rosca, al cual se le adicionó 15 ml de solución TCA y se agitó en vortex a 3500 rpm/45 segundos; luego se filtró la muestra homogenizada en un erlenmeyer, a partir del cual se pipeteó 5 ml del filtrado en un tubo de 30 ml con tapa rosca, donde se adicionó 5 ml de solución TBA y se agitó la mezcla en vortex.

Para el blanco se pipeteo 5 ml de TCA y 5 ml de TBA. Todos los tubos fueron llevados a baño maría a 100°C/40 minutos, después de ello se removió en el vortex las bolas de aire formadas anteriormente. Finalmente se realizó la lectura a 532 nm. Los cálculos se realizaron utilizando la siguiente ecuación y el N° de TBARS se expresó como mg MDA/kg de muestra.

$$N^{\circ}TBARS = \frac{(A_m - A_b) \times V_f \times V_a \times M \times 1000}{\epsilon \times l \times m}$$

$A_m$  = Absorbancia de la muestra

$A_b$  = Absorbancia del blanco

$V_f$  = Volumen del filtrado (mL)

$V_a$  = Volumen de alícuota (2 mL)

$M$  = Molécula gramo del MDA (72 g/mol)

$\varepsilon$  = Coeficiente ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$l$  = Camino óptico (1 cm)

$m$  = Peso de la muestra (g)

### 3.4 Procesamiento y análisis de los datos

Para los diseños experimentales, se realizó análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar las posibles variaciones y las interacciones entre los factores. Para las diferencias entre los promedios fue realizado el test de comparación múltiple (Tukey) con auxilio del programa SAS, en nivel de 5% de significancia.

### 3.5 Aspectos éticos

La información recolectada y generada en el presente trabajo de investigación se obtuvo directamente de fuentes científicas, siendo procesadas de manera responsable, seria y honesta con el objetivo de salvaguardar la integridad y confiabilidad de la misma.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Composición centesimal de sangre bovino

La sangre bovino fue obtenida en su forma natural en el camal municipal del distrito de Punchana, considerando aspectos asépticos, para mantener su condición líquida fue utilizado EDTA como anticoagulante en una concentración de 1.5% por litro de sangre. La sangre bovino contiene principalmente cuatro proteínas que incluye la hemoglobina, que es portadora de oxígeno en el sistema vascular, regula el pH y el transporte del dióxido de carbono de la sangre, tanto directa como indirectamente. Los resultados de la caracterización de la sangre bovino en este estudio son mostrados en la Tabla 3, destacamos principalmente el alto contenido proteico en su estado natural (18.40%).

Tabla 3. Composición centesimal de sangre bovino

Material	Composición centesimal (%)			
	Agua	Proteína	Lípido	Carbohidrato(*)
Sangre bovino	81.18±1.35	18.40±0.82	0.35±0.09	0.07

Promedio ± desvío estadístico (n=3); (\*) por diferencia

### 4.2 Composición centesimal de biopolímeros

Los resultados de la caracterización de los materiales utilizados en este estudio se muestran en la Tabla 4, destacamos principalmente el alto contenido proteico de la sangre bovino en polvo (87.35%). De modo similar Lynch et al. (2017), encontraron valores próximos de proteínas presentes en sangre bovino, las proteínas cuya fuente es la sangre de bovino tiene alto potencial biológico para consumo tanto humano y animal. En reciente investigación de Tarte (2011), indicó que las características técnicas y funcionales de la sangre bovino puede ser debido al efecto combinado de las siguientes proteínas: albúmina sérica, globulinas y fibrinógeno. Asimismo, indica que la sangre integral y sus proteínas están limitadas para su uso como ingrediente alimenticio debido al sabor y color intenso que transfieren al producto final. No obstante, Walter et al. (1993), reportaron que la sangre bovino es una fuente de hierro de alta biodisponibilidad cuando comparado con el hierro no heme por lo cual es necesario que se desarrollen nuevas aplicaciones, para que su consumo tenga alta aceptabilidad. La Tabla 4 muestra alto contenido de ceniza (4.98±0.27), este resultado es probablemente a la cantidad de hierro presente en las moléculas de proteína.

La pectina, es un polisacárido lineal obtenido de la extracción del albedo de cítricos y pulpa de manzana, considerado como material para ser utilizado como agente encapsulante, degradable por la microbiota, facilitando la liberación controlada de compuestos encapsulados. Su clasificación obedece al grado de metoxilación (grupos metilo esterificados al grupo carboxílico) y es utilizado por la industria alimentaria debido a su actividad gelificante (Fathi, Martín y McClements 2014). El contenido de nitrógeno no proteico de la pectina fue determinado con la finalidad de disminuir el valor de proteína determinado en las micropartículas recubiertas.

Tabla 4. Composición centesimal de los biopolímeros

Material	Composición centesimal en base húmeda (%)			
	Agua	Proteína	Lípido	Ceniza
Sangre bovino (*)	6.95± 0.59	87.35±1.33	0.57±0.19	4.98±0.27
Gelatina (**)	12.49± 0.42	86.88±1.23	0.29 ± 0.02	0.34± 0.03
Pectina citrica	12.67 ± 1.53	1.04 ± 0.05	.....	2.66 ± 0.57

Promedio ± desvío estadístico (n=3)

(\*) Sangre bovino en polvo

(\*\*) Gelatina de piel de doncella

#### 4.3 Secado de sangre bovino utilizando *Spray dryer*

Los ensayos experimentales de secado de sangre bovino fueron realizados siguiendo un diseño experimental utilizando como variables independientes la temperatura de entrada al atomizador y la velocidad de flujo. Un diseño compuesto central incluyendo 4 factoriales, 4 experimentos en condiciones axiales y 5 puntos centrales de repeticiones, totalizando 13 experimentos. La Tabla 5, muestra los experimentos, para estudiar los efectos de la temperatura del aire de entrada del secador (130–165 °C) y la presión ejercida por la bomba en las propiedades del polvo. Las variables de respuesta, consideradas fueron la proteína, humedad, lípido y ceniza. La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) utilizando el modelo Box-Behnken y el programa Statistica Software Versión 6.0, se determinó la superficie de respuesta del rendimiento de proteína entre esas dos variables. Fue realizado el ANOVA para la evaluación de las posibles interacciones entre los factores y se determinaron los valores óptimos de los factores por el análisis de superficie de respuesta que maximicen el secado.

Se utilizaron varios métodos de secado para convertir soluciones de proteínas en forma de polvo seco. La mayoría de los métodos de secado implican eliminación del solvente por sublimación como liofilización o evaporación tal como secado por pulverización y lecho fluidizado secado o precipitación como la tecnología de fluidos supercríticos. Entre estos métodos, el secado por pulverización y la liofilización son los métodos industriales de secado más utilizados de soluciones proteicas (Abdul-Fattah, Kalonia y Pikal 2006). El secado por pulverización es el proceso industrial más utilizado, en la que una sustancia líquida se transforma en materia seca. Las proteínas secadas por pulverización se almacenan, transportan y se reconstituyen con mayor facilidad (Ameri y Maa 2006).

Tabla 5. Datos del diseño experimental para secado de sangre bovino con variación de temperatura (°C) y velocidad de flujo (mL/min)

N°	T (°C)	V (mL/min)	PTN (%)
1	135.1 (-1)	4.2 (-1)	84.13±0.34 <sup>c</sup>
2	135.1 (-1)	9.8 (1)	83.54±0.12 <sup>c</sup>
3	159.9 (1)	4.2(-1)	83.96±0.14 <sup>c</sup>
4	159.9 (1)	9.8(1)	82.26±0.14 <sup>d</sup>
5	130 (-1.41)	7 (0)	87.79±0.14 <sup>a</sup>
6	165 (1.41)	7 (0)	83.54±0.22 <sup>c</sup>
7	147.5(0)	3(-1.41)	82.42±0.47 <sup>d</sup>
8	147.5(0)	11(1.41)	82.05±0.37 <sup>d</sup>
9	147.5(0)	7(0)	87.59±0.18 <sup>ab</sup>
10	147.5(0)	7(0)	86.96±0.01 <sup>b</sup>
11	147.5(0)	7(0)	87.12±0.21 <sup>ab</sup>
12	147.5(0)	7(0)	86.64±0.29 <sup>b</sup>
13	147.5(0)	7(0)	87.14±0.09 <sup>ab</sup>

Las variables independientes corresponden a los valores reales. Los valores entre paréntesis corresponden a los valores codificados. T: temperatura del aire de entrada (°C); V: velocidad de flujo (mL/min); PTN: proteína (%) representan valores de tres determinaciones. El promedio seguido de letras diferentes en superíndice en la misma columna difiere de acuerdo a la prueba Tukey (p<0.05).

#### 4.4 Selección del modelo apropiado para el contenido de proteína

Como lo mostrado en la Tabla 5, los %proteínas en la muestra de sangre bovino la cual fue sometida a diferentes condiciones de temperatura (T) y velocidad de flujo (mL/min). Utilizando Statistica 12 y con los datos de la Tabla 5, se encontró los valores de R<sup>2</sup> y, suma de cuadrados del error que permitieron

elegir el modelo adecuado para predecir los %proteínas para secado de sangre bovino.

Los modelos estudiados fueron: 1) sólo términos lineales de los efectos principales; 2) términos lineales y cuadráticos de los efectos principales; 3) términos lineales de los efectos principales y las interacciones de segundo orden; 4) términos lineales y cuadráticos de los efectos principales y las interacciones de segundo orden. Determinamos que el modelo que correlaciona mejor los datos experimentales de concentración de %proteínas fue el modelo de segundo orden “Modelos de términos lineales y cuadráticos de los efectos principales y las interacciones de segundo orden”.

Tabla 6. Análisis de los modelos de análisis de DCCR para el porcentaje de proteínas para secado de sangre bovino.

	Modelos de análisis del DCCR			
	1	2	3	4
R <sup>2</sup>	0.13454	0.92844	0.13976	0.93365
Suma de Cuadrados del Error	51.11758	4.22667	50.80955	3.91865

Fuente: Statistica 12

El elevado valor de coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) del modelo seleccionado para predecir los %proteínas para secado de sangre bovino (R<sup>2</sup>=0.93365), permite interpretar los resultados mediante gráficos de superficie de respuesta (Figura 5) y contorno (Figura 6). Donde la región de color rojo representa la combinación de temperatura (°C) y velocidad de flujo (mL/min) para obtener el mayor %proteínas en el secado de sangre bovino por *Spray dryer*.

