



**UNAP**



**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN HUMANA**

**TESIS**

**OPTIMIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS POR METODOLOGÍA  
DE SUPERFICIE DE RESPUESTA CONTENIENDO ACEITE POR  
COACERVACIÓN COMPLEJA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN HUMANA**

**PRESENTADA POR:**

**PAOLA NATHALIA VARGAS PIZANGO**

**ASESORES:**

**BLGA. JESSY PATRICIA VÁSQUEZ CHUMB, MSc**

**ING. DORA ENITH GARCÍA DE SOTERO, Dra.**

**ING. FERNANDO TELLO CÉLIS, Dr.**

**IQUITOS, PERÚ**

**2021**



**UNAP**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**  
Escuela de Formación Profesional de Bromatología y Nutrición  
Humana

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 014-CGT-FIA-UNAP-2021**

A los 22 días del mes de diciembre de 2021, a horas.....11:00 AM....., se conectaron vía Plataforma Zoom, dando inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada "OPTIMIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS POR METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA CONTENIENDO ACEITE POR CONSERVACIÓN COMPLEJA", presentado por la Bachiller **PAOLA NATHALIA VARGAS PIZANGO**, para optar el Título Profesional de Licenciada en Bromatología y Nutrición Humana, que otorga la Universidad de acuerdo a Ley y Estatuto.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N° 0130-FIA-UNAP-2021 del 05 de julio de 2021, está integrado por:

**Ing. ELMER ALBERTO BARRERA MEZA.**  
**Ing. CARLOS ENRIQUE LÓPEZ PANDURO, MSc.**  
**Ing. JORGE LUIS CARRANZA GONZALES, MSc.**

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

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

La sustentación pública y la tesis ha sido:.....APROBADA..... con la calificación BUENA.....

Estando la bachillera apta para obtener el Título Profesional de Licenciada en Bromatología y Nutrición Humana, Siendo las 12:30 PM se dio por terminado el acto de sustentación.

  
-----  
**Presidente**  
Ing. ELMER ALBERTO BARRERA MEZA  
CIP: 116648

  
-----  
**Miembro**  
Ing. CARLOS ENRIQUE LÓPEZ PANDURO, MSc.  
CIP: 31070

  
-----  
**Miembro**  
Ing. JORGE LUIS CARRANZA GONZALES, MSc.  
CIP: 71113

  
-----  
**Asesora**  
Bga. JESSY PATRICIA VÁSQUEZ CHUMBE, MSc.  
CBP: 2564

  
-----  
**Asesora**  
Ing. DORA ENITH GARCIA DE SOTELO, Dra.  
CIP: 21090

  
-----  
**Asesor**  
Ing. FERNANDO TELLO CELIS, Dr.  
CIP: 47489



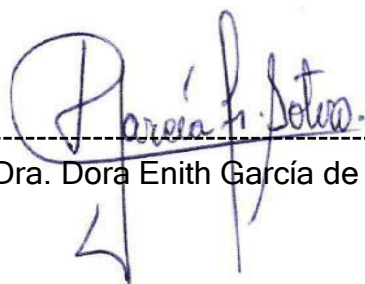
### Autorización de los Asesores

El Doctor Fernando Tello Célis, docente principal adscrito al Departamento de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias y la Dra. Dora Enith García De Sotero, docente principal adscrito al Departamento de Ingeniería de la Facultad de Ingeniería Química y la MSc. Jessy Patricia Vásquez Chumbe adscrito al Departamento de Ciencia y Tecnología de la Facultad de Industrias Alimentarias.

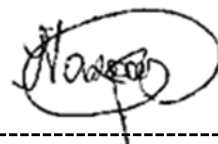
#### INFORMAN:

Que la Bachiller PAOLA NATHALIA VARGAS PIZANGO ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo contenido en la memoria intitulada: **Optimización de micropartículas por metodología de superficie de respuesta conteniendo aceite por *Coacervación Compleja*** 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: Licenciada en Bromatología y Nutrición Humana.