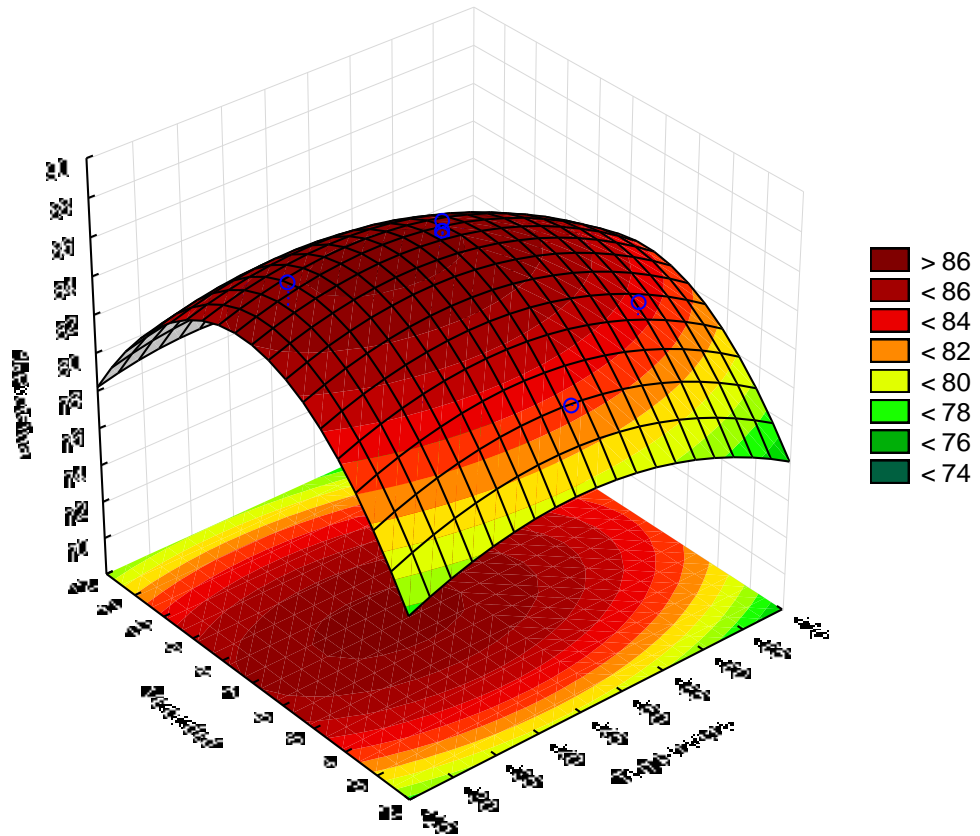


Figura 5. Superficie de respuesta de %proteína en el secado de sangre bovino por *Spray dryer*

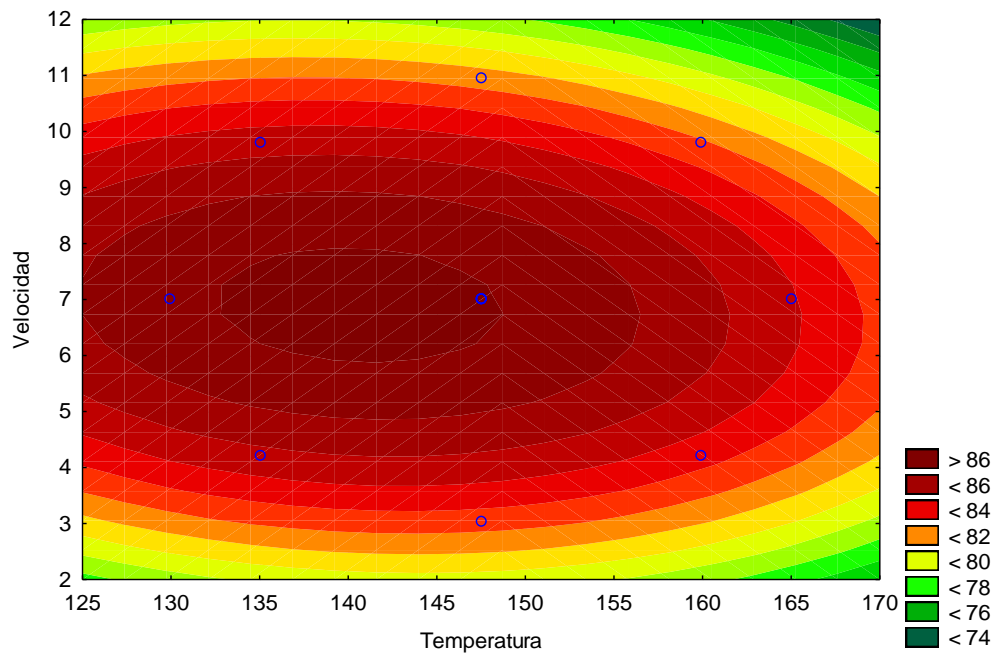


Figura 6. Gráfico de contorno del % proteína en el secado de sangre bovino por *Spray dryer*



El buen ajuste de los datos experimentales con los predichos, se puede corroborar en la Figura 7, donde los datos experimentales son los puntos de color azul y los valores predichos se encuentran en la línea de color rojo. Por lo tanto, se puede apreciar que los valores experimentales no están tan dispersos de los predichos.

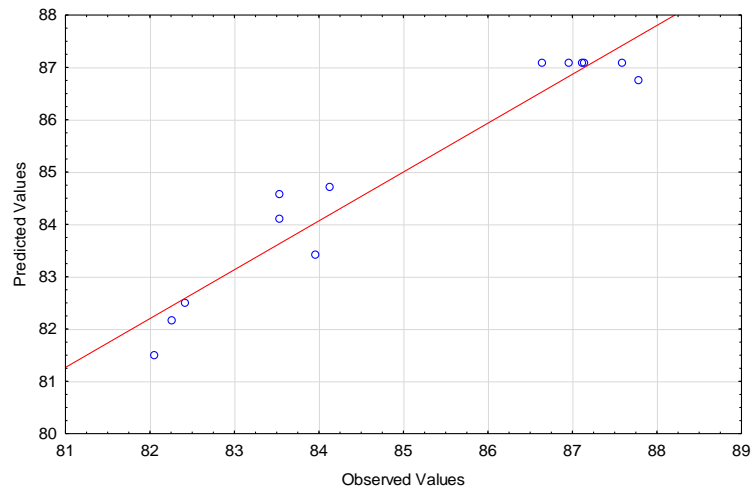


Figura 7. Valores observados vs Valores predichos del porcentaje de proteína en el secado de sangre bovino por *Spray dryer*

Realizando el análisis de la varianza para la variable %proteínas y aplicando el modelo seleccionado (Tabla 6), se obtuvo que los efectos principales: Velocidad cuadrática, Temperatura Lineal y Temperatura cuadrática fueron significativos ( $p \leq 0.05$ ), esto se puede constatar en el diagrama de Pareto, el cual se muestra en la Figura 8. Donde observamos que la temperatura y la velocidad de flujo de secado influyen significativamente el proceso.

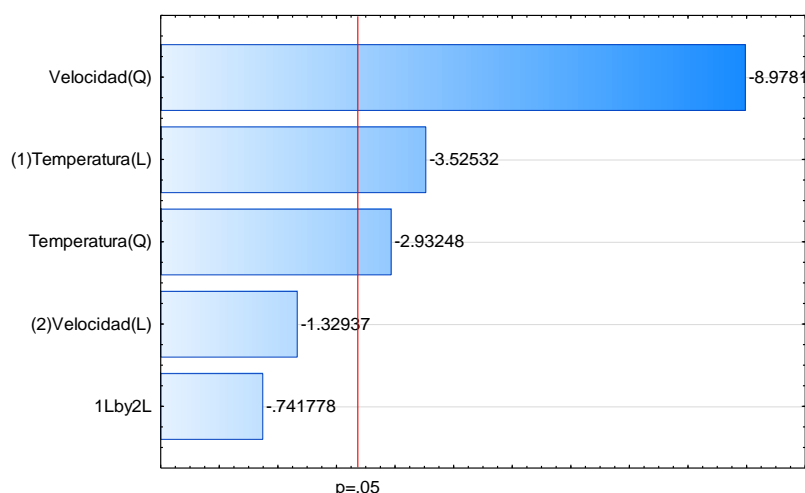


Figura 8. Diagrama de Pareto de las variables

Tabla 7. Análisis de la varianza para la variable del porcentaje de proteínas en el secado de sangre bovino por *Spray dryer*.

ANOVA; Var.:%Proteína; R-sqr=.93365; Adj:.88626 (Spreadsheet1)					
2 factors, 1 Blocks, 13 Runs; MS Residual=.559807					
DV: %Proteína					
	SS	df	MS	F	P
(1)Temperatura(L)	6.95721	1	6.95721	12.42787	0.009658
Temperatura(Q)	4.81402	1	4.81402	8.59944	0.021947
(2)Velocidad(L)	0.98930	1	0.98930	1.76722	0.225413
Velocidad(Q)	45.12398	1	45.12398	80.60632	0.000043
1L by 2L	0.30802	1	0.30802	0.55023	0.482362
Error	3.91865	7	0.55981		
Total SS	59.06409	12			

Fuente: Statistica 12

#### 4.5 Optimización de la temperatura y velocidad de flujo sobre porcentaje de proteínas

Para determinar los valores óptimos de temperatura y velocidad de flujo se procedió a transformar la variable respuesta en una variable llamada “deseable”, para lo cual, se requieren determinar cuál es la combinación de temperatura y velocidad de flujo para obtener el máximo %proteínas en el secado de sangre bovino por *Spray dryer*. Como se puede apreciar en la Figura 9 de superficie de respuesta y gráfico de contorno, donde el máximo valor se encuentra localizado en la región de color rojo, la cual pertenece a la combinación de temperatura (~135 – 150 °C) y velocidad de flujo (6 – 8 mL/min), que representan los valores óptimos.

Tabla 8. Coeficiente de variación para predecir el %proteínas en el secado de sangre bovino por *Spray dryer*.

Regr. Coefficients; Var.:%Proteina; R-sqr=.93365; Adj:.88626 (Spreadsheet1) 2 factors, 1 Blocks, 13 Runs; MS Residual=.559807 DV: %Proteina						
	Regressn. Coeff.	Std. Err.	T(7)	P	-95.% cnf. Limt	+95.% cnf. Limt
Mean/Interc.	-42.8143	41.83899	-1.02331	0.340218	-141.748	56.11920
(1)Temperatura(L)	1.5768	0.54987	2.86751	0.024078	0.277	2.87699
Temperatura(Q)	-0.0054	0.00184	-2.93248	0.021947	-0.010	-0.00105
(2)Velocidad(L)	5.6013	1.67074	3.35259	0.012207	1.651	9.55196
Velocidad(Q)	-0.3249	0.03618	-8.97810	0.000043	-0.410	-0.23930
1L by 2L	-0.0080	0.01077	-0.74178	0.482362	-0.033	0.01749

Fuente: Statistica 12

La ecuación matemática que puede predecir el %proteínas para cualquier combinación de tiempo y velocidad de flujo se muestra a seguir: %proteína = -42.81 + 1.57 (Temp) - 0.005\*(Temp)<sup>2</sup> + 5.60(Veloc) - 0.32\*(Veloc)<sup>2</sup> - 0.008(Temp \* Veloc). Los cuales son los coeficientes de regresión según el modelo seleccionado.

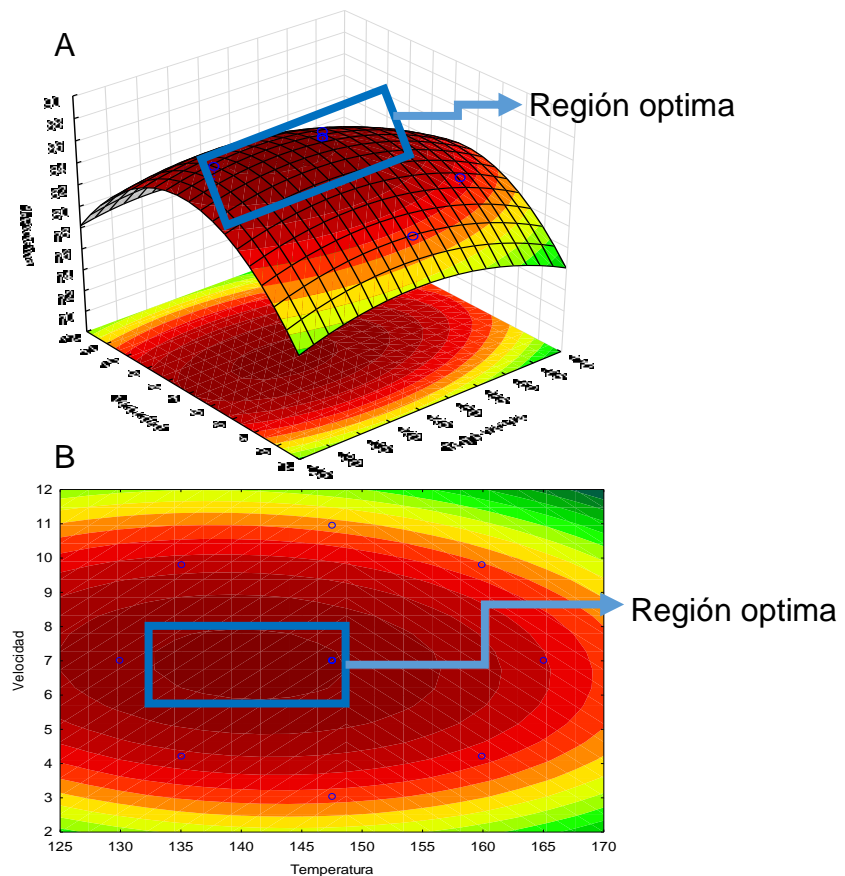


Figura 9. A. Superficie de respuesta del valor deseable del %proteína en el secado de sangre bovino por *Spray dryer*. B. Gráfico de contorno del valor deseable del %proteína en el secado de sangre bovino por *Spray dryer*.

El acelerado crecimiento y desarrollo de la ciencia y la tecnología, ha intensificado el impacto y la importancia de las proteínas en varios sectores, como en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. La proteína es uno de los nutrientes esenciales en la dieta humana, su importancia radica como el principal componente estructural de los músculos y otros tejidos del cuerpo, debido a la importancia manifestada en el presente estudio la aplicación de diseños experimentales combinado con la metodología de superficie de respuesta contribuyó a maximizar la eficiencia en la preparación de muestras, y durante la optimización se tuvieron en cuenta las variables y sus posibles interacciones. El objetivo de esta estrategia nos permitió obtener la máxima información con un pequeño número de ensayos experimentales, en tiempo corto y eso puede proporcionar una reducción del uso de materia prima. En trabajo reciente de Coelho et al. (2019), optimizaron la extracción de proteína obteniendo mayor contenido proteico (19.3 g / 100 g) cuando comparado con resultados reportados en la literatura.

En reciente trabajo de Ikrang y Umani (2019) optimizaron las condiciones del proceso durante el secado de bagre en horno. El contenido de humedad se investigó cuantitativamente durante el proceso de secado de trozos de bagre utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR) para obtener el contenido mínimo de humedad. Las variables independientes para el proceso de secado fueron temperatura (50–70 °C), espesor del producto (10–20 mm), concentración de sal (0–20%) y tiempo de secado (480–600 min.). Se desarrolló un modelo de regresión de interacción factorial, que describe los efectos de las variables independientes del proceso de secado sobre el contenido de humedad. Los efectos de la temperatura y el tiempo de secado fueron más pronunciados para el contenido de humedad que el espesor y la concentración de sal. Se encontró que las condiciones óptimas de temperatura fueron ~ 63.43 °C, espesor del producto ~ 14.81 mm, concentración de sal ~ 9.07% y tiempo de secado ~ 600 min. En estas condiciones óptimas, se encontró que el contenido de humedad fue 2.64% en base seca.

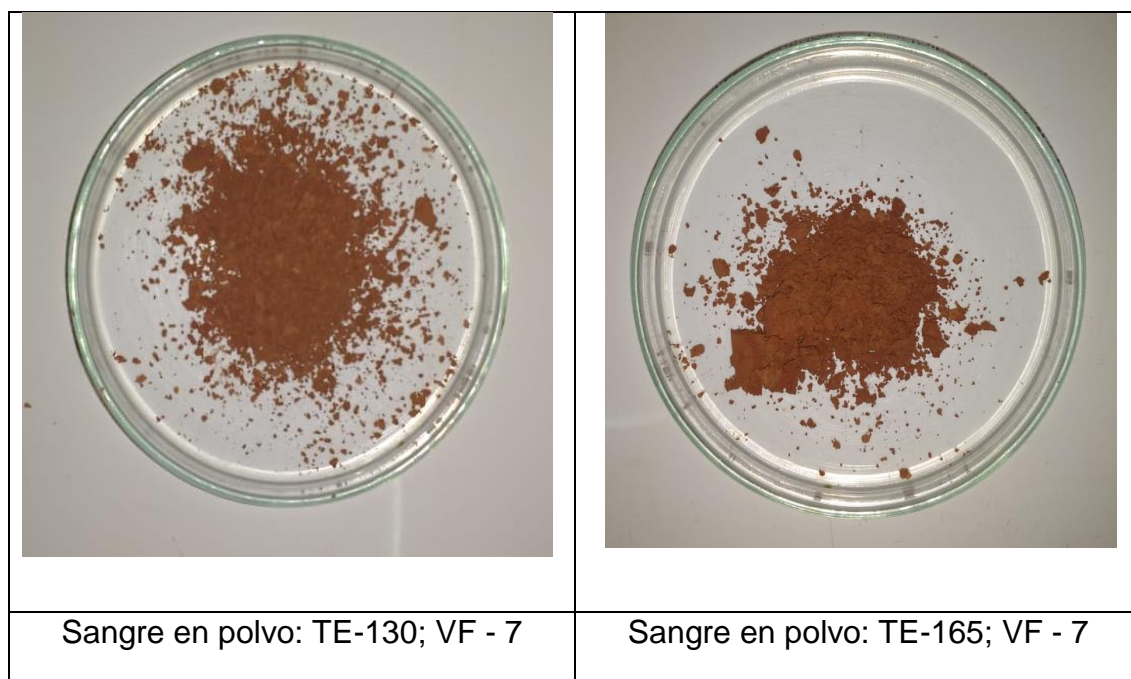


Figura 10. Foto de sangre en polvo seco, obtenido en secador *Spray dryer*

La Figura 10, muestra las imágenes de la sangre bovino en polvo obtenido en *Spray Dryer*, cuando fue utilizada la menor temperatura de entrada (130°C) y la mayor temperatura (165°C), la observación visual evidencia mayor intensidad de color marrón cuando fue utilizado temperatura de 165°C, indicando que a mayor temperatura los aminoácidos de las proteínas reaccionan al proceso de caramelización.

#### 4.6 Producción de micropartículas por gelificación iónica

En esta investigación, se utilizó pectina para producir micropartículas conteniendo una mezcla de aceites utilizando la gelificación iónica de acuerdo a lo descrito por Menin *et al.* (2018), las referidas micropartículas posteriormente fueron recubiertas con proteínas. Las micropartículas fueron producidas utilizando solución de pectina (2.5% m/m) como material encapsulante y cloruro de calcio (2.5% m/v) como agente reticulante. El material de relleno (mezcla de aceite) utilizado fue de 2.0625% (m/m). Las micropartículas producidas fueron estables y visualmente con buen aspecto.

La pectina utilizada en este estudio para producir micropartículas por gelificación iónica conteniendo compuestos hidrófobos como la mezcla de aceites (pescado, sachá inchi y aguaje) fue adecuado (Abouelatta *et al.* 2016).

#### 4.7 Caracterización de micropartículas producidas por gelificación iónica

Fue observado alto contenido de humedad ( $94.21\% \pm 0.94$ ) en las micropartículas producidas por gelificación iónica. Estos valores encontrados son característicos de matrices formados por redes de biopolímeros, debido a que tienen la propiedad de retener alta cantidad de agua en la matriz (Liu, Fishman y Hicks 2007; Ahmed 2015).

La caracterización y evaluación de las micropartículas incluyen la morfología y microestructura a través de la microscopía óptica y electrónica de barrido, distribución de tamaño, composición de la membrana, relleno y mecanismos de liberación. Sin embargo, las características funcionales como capacidad de retención del compuesto encapsulado, integridad y digestibilidad es de acuerdo a la aplicación del producto encapsulado (Jones y McClements 2011).

Tabla 9. Caracterización de micropartículas producidas por gelificación iónica

<b>Micropartícula</b>	<b>Humedad (%)</b>	<b>Ceniza (%)</b>	<b>Lípidos (%)</b>	<b>Tamaño (<math>\mu\text{m}</math>)(*)</b>	<b>EE (%)</b>
MPGI	$94.21 \pm 0.94$	$0.23 \pm 0.01$	$36.56 \pm 1.62$	$182.55 \pm 9.97$	$80.89 \pm 3.59$

Promedio  $\pm$  desvío estadístico (n=3); (\*) Promedio  $\pm$  desvío estadístico (n=300); EE= Eficiencia de encapsulación.

Debido a esto, la estructura interna de los hidrogeles se aproxima a una estructura tridimensional porosa tipo “*caja de huevo*” (Thorne, Vine y Snowden 2011). Esto explicaría los altos valores de agua contenido en las micropartículas encontrados en el presente estudio. También, fue determinado el contenido de cenizas con el objetivo de determinar la materia inorgánica presente en las micropartículas.

Resultados similares, fueron reportados en estudio reciente por Tello *et al.*, (2015) en la que las micropartículas de pectina presentaron mayor tamaño cuando comparado con micropartículas de alginato. Esto puede ser debido, al potencial de la pectina para interactuar con número mayor de moléculas de agua. Cabe destacar que, el tamaño de las micropartículas depende de varios factores que incluyen, la concentración biopolímeros en solución, el diámetro de la aguja del atomizador, la distancia entre la superficie inferior del atomizador y la superficie de la solución catiónica, y la velocidad de flujo de la emulsión (Strasdat y Bunjes 2013).

La Tabla 9, muestra que el sistema consiguió atrapar el  $80.89\% \pm 3.59$  del total del aceite inicial, este resultado difiere cuando comparado con reciente estudio que alcanzó próximo a 98% (Menin et al. 2018). La diferencia en la eficiencia de encapsulación podría ser debido a la mayor concentración de la pectina en solución utilizada en el presente estudio.

4.8 Recubrimiento de micropartículas de pectina con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum* por interacción electrostática.

Los resultados de la primera parte de este estudio fueron de importancia para la continuidad del trabajo de investigación, en la que fue determinada las variables óptimas (temperatura y velocidad de flujo) para el secado de sangre bovino, los resultados fueron utilizados para obtener la sangre bovino en polvo y posteriormente utilizados para recubrir micropartículas.

El recubrimiento de micropartículas de pectina (MPP) húmedas con diferentes concentraciones de proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum* en solución (2%, 4%, 6% y 8%), fue realizado con la finalidad de simular la composición de la *Artemia*, alimento vivo de larvas de peces, el contenido de materia seca de la *Artemia*, en promedio es de 8.8 a 9.2%, representando  $60.5\% \pm 3.5$  de proteína y lípido el  $18.60\% \pm 1.1$  en base seca (Mana et al. 2014). Sin embargo, la mayoría de las dietas descritas en la literatura, para ese propósito, fueron desarrolladas para contener mayor cantidad de proteína y materia seca, como las desarrolladas por Rodrigues et al. (2014). Las proteínas estudiadas presentan estructuras diferentes, por lo tanto, presentan características diferentes. La hipótesis es que las diferentes concentraciones de proteína en solución promoverán cantidades crecientes de proteínas adsorbidas, pudiendo esta hipótesis ser contrastada con los resultados que se muestran en la Tabla 10. Estos resultados confirman que el principal mecanismo de adsorción de proteínas se rige por las interacciones electrostáticas entre distribuciones de cargas. Las interacciones de las proteínas promueven la transferencia de moléculas a través de la superficie, controla energía libre y, en consecuencia, el tiempo de residencia de la molécula en la superficie de la micropartícula. Por otro lado, las interacciones entre las moléculas adsorbidas controlan la superficie y la formación de otras estructuras

formando membranas. Como resultado de la interacción electrostática, se observa que la adsorción de proteínas estudia la formación de las moléculas unidas irreversiblemente de moléculas que entran en contacto con la superficie de las micropartículas (Adamczyk et al. 2018). También la carga superficial, la morfología y la hidrofobicidad influyen el proceso de adsorción de proteínas (Felgueiras et al. 2016).