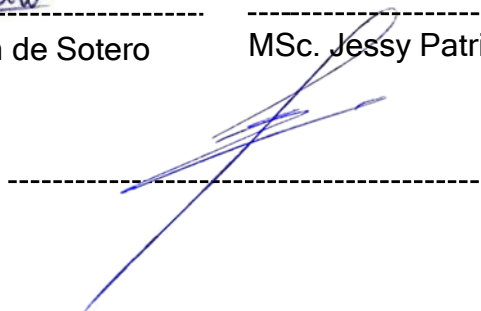
**AUTORIZAMOS:** A la citada Bachiller a presentar el Trabajo Final de carrera, para proceder a su sustentación cumpliendo así con la normativa vigente que regula el Reglamento de Grados y Títulos en la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.



-----  
Dra. Dora Enith García de Sotero



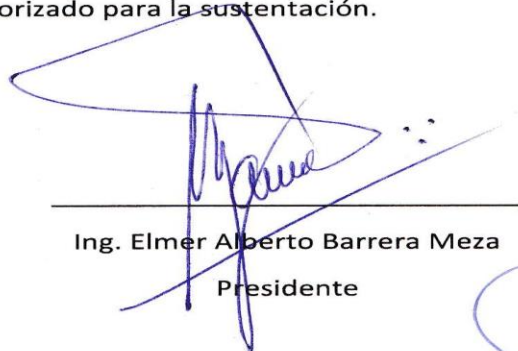
-----  
MSc. Jessy Patricia Vásquez Chumbe



-----  
Dr. Fernando Tello Célis

## JURADO CALIFICADOR

El jurado calificador notifica que el trabajo de investigación **“OPTIMIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS POR METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA CONTENIENDO ACEITE POR COACERVACIÓN COMPLEJA”** de responsabilidad de la bachiller **PAOLA NATHALIA VARGAS PIZANGO**; han sido detalladamente revisados por los miembros del jurado, quedando autorizado para la sustentación.



---

Ing. Elmer Alberto Barrera Meza  
Presidente



---

Ing. Jorge Luis Carranza Gonzales, MSc.

Miembro



---

Ing. Carlos Enrique López Panduro, MSc.

Miembro

## **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.

*Paola Nathalia*

## **AGRADECIMIENTO**

Un especial agradecimiento al **CONCYTEC - PROCIENCIA** por el financiamiento de este trabajo en el marco de la convocatoria E041 - 01 (**Contrato N° 021-2018-FONDECYT-BM-IADT-MU**).

*Paola Nathalia*

## CONTENIDO

<b>JURADO</b>	<b>III</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>V</b>
<b>CONTENIDO</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE 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>4</b>
1.1 Antecedentes	4
1.2 Bases Teóricas	4
1.2.1 Metodología de Superficie de Respuesta	4
1.2.2 Ácidos grasos poliinsaturados	6
1.2.2.1 Aceite de pescado	7
1.2.2.2 Aceite de sachá inchi	8
1.2.3 Microencapsulación de alimentos y nutrientes	9
1.2.4 Técnicas de microencapsulación	10
1.2.4.1 Coacervación simple	10
1.2.4.2 Coacervación Compleja	11
1.2.4.3 Spray drying	12
1.2.5 Materiales de pared	13
2.2.5.1 Goma arábica	13
2.2.5.2 Gelatina	14
1.2.6 Reticulación enzimática	15
1.2.7 Enzima transglutaminasa	16
1.2.8 Oxidación de lípidos	17
1.2.9 Microscopía	18
2.2.8.1 Microscopía óptica	18
2.2.8.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	18
1.3 Definición de términos básicos	19
<b>CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES</b>	<b>21</b>
2.1 Formulación de la hipótesis	21
2.2 Variables y su Operacionalidad	21
2.2.1 Variables independientes	21
2.2.2 Variables dependientes	21
2.2.3 Tabla 1. Operacionalidad de variables	22
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b>	<b>23</b>