Por otro lado, varios estudios han mostrado que el tamaño de las proteínas también podría tener un efecto en su adsorción sobre la superficie del biomaterial. Las proteínas pequeñas se adsorben más rápido que las grandes. Sin embargo, los más grandes debido a su mayor área de superficie, se conectan de manera más firme a la superficie, lo que incluso puede evitar la dispersión de otras proteínas pre-adsorbidas por toda la superficie (Hirsh et al. 2013; Noh y Vogler 2007).

#### 4.8.1 Caracterización de micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino

Las cantidades de agua y proteína adsorbida de micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino con interacción electrostática se muestran en la Tabla 10, altas cantidades fueron adsorbidas, a medida que el contenido de proteína en solución aumentó. Con relación al contenido de agua menor cantidad de agua ( $81.14\% \pm 0.52$ ) fue observado cuando fue utilizado 8% de proteína en solución, indicando que las moléculas de proteína adsorbidas desplazaron a las moléculas de agua. El contenido de ceniza no presenta diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

Tabla 10. Composición centesimal de micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino

Micropartículas Recubiertas	Composición centesimal en base seca (%)				
	Humedad	Proteína	Ceniza	Lípido	Carbohidrato (*)
MPRSB2	$90.67 \pm 0.24^a$	$52.71 \pm 0.77^d$	$0.35 \pm 0.07^a$	$20.91 \pm 1.05^a$	26.03
MPRSB4	$87.98 \pm 0.18^b$	$54.75 \pm 1.12^c$	$0.36 \pm 0.06^a$	$21.73 \pm 1.10^a$	23.16
MPRSB6	$88.25 \pm 0.33^b$	$56.91 \pm 1.02^b$	$0.40 \pm 0.01^a$	$22.40 \pm 1.14^a$	20.29
MPRSB8	$81.14 \pm 0.52^c$	$57.60 \pm 1.2^a$	$0.40 \pm 0.02^a$	$21.17 \pm 1.14^a$	20.83

Promedio  $\pm$  desvío estadístico (n=3); (\*) por diferencia. El promedio seguido de letras diferentes en superíndice en la misma columna difiere de acuerdo a la prueba Tukey ( $p < 0.05$ ).



La Tabla 11, muestra las cantidades de hierro de micropartículas recubiertas con sangre bovino en todos los niveles de concentración. Los resultados muestran que la cantidad de hierro aumenta en función del incremento de la proteína en solución, 124.33±0.77 mg/100g de hierro fue cuantificado cuando 2% de proteína en solución se utilizó para recubrir las micropartículas, este resultado es inferior en 25% cuando 8% de proteína en solución fue utilizado. Este resultado, puede ser debido a la mayor cantidad de proteína adsorbida utilizando la concentración mayor.

Tabla 11. Contenido de hierro en micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino.

Micropartículas Recubiertas	Contenido de Hierro (mg/100g)
MPRSB2	124.33±0.77 <sup>d</sup>
MPRSB4	127.43±0.67 <sup>c</sup>
MPRSB6	130.70±0.99 <sup>b</sup>
MPRSB8	142.14±1.14 <sup>a</sup>

Promedio ± desvío estadístico (n=3). El promedio seguido de letras diferentes en superíndice en la misma columna difieren de acuerdo a la prueba Tukey (p<0.05).

#### 4.8.2 Caracterización de micropartículas de pectina recubiertas con gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum*

Tabla 12. Composición centesimal de micropartículas recubiertas con gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum*

Micropartículas Recubiertas	Composición centesimal en base seca (%)				
	Humedad	Proteína	Ceniza	Lípido	Carbohidrato (*)
MPRGD2	82.72±1.48 <sup>a</sup>	53.97±1.02 <sup>c</sup>	0.16±0.12 <sup>a</sup>	22.21±0.85 <sup>a</sup>	24.42
MPRGD4	82.85±0.69 <sup>a</sup>	54.74±1.18 <sup>c</sup>	0.13±0.02 <sup>a</sup>	21.07±1.08 <sup>a</sup>	24.84
MPRGD6	83.90±1.15 <sup>a</sup>	58.01±1.35 <sup>b</sup>	0.15±0.03 <sup>a</sup>	22.52±0.99 <sup>a</sup>	21.22
MPRGD8	83.92±0.47 <sup>a</sup>	64.56±0.98 <sup>a</sup>	0.16±0.02 <sup>a</sup>	20.93±0.91 <sup>a</sup>	20.41

Promedio ± desvío estadístico (n=3); (\*) por diferencia. El promedio seguido de letras diferentes en superíndice en la misma columna difiere de acuerdo a la prueba Tukey (p<0.05).

La adsorción de proteína sobre la superficie de las micropartículas de pectina fue significativamente mayor cuando fue utilizado gelatina en las concentraciones estudiadas. La adsorción de moléculas de proteína forma numerosos contactos con la superficie del adsorbente, lo cual promueve alta adsorción. Dependiendo de la concentración de moléculas de proteína en

solución, reacciones de intercambio pueden llevar a un número creciente de moléculas adsorbidas. Probablemente la interacción es dependiente de las interacciones laterales entre las moléculas de proteína. La forma del polímero también puede tener una influencia pronunciada en la adsorción de proteínas. Para investigar los efectos de la arquitectura en adsorción de proteínas, diferentes superficies geométricas, incluidas las ranuras. Se han examinado crestas, hoyos, pilares y nano-islas, que son reconocidas como formas físicamente apropiadas (Michel et al. 2005). Los procesos de adsorción están relacionados con las propiedades de materiales, así como a la naturaleza de las proteínas (Ma, Pang y Deng 2019).

Las interacciones de biopolímeros con grupos carboxilo ( $^{-}\text{COOH}$ ), hidroxilo ( $^{-}\text{OH}$ ), amino ( $^{-}\text{NH}_2$ ) y metilo ( $^{-}\text{CH}_3$ ) han sido estudiados por sus funcionalidades (Thevenot, Hu y Tang 2008). Muchos estudios han investigado la influencia de estos grupos funcionales en la adsorción de proteínas. Se ha demostrado que el agua podría influenciar sobre la adsorción a superficies que contienen grupos hidroxilo (Benesch et al. 2001). En estudio reciente utilizando gelatina y alginato se descubrió que los compuestos resultantes podrían disminuir la velocidad de adsorción y obviamente mejorar la adsorción, debido a mayor interacción inducido por grupos amino protonados en las cadenas de gelatina (Ma et al. 2019).

#### 4.9 Morfología, microestructura y tamaño de micropartículas, con y sin recubrimiento proteico

##### 4.9.1 Morfología de micropartículas producidas por gelificación iónica

Las observaciones visuales de las micropartículas mostraron estructuras firmes y compactas. La concentración de pectina en solución utilizada para producir las micropartículas, fue mayor (2.5%) a lo convencionalmente utilizado (2%), debido a la débil interacción entre las cargas negativas de la pectina con los cationes de la solución de cloruro de calcio, resultando más fuerte cuando utilizamos alginato (Grant et al. 1973). La imagen de la micropartícula húmeda producida por gelificación iónica (Figura 11), permite evaluar las características morfológicas, en la que se observa la formación de una matriz multinucleada, con gotas de aceite distribuidas en toda la extensión de la matriz.

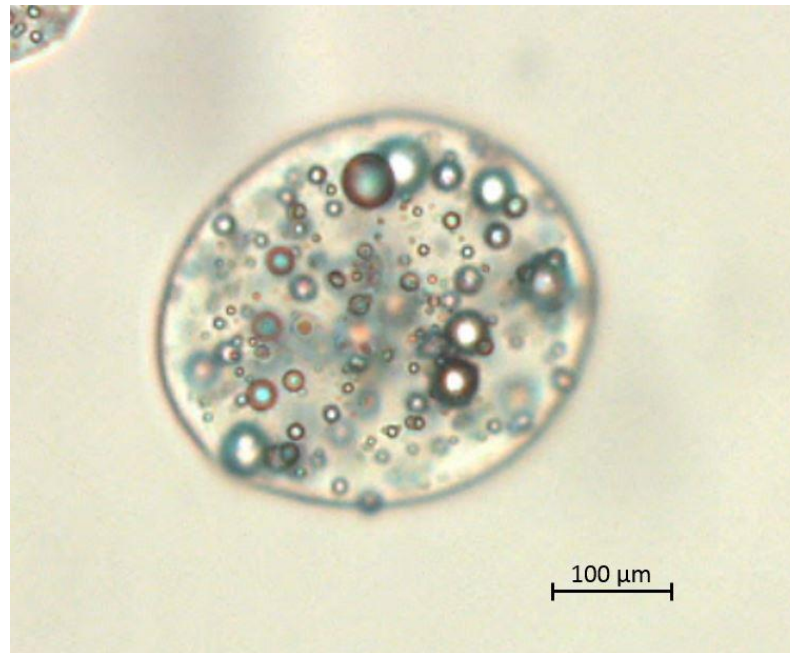


Figura 11 – Foto de micropartícula de pectina sin recubrimiento obtenida por microscopía óptica. Escala = 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.9.2 Morfología de micropartículas producidas por gelificación iónica, recubiertas con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum*.

La Figura 12, muestra las imágenes de la morfología de las micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum* cuando fue utilizado la menor (2%) y mayor (8%) concentración de proteína en soluciones obtenidas por microscopía óptica. El recubrimiento proteico no afectó las estructuras de las micropartículas. Sin embargo, se puede apreciar claramente la proteína que fue adsorbida en la superficie de las micropartículas. Micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino muestran una aparente superficie rugosa en comparación con la superficie de las micropartículas que absorbieron gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum*. Asimismo, se observó que las micropartículas recubiertas con sangre bovino adquirieron una coloración marrón intensa.