<b>3.1</b>	<b>Material y equipos</b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Métodos</b>	<b>24</b>
3.1	Tipo y diseño de estudio	24
3.2	Condiciones para la optimización de la producción de micropartículas	24
<b>3.3</b>	<b>Diseño muestral</b>	<b>26</b>
<b>3.4</b>	<b>Procedimientos de recolección de datos</b>	<b>26</b>
<b>3.5</b>	<b>Procesamiento y análisis de los datos</b>	<b>27</b>
<b>3.6</b>	<b>Métodos analíticos</b>	<b>27</b>
<b>3.7</b>	<b>Caracterización de los materiales</b>	<b>27</b>
3.7.1	Determinación de humedad y cenizas	27
3.7.2	Determinación de proteína	27
3.7.3	Perfil de ácidos grasos	27
<b>3.8</b>	<b>Producción de micropartículas por coacervación compleja</b>	<b>28</b>
3.8.1	Reticulación de micropartículas con enzima transglutaminasa	28
3.8.2	Caracterización de las micropartículas	29
3.8.2.1	Secado	29
3.8.2.2	Determinación de lípidos	29
3.8.2.3	Eficiencia de encapsulación (EE)	29
3.8.2.4	Microscopia óptica y microscopia electrónica de barradura	30
3.8.2.5	Solubilidad de las micropartículas	30
3.8.2.6	Higroscopicidad de las micropartículas	31
3.8.3	Resistencia de las micropartículas reticuladas	31
3.8.3.1	Hinchamiento de las micropartículas	31
3.8.3.2	Resistencia de las micropartículas en soluciones conteniendo SDS	31
3.8.3.3	Resistencia de las micropartículas a diferentes temperaturas	31
3.8.3.4	Resistencia de las micropartículas a diferentes condiciones de pH	32
3.8.3.5	Resistencia de las micropartículas a la acción de las enzimas digestivas	32
3.8.4	Determinación de peróxidos del aceite libre y microencapsulado	33
<b>3.9</b>	<b>Procesamiento y análisis de los datos</b>	<b>34</b>
<b>3.10</b>	<b>Aspectos éticos</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterización de materiales encapsulantes</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Perfil de ácidos grasos de aceite de pescado</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Diseño experimental de producción de micropartículas por coacervación compleja</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Selección del modelo apropiado para eficiencia de encapsulación en micropartículas por coacervación compleja</b>	<b>38</b>



4.5	Optimización de eficiencia de encapsulación de aceite en micropartículas por coacervación compleja	42
4.6	Eficiencia de encapsulación de aceite en micropartículas producidas por	
4.7	coacervación compleja	43
4.8	Producción de micropartículas optimizadas por coacervación compleja.	44
4.9	Caracterización de micropartículas coacervadas conteniendo aceite	44
4.10	Morfología y microestructura de micropartículas coacervadas con y sin reticulación	45
4.11	Tamaño de micropartículas con y sin reticulación enzimática	48
4.12	Reticulación de micropartículas húmedas conteniendo aceite con enzima transglutaminasa	48
4.13	Resistencia de las micropartículas a efectos de temperatura	49
4.14	Resistencia de las micropartículas al hinchamiento	52
4.15	Resistencia de las micropartículas a diferentes condiciones de pH	53
4.16	Resistencia de las micropartículas en soluciones de SDS 2% y 5%	54
4.17	Estudio de eficiencia de la reticulación en condiciones gástricas (pH ácido y pepsina)	55
4.18	Estabilidad oxidativa del aceite libre y microencapsulado por coacervación compleja sin y con reticulación enzimática	57
4.19	Humedad	59
4.20	Solubilidad de las micropartículas	60
4.21	Higroscopicidad de las micropartículas	60
	<b>CAPITULO VI: CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
	<b>CAPITULO VI: RECOMENDACIONES</b>	<b>62</b>
	<b>CAPÍTULO VII: FUENTES DE INFORMACIÓN</b>	<b>63</b>

## Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 2.1 Operacionalidad de variables	22 Tabla
3.1 Variables experimentales utilizadas en este estudio	25
Tabla 3.2 Factores analíticos y niveles para MSR	25 Tabla
3.3 Condiciones ensayadas	26 Tabla 4.1
Condiciones de reticulación	35
Tabla 4.2 Composición centesimal de materiales encapsulantes	36 Tabla
4.3 Perfil de ácidos grasos de aceite de pescado	37
Tabla 4.4 Condiciones operativas ensayadas y resultado experimental de micropartículas producidas por coacervación compleja	38
Tabla 4.5 Regresión de superficie de Respuesta: EE vs. pH; Aceite. Análisis de Varianza	39
Tabla 4.6. Resumen del Modelo de Eficiencia de encapsulación de micropartículas por Coacervación compleja	40
Tabla 4.7. Análisis de la varianza para la variable de eficiencia de encapsulación de micropartículas por coacervación compleja	42
Tabla 4.8. Coeficiente de variación para predecir la eficiencia de encapsulación de micropartículas por coacervación compleja	43
Tabla 4.9. Composición centesimal (Base Seca) de micropartículas coacervadas conteniendo aceite	45
Tabla 4.10. Tamaño de micropartículas coacervadas conteniendo aceite	48

## Índice de Figuras

	Pág.
Figura 2.1 Estructura química de la gelatina.	15
Figura 4.1 Superficie de respuesta de la eficiencia de encapsulación de micropartículas por coacervación compleja	40
Figura 4.2 Gráfico de contorno de la eficiencia de encapsulación de micropartículas por coacervación compleja	40
Figura 4.3 Valores observados vs Valores predichos de la eficiencia de encapsulación de micropartículas por coacervación compleja	41
Figura 4.4 Diagrama de Pareto de las variables	41
Figura 4.5 A. Superficie de respuesta del valor deseable de la eficiencia de encapsulación de micropartículas por <i>coacervación compleja</i> . B. Gráfico de contorno del valor deseable de la eficiencia de encapsulación de micropartículas por coacervación compleja	44
Figura 4.6 Imágenes de morfología de micropartículas coacervadas húmedas obtenida por microscopía óptica	45
Figura 4.7 Imágenes de microestructura de las micropartículas coacervadas liofilizadas obtenida por microscopía electrónica de barradura	46
Figura 4.8A Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de una hora de suspensión bajo acción de temperatura obtenida por microscopía óptica	50
Figura 4.8B Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de una hora de suspensión bajo acción de temperatura obtenida por microscopía óptica	51
Figura 4.9 Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de una hora de suspensión bajo acción de temperatura obtenida por microscopía óptica	52
Figura 4.10 Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de una hora de suspensión bajo acción de temperatura obtenida por microscopía óptica	54
Figura 4.11 Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de someter a soluciones de SDS	55

Figura 4.12 Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de someter a soluciones de SDS	56
Figura 4.13 Índice de peróxido de aceite libre y encapsulado almacenado por cuatro semanas a 45 °C	59

## Índice de abreviaturas

**AOAC** : Association of official analyted chemistry

**DCCR** : Diseño compuesto central rotacional

**DBB** : Diseño Box - Behnken

**DCA** : Diseño compuesto aleatorizado

**SDS**: Dodecil sulfato de sodio

**AGP**: Ácidos grasos poliinsaturados

**EPA**: Ácido eicosapentaenoico

**DHA**: Ácido docohexaenoico

**DE-MSR**: Diseños experimentales - Metodología por superficie de respuesta

**PAS**: Proteína aislada de soya

**QS**: Quitosano

**AG**: Ácidos grasos

**ALA**: Ácidos alfa linolénico

**LA**: Ácido linoleico

**AA**: Ácido araquidónico

**GB**: Gelatina tipo B

**TG**: Transglutaminasa

**G-L**: Enlaces de lisina

**MTG**: Transglutaminasa microbiana

**MEB**: Microscopia electrónica de Barrido

**EE**: Eficiencia de encapsulación

## RESUMEN

Las micropartículas producidas por coacervación compleja es un proceso mediante el cual se utiliza como par polimérico gelatina y goma arábica para la formación de una pared resistente con el fin de proteger un material sensible, en este caso el aceite a diferentes aspectos físicos y químicos. En este trabajo de investigación las micropartículas fueron optimizadas utilizando el diseño Box-Behnken mediante la técnica de Metodología de Superficie de Respuesta, obteniendo como resultado óptimo de 2.5 gr de cada uno de los materiales de pared (gelatina y goma arábica) y 1.25 gr de material determinante (aceite). El proceso de producción fue desarrollado en cinco etapas: 1) solución de gelatina y goma arábica a 50 °C, 2) emulsión con aceite de pescado, 3) formación de coacervados a un pH 4, 4) endurecimiento de los coacervados y 5) reticulación de la pared con la enzima transglutaminasa (10 a 50U / g.ptn). Debido a la reticulación de micropartículas se evaluó la capacidad de hinchamiento, resistencia a la solución de dodecil sulfato de sodio (SDS, 2 y 5%), temperaturas (65, 75, 85 y 95 ° C), valores de pH 2, 8 y resistencia a una simulación gastrointestinal e intestinal. Además, se evaluó la morfología y microestructura por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido Las micropartículas son de una forma esférica y tamaño en el rango de 54-62  $\mu\text{m}$ , con gotas de aceite distribuido de forma multinuclear. Las micropartículas reticuladas con transglutaminasa resistieron a las temperaturas evaluadas, a soluciones de 2% y 5% de SDS y condiciones drásticas de pH, mientras que las micropartículas no reticuladas se destruyeron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Cabe resaltar que todas las micropartículas reticuladas con la enzima se destruyeron en las simulaciones gastro-intestinales (pH, pancreatina y temperatura. Los mejores resultados de resistencia física de las micropartículas fueron las reticuladas con 50U de transglutaminasa. Finalmente, la última parte de la investigación se realizó el estudio de protección frente a la oxidación lipídica usando las micropartículas reticuladas con 50U, donde estas nos dieron resultados óptimos y satisfactorios para el trabajo de investigación.