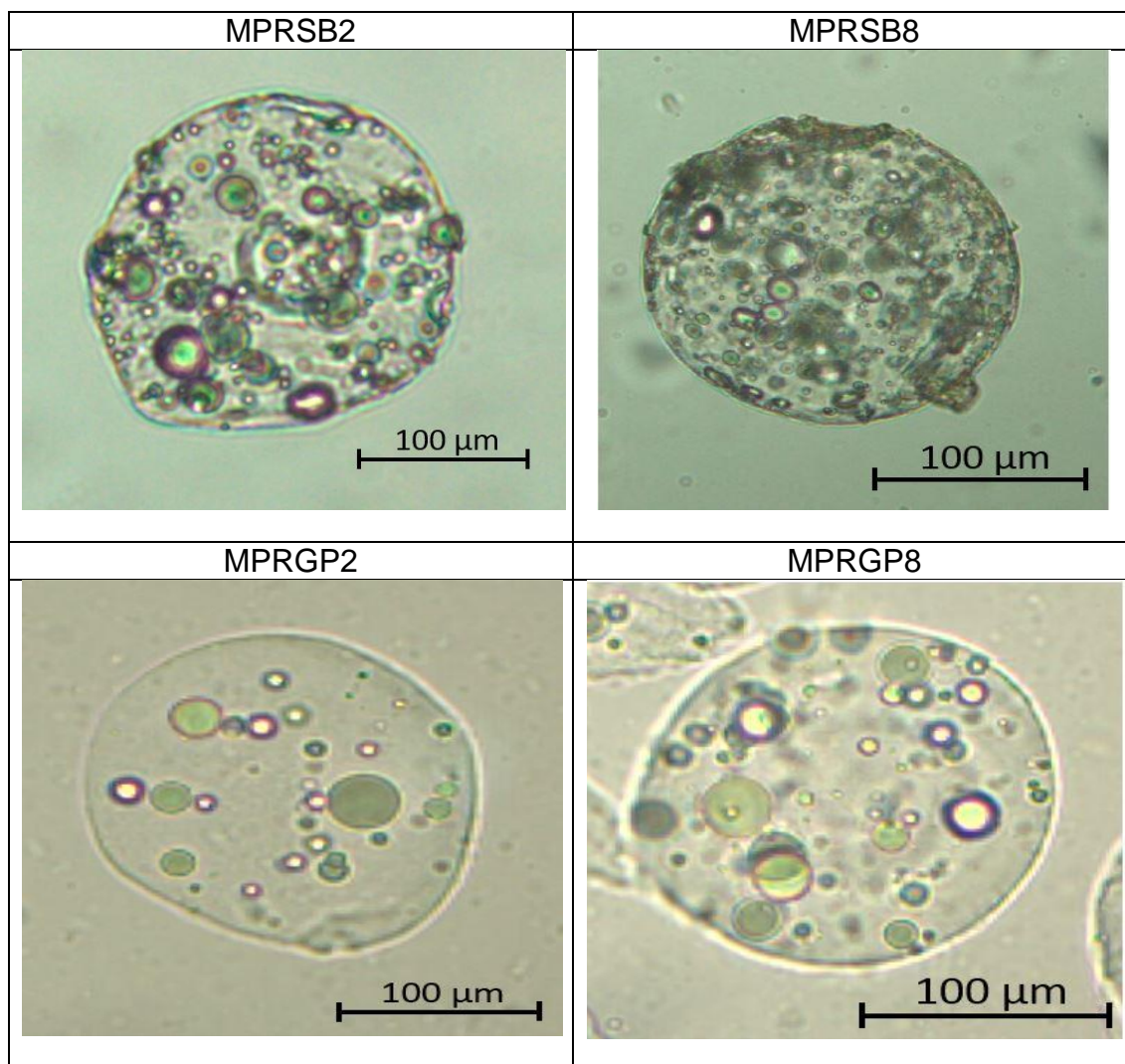


Figura 12: Imagen obtenida por MICROSCOPIA ÓPTICA: MPRS B2 y MPRS B8, micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino de 2 y 8%, respectivamente; MPRGD2 y MPRGD8, micropartículas recubiertas con gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum* de 2 y 8%, respectivamente. Barra MO = 100 μm. Objetivo: 40x.

#### 4.9.3 Microestructura de micropartículas con y sin recubrimiento proteico

La observación de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido muestra que, las micropartículas aparentemente soportaron el proceso de secado, sin embargo, es posible observar que las macropartículas sin recubrimiento muestran alta fragilidad. Con relación a las micropartículas recubiertas, la Figura 13, muestra rugosidad en la superficie de las micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino que podría estar relacionado con la proteína adsorbida. Resultados semejantes fueron

observados en micropartículas de pectina conteniendo aceite de girasol (Souza et al. 2012).

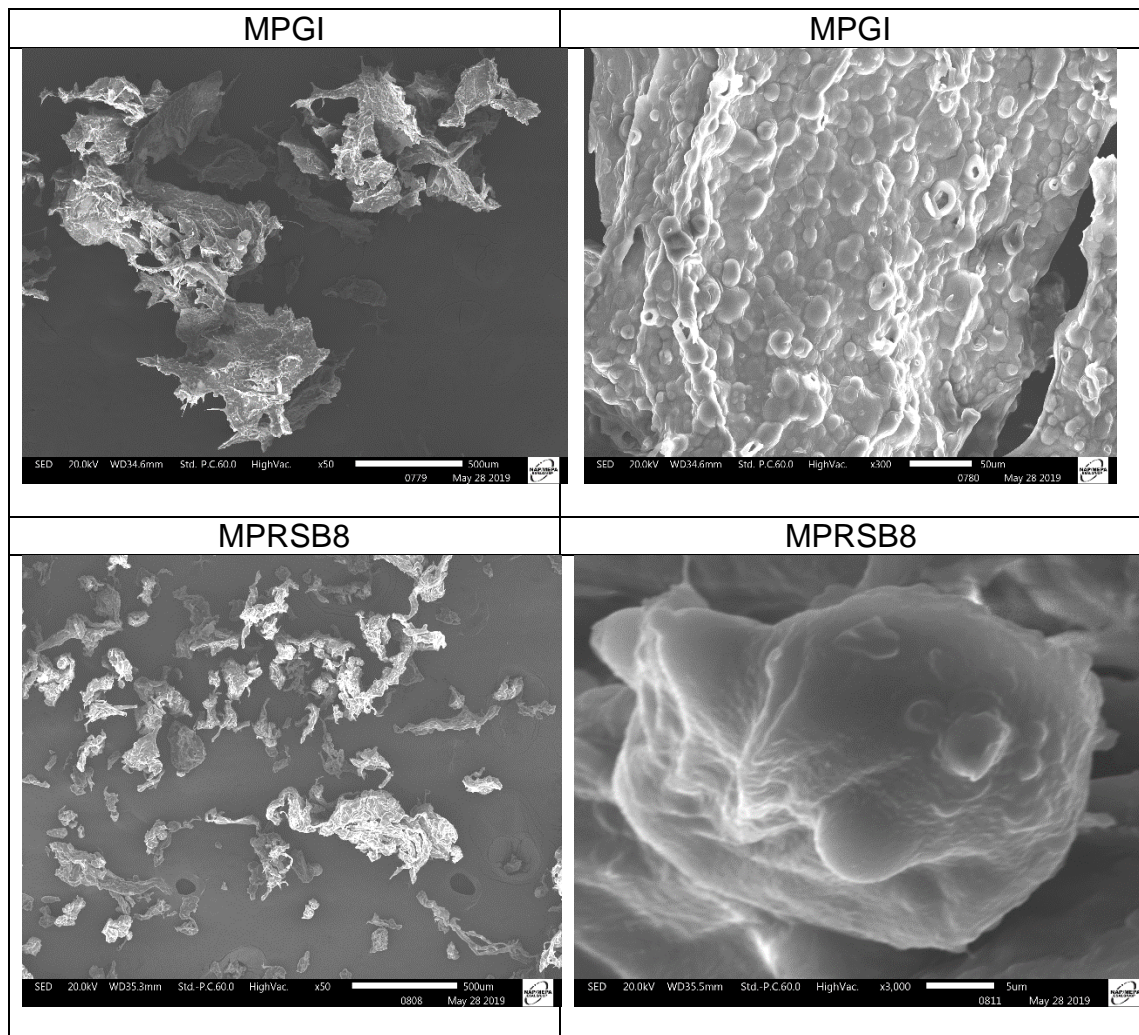


Figura 13: Imagen obtenida por MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (MEB). MPGI: micropartículas de pectina conteniendo gotas de aceite. MPRSB8: micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino 8%.

#### 4.9.4 Tamaño de micropartículas con y sin recubrimiento proteico

Los tamaños medios de las micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum* fueron determinados por microscopía óptica. Los tamaños son presentados en la Tabla 13.

El tamaño medio de las micropartículas pectina recubiertas, fue determinado por microscopía óptica para evaluar la influencia del recubrimiento proteico sobre las micropartículas. El tamaño y la forma de las micropartículas son parámetros importantes que deben tenerse en cuenta en la formulación de



productos alimenticios, ya que se desean micropartículas esféricas con una distribución uniforme del tamaño para la incorporación de ingredientes funcionales activos.

Tabla 13. Tamaño de micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum*.

Proteína en solución (%)	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	
	MPRSB	MPRGD
0	185.20 $\pm$ 13.49	187.10 $\pm$ 9.83
2	169.70 $\pm$ 13.49	197.44 $\pm$ 8.48
4	163.30 $\pm$ 9.25	206.23 $\pm$ 5.44
6	160.28 $\pm$ 19.52	204.94 $\pm$ 10.47
8	161.05 $\pm$ 18.24	215.12 $\pm$ 8.88

Promedio  $\pm$  desvío estadístico (n=300)

Los resultados muestran que el tamaño de las micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino disminuyó cuando fueron comparados con el tamaño de las micropartículas sin recubrimiento (185.20 $\mu\text{m}$  $\pm$ 13.49). Con relación al tamaño de las micropartículas recubiertas con gelatina de piel de *Pseudoplatystoma fasciatum*, comportamiento diferente fue observado, el tamaño se incrementó a 215.12 $\pm$ 8.88  $\mu\text{m}$  cuando comparado a 187.10  $\pm$ 9.83  $\mu\text{m}$  (Tabla 13). Los tamaños obtenidos fueron próximos a 225.8 $\pm$  41.90  $\mu\text{m}$  encontrados por Rodrigues et al. (2014).

Convencionalmente las larvas de peces son pequeñas cuando eclosionan. En consecuencia, ellos necesitan dietas pequeñas durante las primeras etapas de vida (Conceição et al. 2010). Por otro lado, los tamaños obtenidos también fueron compatibles al tamaño de alimentos vivos de larvas que incluyen rotíferos (80 a 280  $\mu\text{m}$ ) y nauplios de Artemia (250 a 350  $\mu\text{m}$ ) (Dhont et al. 2013). En otros trabajos para alimentación de larvas de peces se utilizaron dietas inertes de tamaños 50 a 300  $\mu\text{m}$  (Villamar y Langdon 1993) y 250 a 425  $\mu\text{m}$  (Guthrie et al. 2000).

La diferencia en las dimensiones de las micropartículas puede explicarse por la naturaleza de las estructura de las proteínas, las proteínas de sangre bovino presentan estructura globular, que se desdoblan para realizar interacciones con grupos carboxílicos disociados de la pectina; la gelatina tiene estructura lineal, que realiza mayoritariamente interacciones proteína–proteína

promoviendo diferentes enlaces como de hidrógeno (Gómez-Guillen et al. 2011). Varios factores pueden afectar o incluso controlar el tamaño y la forma de las micropartículas a base de polisacáridos reticuladas iónicamente. El tamaño y forma de las micropartículas pueden verse afectadas por la velocidad de flujo de la solución polimérica, diámetro de la aguja, las condiciones de gelificación, así como la viscosidad de la solución.

La caracterización y evaluación de las micropartículas incluyen la morfología y microestructura a través de la microscopía óptica y electrónica de barrido, distribución de tamaño, composición de la membrana, relleno y mecanismos de liberación. Sin embargo, las características funcionales como capacidad de retención del compuesto encapsulado, integridad y digestibilidad se realiza de acuerdo con la aplicación del producto encapsulado (Jones y McClements 2011).

#### 4.10 Producción de peróxidos en micropartículas para alimentación de larvas de peces

Micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino y gelatina de piel de doncella conteniendo una mezcla de aceites *salmo* (salmón), *Plukenetia volubilis* (sacha inchi) *Mauritia flexuosa* y (aguaje) fueron producidos con la finalidad de brindar una alternativa para alimentar larvas de peces carnívoros. Debido a la incorporación de aceites conteniendo ácidos grasos poliinsaturados susceptibles de daño oxidativo, fueron evaluados. Micropartículas recubiertas con la mayor concentración de proteína en solución fueron utilizados después de la liofilización y la estabilidad oxidativa del aceite encapsulado fue evaluada por el índice de peróxidos durante dos quincenas almacenados a temperatura ambiente. Los índices de peróxidos del aceite encapsulado en las micropartículas se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Variación del índice de peróxido del aceite encapsulado durante 30 días.

Tiempo (días)	Índice de peróxidos (mg MDA/kg Aceite)	
	MPRSB8	MPRGD8
0	0.33±0.07 <sup>c</sup>	0.33±0.07 <sup>c</sup>
15	0.75±0.10 <sup>b</sup>	0.91±0.05 <sup>b</sup>
30	1.20±0.08 <sup>a</sup>	1.38±0.25 <sup>a</sup>

Los valores, representan valores de tres determinaciones. Los promedios seguidos de letras diferentes en superíndice en la misma columna difieren de acuerdo a la prueba Tukey ( $p < 0.05$ ).

Inicialmente, de acuerdo con la Tabla 14, en el tiempo cero, el aceite microencapsulado presente el nivel más bajo de oxidación  $0.33 \pm 0.07$  mg MDA/kg de aceite. Después de 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente, el aceite encapsulado en las micropartículas incrementó su nivel de oxidación independiente del tipo de proteína utilizado para la cobertura. En la cuarta semana de almacenamiento el aceite microencapsulado muestra comportamiento semejante, con incremento del nivel de oxidación. Micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino se muestran más perfectivas, considerando el menor índice de oxidación ( $1.20 \pm 0.08$ ) a la cuarta semana de almacenamiento.

En trabajo realizado por Tello et al. (2015), utilizaron micropartículas de pectina y alginato recubiertas ambas con proteínas de suero de leche y ovoalbúmina, siendo las macropartículas de pectina recubiertas con ovoalbúmina la que mejor protección ofreció frente a la oxidación del aceite encapsulado. Del análisis de los resultados de oxidación del presente trabajo indican que la producción de peróxidos continúa en aumento en los dos sistemas de micropartículas. Sin embargo, en ninguno de los sistemas podemos afirmar que la oxidación concluyó la fase de terminación.



## CAPITULO V: CONCLUSIONES

Alto contenido proteico (18%) y ceniza (0.45%) fue determinado en sangre bovino en estado natural.

La cuantificación de proteína como variable de respuesta al estudio de optimización de secado de sangre bovino utilizando el gráfico de la metodología de superficie de respuesta y gráfico de contorno, donde el máximo valor se encuentra localizado en la región que pertenece a la combinación de temperatura (~135 – 150° C) y velocidad de flujo (6 – 8 mL/min), que representan los valores óptimos.

Micropartículas de pectina producidos por gelificación iónica, mostraron alta eficiencia de encapsulación indicando que la técnica utilizada es adecuada para encapsulación de sustancias hidrofóbicas.

El tamaño de las micropartículas con recubrimiento ( $161.05 \pm 18.24 \mu\text{m}$  y  $215.12 \pm 8.88 \mu\text{m}$ ) son próximos a los tamaños de alimentos vivos utilizado en la alimentación de larvas de peces como rotíferos (80 a 280  $\mu\text{m}$ ) y nauplios de *Artemia* (250 a 350  $\mu\text{m}$ ).

Altos valores de adsorción de proteína presentan las micropartículas de pectina recubiertas. El aumento de proteína en solución aumentó la cantidad de proteína adsorbida independientemente del tipo de proteína. El incremento de proteína adsorbida incrementa la cantidad de materia seca de las micropartículas.

Micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino muestran alto contenido de hierro en todas las concentraciones de proteína utilizadas.

La microscopia óptica evidencia que las micropartículas presentan forma esférica con distribución de las gotas de aceite en toda la matriz polimérica.

La combinación de la técnica de gelificación iónica y la interacción electrostática produjo una matriz para alimentación (Proteína ~60%, lípido ~20%) de larvas de peces carnívoros como alternativa al alimento vivo (*Artemia: proteina ~52%, lípido ~19*).

## **CAPITULO VI: RECOMENDACIONES**

- Formular productos alimenticios utilizando sangre bovino en polvo como fuente de hierro heme para mitigar deficiencias de micronutrientes.
- Formular alimento para peces utilizando sangre bovino en polvo mediante tecnologías como extrusión.
- Desarrollar investigaciones utilizando la técnica de gelificación iónica para incorporar materias primas como la maca.
- Realizar ensayos biológicos con larvas de peces con micropartículas obtenidas en este estudio con la finalidad de evaluar su eficiencia nutricional.

## CAPÍTULO VII: FUENTES DE INFORMACIÓN

- ABDUL-FATTAH, A., KALONIA, D. y PIKAL, M., 2006. The Challenge of Drying Method Selection for Protein Pharmaceuticals: Product Quality Implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 96, no. 8, pp. 1886-1916. DOI 10.1002/jps.
- ABID, M., CHEIKHROUHO, S., RENARD, C.M.G.C., BUREAU, S., CUVELIER, G., ATTIA, H. y AYADI, M.A., 2017. *Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties*. 2017. S.l.: s.n.
- ABOUELATTA, S.M., ABOELWABA, A.A., KHALIL, R.M. y EL-GAZAYERLY, O.N., 2016. Utilization of ionotropic gelation technique for bioavailability enhancement of cinnarizine: in-vitro optimization and in-vivo performance in human. *Drug Delivery*, vol. 23, no. 8, pp. 2736-2746. ISSN 15210464. DOI 10.3109/10717544.2015.1064187.
- ADAMCZYK, Z., POMORSKA, A., NATTICH-RAK, M., WYTRWAL-SARNA, M. y BERNASIK, A., 2018. Protein adsorption mechanisms at rough surfaces: Serum albumin at a gold substrate. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 530, pp. 631-641. ISSN 00219797. DOI 10.1016/j.jcis.2018.06.063.
- AHMAD, M. y BENJAKUL, S., 2011. *Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (Aluterus monoceros) as influenced by acid pretreatment and extraction time*. 2011. S.l.: s.n.
- AHMED, E.M., 2015. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, vol. 6, pp. 105-121. ISSN 2090-1232. DOI 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- AKBARY, P., HOSSEINI, S.A., IMANPOOR, M., SUDAGAR, M. y MAKHDOMI, N.M., 2010. Comparison between live food and artificial diet on survival rate, growth and body chemical composition of *Oncorhynchus mykiss* larvae. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, vol. 9, no. 1, pp. 19-32. ISSN 15622916.
- ALMEIDA, M., ERTHAL, R., PADUA, E., SILVEIRA, L. y AM, L., 2008. Response surface methodology ( RSM ) as a tool for optimization in analytical

- chemistry. *Talanta*, vol. 76, pp. 965-977. DOI 10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- AMERI, M. y MAA, Y.F., 2006. Spray drying of biopharmaceuticals: Stability and process considerations. *Drying Technology*, vol. 24, no. 6, pp. 763-768. ISSN 07373937. DOI 10.1080/03602550600685275.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C., RIELLY, C.D. y STAPLEY, A.G.F., 2007. Effects of process variables on the denaturation of whey proteins during spray drying. *Drying Technology*, vol. 25, no. 5, pp. 799-807. ISSN 07373937. DOI 10.1080/07373930701370175.
- ANUONYE, J.C., 2012. Some functional properties of extruded acha / soybean blends using response surface analysis. *African Journal of Food Science*, vol. 6, no. 10, pp. 269-279. DOI 10.5897/AJFS12.001.
- AVADÍ, A., PELLETIER, N., AUBIN, J., RALITE, S., NÚÑEZ, J. y FRÉON, P., 2015. Comparative environmental performance of artisanal and commercial feed use in Peruvian freshwater aquaculture. *Aquaculture* [en línea], vol. 435, pp. 52-66. ISSN 0044-8486. DOI 10.1016/j.aquaculture.2014.08.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.001>.
- BA, D. y BOYACI, I.H., 2007. Modeling and optimization i: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, vol. 78, no. 3, pp. 836-845. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024.
- BAKRY, A.M., ABBAS, S., ALI, B., MAJEED, H., ABOUELWAFI, M.Y., MOUSA, A. y LIANG, L., 2016. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 15, no. 1, pp. 143-182. ISSN 15414337. DOI 10.1111/1541-4337.12179.
- BELTRÁN, C. y PERDOMO, W.F., 2007. *Aprovechamiento de la sangre de bovino para la obtención de harina de sangre y plasma sanguíneo en el matadero Santa Cruz de Malambo Atlántico* [en línea]. S.l.: s.n. Disponible en: [tp://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/materia1994/46.171?from=CrossRef](http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/materia1994/46.171?from=CrossRef).
- BENAVIDES, S., CORTÉS, P., PARADA, J. y FRANCO, W., 2016. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry* [en línea], vol. 204, pp. 77-83. ISSN 18737072. DOI

10.1016/j.foodchem.2016.02.104.

Disponible

en:

[http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.104.](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.104)

- BENESCH, J., SVEDHEM, S., SVENSSON, S.C.T., VALIOKAS, R., LIEDBERG, B. y TENGVALL, P., 2001. Protein adsorption to oligo(ethylene glycol) self-assembled monolayers: Experiments with fibrinogen, heparinized plasma, and serum. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 12, no. 6, pp. 581-597. ISSN 09205063. DOI 10.1163/156856201316883421.
- BLIGH, E.G. y DYER, W.J., 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, vol. 37, no. 8, pp. 911-917.
- BOURICHE, S., CÓZAR-BERNAL, M.J., REZGUI, F., ÁLVAREZ, A.M. y GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.L., 2019. Optimization of preparation method by W/O/W emulsion for entrapping metformin hydrochloride into poly (lactic acid) microparticles using Box-Behnken design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 51, no. March, pp. 419-429. ISSN 17732247. DOI 10.1016/j.jddst.2019.03.011.
- BRACCINI, I. y PEREZ, S., 2001. Molecular Basis of Ca<sup>2+</sup>-Induced Gelation in Alginates and Pectins : The Egg-Box Model Revisited Molecular Basis of Ca<sup>2+</sup> -Induced Gelation in Alginates and Pectins : The Egg-Box Model Revisited. *Society*, pp. 1089-1096. ISSN 1525-7797. DOI 10.1021/bm010008g.
- CANDIOTI, L., DE ZAN, M., CÁMARA, M. y GOICOECHEA, H., 2014. Experimental design and multiple response optimization . Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, vol. 124, pp. 123-138.
- CAO, J. y LI, Q., 2018. Modification of Pectin. *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*, vol. 2, pp. 561-566. DOI 10.1016/b978-0-08-100596-5.22446-3.
- CHAN, Y. Ten, TAN, M.C. y CHIN, N.L., 2019. Application of Box-Behnken design in optimization of ultrasound effect on apple pectin as sugar replacer. *Lwt*, vol. 115, no. June, pp. 108449. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2019.108449.

- CHIRINOS, R., PEDRESCHI, R., ROGEZ, H., LARONDELLE, Y. y CAMPOS, D., 2013. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products* [en línea], vol. 47, pp. 145-152. ISSN 09266690. DOI 10.1016/j.indcrop.2013.02.025. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.025>.
- COELHO, T.L.S., BRAGA, F.M.S., SILVA, N.M.C., DANTAS, C., LOPES, J. y DE SOUZA, S.A., 2019. Optimization of the protein extraction method of goat meat using factorial design and response surface methodology. *Food Chemistry*, vol. 281, no. December 2018, pp. 63-70.
- COMUNIAN, T.A. y FAVARO-TRINDADE, C.S., 2016. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocolloids*, vol. 61, pp. 442-457. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2016.06.003.
- CONCEIÇÃO, L.E.C., YÚFERA, M., MAKRIDIS, P., MORAIS, S. y DINIS, M.T., 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, vol. 41, no. 5, pp. 613-640. ISSN 1355557X. DOI 10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x.
- DA SILVA SOARES, B., SIQUEIRA, R.P., DE CARVALHO, M.G., VICENTE, J. y GARCIA-ROJAS, E.E., 2019. Microencapsulation of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) using complex coacervation: Formation and structural characterization. *Food Chemistry*, vol. 298, no. February. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.125045.
- DAVIS, M. y WALKER, G., 2018. Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of Control Release*, vol. 269, no. November 2017, pp. 110-127.
- DESAI, K.G.H. y PARK, H.J., 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, vol. 23, pp. 1361-1394. DOI 10.1081/DRT-200063478.
- DHONT, J., DIERCKENS, K., STØTTRUP, J., VAN STAPPEN, G., WILLE, M. y SORGELOOS, P., 2013. Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*.