*Palabras clave:* coacervación compleja, resistencia física, transglutaminasa

## ABSTRACT

The microparticles produced by complex coacervation is a process by which gelatin and gum arabic are used as a polymeric pair for the formation of a resistant wall in order to protect a sensitive material, in this case oil, to different physical and chemical aspects. In this research work, the microparticles were optimized using the Box-Behnken design through the Response Surface Methodology technique, obtaining as an optimal result 2.5 gr of each of the wall materials (gelatin and gum arabic) and 1.25 gr of determining material (oil). The production process was developed in five stages: 1) solution of gelatin and gum arabic at 50 ° C, 2) emulsion with fish oil, 3) formation of coacervates at pH 4, 4) hardening of the coacervates and 5) wall crosslinking with the enzyme transglutaminase (10 to 50U / g.ptn). Due to the crosslinking of the microparticles, the swelling capacity, resistance to sodium dodecyl sulfate solution (SDS, 2 and 5%), temperatures (65, 75, 85 and 95 ° C), pH values 2, 8 were evaluated. and resistance to a gastrointestinal and intestinal simulation. Furthermore, the morphology and microstructure were evaluated by optical microscopy and scanning electron microscopy. The microparticles are spherical in shape and size in the range of 54-62 µm, with oil droplets distributed in a multinuclear manner. The transglutaminase cross-linked microparticles withstood the evaluated temperatures, 2% and 5% SDS solutions and drastic pH conditions, while the non-cross-linked microparticles were destroyed under the same conditions described above. It should be noted that all the microparticles cross-linked with the enzyme were destroyed in the gastro-intestinal simulations (pH, pancreatin and temperature. The best results of physical resistance of the microparticles were those cross-linked with 50U of transglutaminase. Finally, the last part of the investigation The study of protection against lipid oxidation was carried out using the microparticles crosslinked with 50U, where these gave us optimal and satisfactory results for the research work.

*Key words:* complex coacervation, physical resistance, transglutaminase

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, diversos estudios han demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) omega 3 y 6 tienen un rol fundamental en la promoción de la salud y en la reducción del riesgo de enfermedades no transmisibles (Calder 2008). Si bien es cierto, el aceite de pescado es considerado como la principal fuente de AGP de cadena larga (Shahidi y Ambigaipalan 2018), en los últimos años, fuentes vegetales de AGP, como el aceite de sacha inchi ha ganado gran interés, debido a su proporción ideal de ácido linolénico (ALA, C18:3,  $\omega$ -3, 46.8-40.8%) y ácido linoleico (LA, C18:2,  $\omega$ -6, 33.4-36.2) (Wang, Zhu y Kakuda 2018). El ALA presente en el aceite puede ser convertido en ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docohexanoico (DHA), siendo una gran alternativa al aceite de pescado, teniendo como ventaja la ausencia del sabor y olor desagradable característico del aceite de pescado (Valenzuela et al. 2014).

No obstante, la utilidad y biodisponibilidad de los AGP en la industria alimentaria es cada vez más un desafío, debido a la susceptibilidad de oxidación principalmente por la exposición al aire, luz y temperatura elevada (Wang, Adhikari y Barrow 2014), lo cual, produce metabolitos tóxicos para el ser humano y características organolépticas indeseables (Timilsena et al. 2017).