S.I.: s.n., pp. 157-202. ISBN 9780857091192.

- DOHERTY, S.B., GEE, V.L., ROSS, R.P., STANTON, C., FITZGERALD, G.F. y BRODKORB, A., 2011. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids* [en línea], vol. 25, no. 6, pp. 1604-1617. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2010.12.012. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.012>.
- EMAMI, F., VATANARA, A., PARK, E.J. y NA, D.H., 2018. Drying technologies for the stability and bioavailability of biopharmaceuticals. *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, pp. 1-22. ISSN 19994923. DOI 10.3390/pharmaceutics10030131.
- FATHI, M., MARTÍN, Á. y MCCLEMENTS, D.J., 2014. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 39, no. 1, pp. 18-39. ISSN 09242244. DOI 10.1016/j.tifs.2014.06.007.
- FELGUEIRAS, H., MURTHY, N., SOMMERFELD, S., BRÁS, M., MIGONNEY, V. y KOHN, J., 2016. Competitive Adsorption of Plasma Proteins using Quartz Crystal Microbalance. *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 8, no. 21, pp. 1-26. DOI 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- FERREIRA, S.L.C., BRUNS, R.E., FERREIRA, H.S., MATOS, G.D., DAVID, J.M., BRAND, G.C., SILVA, E.G.P., REIS, P.S., SOUZA, A.S. y SANTOS, W.N.L., 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, vol. 597, pp. 179-186. DOI 10.1016/j.aca.2007.07.011.
- FONTES, P.R., GOMIDE, L.A.M., RAMOS, E.M., STRINGHETA, P.C. y PARREIRAS, J.F.M., 2004. Color evaluation of carbon monoxide treated porcine blood. *Meat Science*, vol. 68, no. 4, pp. 507-513. ISSN 03091740. DOI 10.1016/j.meatsci.2004.03.013.
- FRIEDMAN, M., 1996. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, no. 1, pp. 6-29. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf9400167.
- GALANAKIS, C.M., 2016. High Value-Added Compounds from Food Waste. *Elsevier*, pp. 1-8.

- GENENE, A., HANSEN, E.B., ESHETU, M., HAILU, Y. y IPSEN, R., 2019. Effect of heat treatment on denaturation of whey protein and resultant rennetability of camel milk. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 101, no. November 2018, pp. 404-409. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2018.11.047.
- GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A. y SAUREL, R., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients : An overview. *Food Research International*, vol. 40, pp. 1107-1121. DOI 10.1016/j.foodres.2007.07.004.
- GLENCROSS, B.D., BOOTH, M. y ALLAN, G.L., 2007. A feed is only as good as its ingredients - A review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition*, vol. 13, no. 1, pp. 17-34. ISSN 13535773. DOI 10.1111/j.1365-2095.2007.00450.x.
- GÓMEZ-GUILLEN, M.C., GIMÉNEZ, B., LÓPEZ-CABALLERO, M.E. y MONTERO, M.P., 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources : A review. *Food hydrocolloids* [en línea], vol. 25, no. 8, pp. 1813-1827. ISSN 0268-005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2011.02.007. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M.C., PÉREZ-MATEOS, M., GÓMEZ-ESTACA, J., LÓPEZ-CABALLERO, E., GIMÉNEZ, B. y MONTERO, P., 2009. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 20, no. 1, pp. 3-16. ISSN 09242244. DOI 10.1016/j.tifs.2008.10.002.
- GRANT, G.T., MORRIS, E.R., REES, D.A., SMITH, P.J.C. y THOM, D., 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, vol. 32, no. 1, pp. 195-198. ISSN 00145793. DOI 10.1016/0014-5793(73)80770-7.
- GUTHRIE, K.M., RUST, M.B., LONGDON, C.J. y BARROWS, F.T., 2000. Acceptability of various microparticulate diets to first-feeding walleye *Stizostedion vitreum* larvae. *Aquaculture Nutrition*, vol. 6, pp. 153-158.
- HANANI, Z.A.N., 2016. Gelatin. *Encyclopedia of Food and Health*, pp. 191-195.
- HIRSH, S.L., MCKENZIE, D.R., NOSWORTHY, N.J., DENMAN, J.A.,



- SEZERMAN, O.U. y BILEK, M.M.M., 2013. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [en línea], vol. 103, pp. 395-404. ISSN 0927-7765. DOI 10.1016/j.colsurfb.2012.10.039. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.039>.
- HOLT, G.J., WEBB, K.A. y RUST, M.B., 2011. Microparticulate Diets: Testing and Evaluating Success. *Larval Fish Nutrition*, pp. 353-372. DOI 10.1002/9780470959862.ch13.
- IKRANG, E.G. y UMANI, K.C., 2019. Optimization of process conditions for drying of catfish (*Clarias gariepinus*) using Response Surface Methodology (RSM). *Food Science and Human Wellness*, vol. 8, no. 1, pp. 46-52. ISSN 22134530. DOI 10.1016/j.fshw.2019.01.002.
- JACYNA, J., KORDALEWSKA, M. y MARKUSZEWSKI, M.J., 2019. Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [en línea], vol. 164, pp. 598-606. ISSN 0731-7085. DOI 10.1016/j.jpba.2018.11.027. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.027>.
- JONES, O.G. y MCCLEMENTS, D.J., 2011. *Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes*. 2011. S.I.: Elsevier B.V.
- KANG, J.-H., KIM, S. y MOON, B., 2016. *Optimization by response surface methodology of lutein recovery from paprika leaves using accelerated solvent extraction* [en línea]. 2016. S.I.: s.n. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616303557>.
- KORHONEN, H. y PIHLANTO, A., 2003. Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 9, no. 16, pp. 1297-1308. ISSN 13816128. DOI 10.2174/1381612033454892.
- KUROZAWA, L.E. y HUBINGER, M.D., 2017. Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. *Current Opinion in Food Science* [en línea], vol. 15, pp. 50-55. ISSN 22147993. DOI 10.1016/j.cofs.2017.06.004.

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.004>.

- KURUNCZI, A., BOLZANI, E., WILHELM, H.M. y PEREIRA, L., 2008. Optimization of the ethanolsis of *Raphanus sativus* ( L . Var .) crude oil applying the response surface methodology. *Bioresource Technology*, vol. 99, pp. 1837-1845. DOI 10.1016/j.biortech.2007.03.063.
- LAFARGA, T., ALUKO, R.E., RAI, D.K., CONNOR, P.O. y HAYES, M., 2016. Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, vol. 81, pp. 91-99.
- LAFARGA, T., RAI, D.K., OCONNOR, P. y HAYES, M., 2015. A Bovine Fibrinogen-Enriched Fraction as a Source of Peptides with in Vitro Renin and Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, no. 39, pp. 8676-8684. ISSN 15205118. DOI 10.1021/acs.jafc.5b03167.
- LASCOL, M., BOURGEOIS, S., BARRATIER, C., MAROTE, P., LANTÉRI, P. y BORDES, C., 2018. Development of pectin microparticles by using ionotropic gelation with chlorhexidine as cross-linking agent. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 542, no. November 2017, pp. 205-212.
- LÉGER, P., BENGTON, D., SORGELOOS, P., SIMPSON, K. y BECK, A., 1987. The nutritional value of *Artemia*: a review. *Artemia Research and its Applications*, pp. 358-372.
- LIMA, P., PEREIRA, S., RABELO, R., RODRIGUEZ-CASTELLÓN, E., BEPPU, M., CHEVALLIER, P., MANTOVANI, D. y VIEIRA, R., 2013. Blood protein adsorption on sulfonated chitosan and  $\kappa$ -carrageenan films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 111, pp. 719-725.
- LIU, L., FISHMAN, M.L. y HICKS, K.B., 2007. Pectin in controlled drug delivery – a review. , pp. 15-24. DOI 10.1007/s10570-006-9095-7.
- LYNCH, S.A., MULLEN, A.M., O'NEILL, E.E. y GARCIA, C., 2017. Harnessing the Potential of Blood Proteins as Functional Ingredients : A Review of the State of the Art in Blood Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 16, pp. 330-344. DOI 10.1111/1541-

4337.12254.

- MA, L., PANG, D. y DENG, C., 2019. Competitive adsorption of bovine serum albumin and lysozyme on a beta-tricalcium phosphate nanocoating. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 582, no. July, pp. 123860. ISSN 09277757. DOI 10.1016/j.colsurfa.2019.123860.
- MA, Y., QI, P., JU, J., WANG, Q., HAO, L., WANG, R., SUI, K. y TAN, Y., 2019. Gelatin/alginate composite nanofiber membranes for effective and even adsorption of cationic dyes. *Composites Part B: Engineering*, vol. 162, no. December 2018, pp. 671-677. ISSN 13598368. DOI 10.1016/j.compositesb.2019.01.048.
- MADAMBA, P.S., 2002. *The response surface methodology: An application to optimize dehydration operations of selected agricultural crops*. 2002. S.I.: s.n.
- MANA, N., VAHABZADEH, H., SEIDGAR, M., HAFEZIEH, M. y POURALI, H.R., 2014. Proximate composition and fatty acids profiles of Artemia cysts, and nauplii from different geographical regions of Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, vol. 13, no. 3, pp. 761-775. ISSN 15622916.
- MARTIN, M.J., MORALES, M.E., GALLARDO, V. y RUIZ, M.A., 2009. Técnicas de microencapsulación: Una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharmaceutica*, vol. 50, no. 1, pp. 43-50. ISSN 00042927.
- MARTÍNEZ, C., ROS, G., PERIAGO, M.J. y LÓPEZ, G., 1999. Biodisponibilidad del hierro en los alimentos. , no. February 2016, pp. 106-113.
- MATALANIS, A., GRIF, O. y MCCLEMENTS, D.J., 2011. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation , protection , and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, vol. 25. DOI 10.1016/j.foodhyd.2011.04.014.
- MCCLEMENTS, D.J., 2017. Designing biopolymer microgels to encapsulate , protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 240, pp. 31-59.
- MENDES, B.B., GÓMEZ-FLORIT, M., BABO, P.S., DOMINGUES, R.M., REIS, R.L. y GOMES, M.E., 2018. Blood derivatives awaken in regenerative

- medicine strategies to modulate wound healing ☆. *Advances Drug Delivery*, vol. 129, pp. 376-393.
- MENIN, A., ZANONI, F., VAKARELOVA, M., CHIGNOLA, R., DONÀ, G., RIZZI, C., MAINENTE, F. y ZOCCATELLI, G., 2018. Effects of microencapsulation by ionic gelation on the oxidative stability of flaxseed oil. *Food Chemistry*, vol. 269, no. June, pp. 293-299. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.06.144.
- MICHEL, R., PASCHE, S., TEXTOR, M. y CSTNER, D., 2005. The Influence of PEG Architecture on Protein Adsorption and Conformation. *Langmuir*, vol. 21, no. 26, pp. 12327-12332. DOI 10.1016/j.cortex.2009.08.003.
- MORONE, P., FALCONE, P.M. y LOPOLITO, A., 2019. How to promote a new and sustainable food consumption model: A fuzzy cognitive map study. *Journal of Cleaner Production*, vol. 208, pp. 563-574. ISSN 09596526. DOI 10.1016/j.jclepro.2018.10.075.
- MULLEN, A.M., ÁLVAREZ, C., ZEUGOLIS, D.I., HENCHION, M., O'NEILL, E. y DRUMMOND, L., 2017. Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat Science*, vol. 132, no. February, pp. 90-98. ISSN 03091740. DOI 10.1016/j.meatsci.2017.04.243.
- NOBRE, C.B., SOUSA, E.O., CAMILO, C.J., MACHADO, J.F., SILVA, J.M.F.L., FILHO, J.R., COUTINHO, H.D.M. y COSTA, J.G.M., 2018. Antioxidative effect and phytochemical profile of natural products from the fruits of "babaçu" ( *Orbignia speciosa* ) and "buriti" ( *Mauritia flexuosa* ). , vol. 121, no. August, pp. 423-429.
- NOH, H. y VOGLER, E.A., 2007. Volumetric interpretation of protein adsorption: Competition from mixtures and the Vroman effect. *Biomaterials*, vol. 28, pp. 405-422.
- OCHI, E. y TSUCHIYA, Y., 2018. Eicosahexanoic acid (EPA) and docosahexanoic acid (DHA) in muscle damage and function. *Nutrients*, vol. 10, no. 5, pp. 1-13. ISSN 20726643. DOI 10.3390/nu10050552.
- OFORI, J.A. y HSIEH, Y.P., 2011. Blood-derived products for human consumption. , vol. 01, no. 01, pp. 14-21.

- OFORI, J.A. y HSIEH, Y.P., 2012. The Use of Blood and Derived Products as Food Additives. *Food Aditive*, pp. 230-256.
- OUWERX, C., VELINGS, N., MESTDAGH, M.M. y AXELOS, M.A.V., 1998. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks*, vol. 6, no. 5, pp. 393-408. ISSN 09667822. DOI 10.1016/S0966-7822(98)00035-5.
- OVODOV, Y.S., 2009. Current views on pectin substances. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* [en línea], vol. 35, no. 3, pp. 269-284. ISSN 1068-1620. DOI 10.1134/S1068162009030017. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1134/S1068162009030017>.
- PARÉS, D., TOLDRÀ, M., SAGUER, E. y CARRETERO, C., 2014. *Scale-up of the process to obtain functional ingredients based in plasma protein concentrates from porcine blood*. 2014. S.l.: s.n.
- PARRA, R./U.N. del C., 2011. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Open Journal Systems* [en línea], vol. 63, no. 2, pp. 37055. ISSN 0304-2847. DOI 0304-2847. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/25055/37055>.
- PATIL, J.S., KAMALAPUR, M. V., MARAPUR, S.C. y KADAM, D. V., 2010. Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: the Novel Techniques To Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: a Review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* [en línea], vol. 5, no. 1, pp. 241-248. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Jagadevappa\\_Patil/publication/265991547\\_Ionotropic\\_gelation\\_and\\_polyelectrolyte\\_complexation\\_The\\_novel\\_techniques\\_to\\_design\\_hydrogel\\_particulate\\_sustained\\_modulated\\_drug\\_delivery\\_system\\_A\\_review/links/552fb6c40cf20ea0a](https://www.researchgate.net/profile/Jagadevappa_Patil/publication/265991547_Ionotropic_gelation_and_polyelectrolyte_complexation_The_novel_techniques_to_design_hydrogel_particulate_sustained_modulated_drug_delivery_system_A_review/links/552fb6c40cf20ea0a).
- PORTELLA, M.C., JOMORI, R.K., LEITÃO, N.J., MENOSSI, O.C.C., FREITAS, T.M., KOJIMA, J.T., LOPES, T.S., CLAVIJO-AYALA, J.A. y CARNEIRO, D.J., 2014. Larval development of indigenous South American freshwater fish species , with particular reference to pacu ( *Piaractus mesopotamicus* ): A review. *Aquaculture* [en línea], vol. 432, pp. 402-417. ISSN 0044-8486.

DOI 10.1016/j.aquaculture.2014.04.032. Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.032>.

RALET, M.C., DRONNET, V., BUCHHOLT, H.C. y THIBAUT, J.F., 2001. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: Characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research*, vol. 336, no. 2, pp. 117-125. ISSN 00086215. DOI 10.1016/S0008-6215(01)00248-8.

RAMOS-CLAMONT, G., FERNÁNDEZ-MICHEL, S., CARILLO-VARGAS, L., MARTINEZ-CALDERÓN, E. y VÁSQUEZ-MORENO, L., 2003. Functional Properties of Protein Fractions Isolated from Porcine Blood. *Journal of Food Science*, vol. 68, no. 4.

RATANAVARAPORN, J., RANGKUPAN, R., JEERATAWATCHAI, H., KANOKPANONT, S. y DAMRONGSAKKUL, S., 2010. Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats. *International Journal of Biological Macromolecules* [en línea], vol. 47, no. 4, pp. 431-438. ISSN 0141-8130. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2010.06.008. Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.06.008>.

REGALADO, F., 2018. Potencial acuícola en el Perú. *Moneda*. 2018. pp. 34-39.

RODRIGUES, J.B., LEITÃO, N.J., CHAVES, K.S., GIGANTE, M.L., PORTELLA, M.C. y GROSSO, C.R.F., 2014. High protein microparticles produced by ionic gelation containing *Lactobacillus acidophilus* for feeding pacu larvae. *Food Research International* [en línea], vol. 63, pp. 25-32. ISSN 0963-9969. DOI 10.1016/j.foodres.2014.02.005. Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.005>.

SAIKIA, D., DEKA, J.R., WU, C.-E., YANG, Y.-C. y KAO, H.-M., 2019. pH responsive selective protein adsorption by carboxylic acid functionalized large pore mesoporous silica nanoparticles SBA-1. *Materials Science and Engineering CC*, vol. 94, no. No, pp. 344-356. ISSN 09284931. DOI 10.1016/j.msec.2018.09.043.

SANGUANSRI, M.A.A. and L., 2018. Encapsulation of Bioactives. *Food Research International*. S.l.: s.n., pp. 173-182.

- SCHMITZ, I., GIANFRANCESCO, A., KULOZIK, U. y FOERST, P., 2011. Kinetics of lysine loss in an infant formula model system at conditions applicable to spray drying. *Drying Technology*, vol. 29, no. 16, pp. 1876-1883. ISSN 07373937. DOI 10.1080/07373937.2011.589553.
- SILVA, C.M., RIBEIRO, A.J., FIGUEIREDO, I., GONCALVES, A. y VEIGA, F., 2006. Alginate microspheres prepared by internal gelation : Development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 311, pp. 1-10. DOI 10.1016/j.ijpharm.2005.10.050.
- SOFIA, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO. S.l.: s.n., pp. 1-24.
- SOFIA, 2018. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. S.l.: s.n. ISBN 9789251072257.
- SOULTANI, G., EVAGELIOU, V., KOUTELIDAKIS, A.E., KAPSOKEFALOU, M. y KOMAITIS, M., 2014. *The effect of pectin and other constituents on the antioxidant activity of tea*. 2014. S.l.: s.n.
- SOUZA, F.N., GEBARA, C., RIBEIRO, M.C.E., CHAVES, K.S., GIGANTE, M.L. y GROSSO, C.R.F., 2012. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. *Food Research International* [en línea], vol. 49, no. 1, pp. 560-566. ISSN 09639969. DOI 10.1016/j.foodres.2012.07.041. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.041>.
- SRIAMORNSAK, P., 1998. Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 169, no. 2, pp. 213-220. ISSN 03785173. DOI 10.1016/S0378-5173(98)00129-X.
- STRASDAT, B. y BUNJES, H., 2013. Incorporation of lipid nanoparticles into calcium alginate beads and characterization of the encapsulated particles by differential scanning calorimetry. *Food hydrocolloids* [en línea], vol. 30, no. 2, pp. 567-575. ISSN 0268-005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2012.07.013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.07.013>.
- TELLO, F., FALFAN-CORTÉS, R.N., MARTINEZ-BUSTOS, F., MARTINS DA SILVA, V., HUBINGER, M.D. y GROSSO, C., 2015. *Alginate and pectin-*

*based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties.* 2015. S.l.: s.n.

TESHIMA, S., ISHIKAWA, M. y KOSHIO, S., 2000. Nutritional assessment and feed intake of microparticulate diets in crustaceans and fish. *Aquaculture Research*, vol. 31, no. 8-9, pp. 691-702. ISSN 1355557X. DOI 10.1046/j.1365-2109.2000.00490.x.

TESSER, M. y PORTELLA, M., 2011. Estimulantes alimentares para larvas de pacu. *Revista Brasileira*, vol. 40, no. 9, pp. 1851-1855.

THAKUR, S., CHAUDHARY, J., KUMAR, V. y THAKUR, V.K., 2019. Progress in pectin based hydrogels for water purification: Trends and challenges. *Journal of Environmental Management*, vol. 238, no. March, pp. 210-223. ISSN 10958630. DOI 10.1016/j.jenvman.2019.03.002.

THEVENOT, P., HU, W. y TANG, L., 2008. Surface Chemistry Influence Implant. *Current Topics in Medical Chemistry*, vol. 8, no. 4, pp. 270-280.

THORNE, J.B., VINE, G.J. y SNOWDEN, M.J., 2011. Microgel applications and commercial considerations. *Colloid and Polymer Science*, vol. 289, no. 5-6, pp. 625-646. ISSN 0303402X. DOI 10.1007/s00396-010-2369-5.

THU, B., BRUHEIM, P., ESPEVIK, T., SMIDSROD, O., SOON-SHIONG, P. y SKJAK-BRAEK, G., 1996. Alginate polycation microcapsules I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials*, vol. 17, no. 10, pp. 1031-1040.

TIAN, F., DECKER, E.A. y GODDARD, J.M., 2013. Food & Function Controlling lipid oxidation of food by active packaging. , pp. 669-680. DOI 10.1039/c3fo30360h.

VILLAMAR, D.F. y LANGDON, C.J., 1993. Delivery of dietary components to larval shrimp (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. *Marine Biology*, vol. 115, no. 4, pp. 635-642. ISSN 00253162. DOI 10.1007/BF00349371.

WANG, J., DUMAS, E. y GHARSALLAOUI, A., 2019. Low Methoxyl pectin / sodium caseinate complexing behavior studied by isothermal titration calorimetry. *Food Hydrocolloids*, vol. 88, no. April 2018, pp. 163-169. ISSN



0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2018.10.006.

WANG, W., MA, X., JIANG, P., HU, L., ZHI, Z., CHEN, J., DING, T., YE, X. y LIU, D., 2016. *Characterization of pectin from grapefruit peel: A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions*. 2016. S.l.: s.n.

WANI, A.A., KAUR, D., AHMED, I. y SOGI, D.S., 2008. *Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology*. 2008. S.l.: s.n.

WISMER-PEDERSEN, J., 1988. Use of Haemoglobin in Foods - A review. *Meat Science*, vol. 24, pp. 31-45.

XU, J., LI, T., TAO, F., CUI, Y. y XIA, Y., 2013. Structure Evolution of Gelatin Particles Induced by pH and Ionic Strength. , vol. 281, no. November 2012, pp. 272-281. DOI 10.1002/jemt.22164.

XU, M., WEI, L., XIAO, Y., BI, H. y YANG, H., 2017. Physicochemical and functional properties of gelatin extracted from Yak skin. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 95, pp. 1246-1253.

YE, Q., GEORGES, N. y SELOMULYA, C., 2018. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 78, no. January, pp. 167-179.

ZHANG, Z., ZHANG, R., CHEN, L., TONG, Q. y MCCLEMENTS, D.J., 2015. Designing hydrogel particles for controlled or targeted release of lipophilic bioactive agents in the gastrointestinal tract. *European Polymer Journal*, vol. 72, pp. 698-716. ISSN 00143057. DOI 10.1016/j.eurpolymj.2015.01.013.

ZHU, F., 2017. Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. *Food Chemistry*, vol. 229, pp. 542-552.