Ante ello, la microencapsulación se constituye una alternativa ideal para la protección de bioactivos sensibles, el cual se define como el proceso donde un núcleo ya sea en estado sólido, líquido o gaseoso es atrapado dentro de una matriz resistente, aislandolo de condiciones adversas del medio, como el pH, oxígeno, luz, temperatura, entre otros (Comunian y Favaro-Trindade 2016). La coacervación compleja es una técnica de microencapsulación ampliamente utilizada en la industria alimentaria, debido a su simplicidad y alta eficiencia de encapsulación (Espinosa-Andrews et al. 2007). Esta técnica se basa en la interacción asociativa entre polímeros con carga opuesta, generalmente proteínas y polisacáridos, siendo hasta la fecha, la gelatina y la goma arábiga el par polimérico más utilizado (Schmitt y Turgeon 2011; Weinbreck, Minor y Kruif 2004).



No obstante, las micropartículas producidas por coacervación compleja son conocidas por su fragilidad ante ciertas condiciones, por lo que, agentes reticulantes como la transglutaminasa han sido utilizados para obtener estructuras más resistentes (Comunian et al. 2016). Debido a que produce entrecruzamientos inter e intramoleculares entre dos residuos aminos de las proteínas (De Jong y Koppelman 2002), mejorando así las propiedades reológicas y físicas del gel, además de producir cambios en las moléculas de proteína presentes en la matriz alimentaria, sin afectar su calidad sensorial y nutricional (da Silva et al. 2019).

Por otro lado, la aplicación de diseños experimentales combinados con la metodología superficie respuesta (DE-MSR) ayudan a mejorar la eficiencia en la preparación de las muestras y de la producción, debido a que, como son metodologías multivariadas, durante el proceso consideran todas las variables y sus posibles interacciones (Coelho et al. 2019). Y así, el uso de estas estrategias permite obtener mayor información con un número reducido de ensayos experimentales en un tiempo menor, además de reducir el consumo de reactivos (Myers et al. 2004)

Por lo que, el objetivo del presente trabajo de investigación fue optimizar la eficiencia de encapsulación de micropartículas de gelatina y goma arábica producidas por coacervación compleja conteniendo aceite de pescado, empleando como herramienta la metodología de superficie de respuesta con la finalidad de hacer uso razonable de los materiales. Por lo que, para llegar a ese objetivo es necesario plantearse dos interrogantes que servirán de base para la ejecución de la investigación. Donde, la primera hipótesis, fue optimizar la eficiencia de encapsulación utilizando la metodología de superficie de respuesta (Carneiro et al. 2013). La segunda hipótesis fue que el aceite contenido en micropartículas reticuladas con transglutaminasa soportaría las condiciones del proceso y tendría baja generación de peróxidos (Chen et al. 2019).

Siendo los objetivos específicos los siguientes: Optimizar y caracterizar las micropartículas producidas por coacervación compleja con o sin reticulación en cuanto al tamaño, morfología y microestructura. Reticular las micropartículas coacervadas utilizando la enzima transglutaminasa a diferentes concentraciones con el objetivo de endurecer o reforzar las paredes de las micropartículas.

Cuantificar la eficiencia de encapsulación y estudiar por medio de la microscopia óptica, el comportamiento de las micropartículas reticuladas, sobre diferentes efectos ante la acción de: solución acuosa de SDS, pH, temperatura, enzimas digestivas.

## **CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Antecedentes**

La microencapsulación provee el medio ideal para la protección de ácidos grasos poliinsaturados sensibles al deterioro oxidativo (Velasco, Dobarganes y Márquez-Ruiz 2003). Debido a esto, en los últimos años el interés en el área de microencapsulación de aceites se ha visto incrementado, siendo reportados diversos trabajos de investigación.

En trabajo reciente de Yuan et al. (2017), exploraron la interacción de proteína aislada de soya (PAS) y quitosano (QS) como materiales de pared para encapsular aceite de algas mediante coacervación compleja. Donde, las micropartículas producidas con PAS y QS conjuntamente mostraron mayor estabilidad oxidativa comparado a las que sólo fueron producidas con PAS.

Por otro lado, Yuan et al. (2014), utilizó hidrocoloides (quitosano, goma arábica, y genipina) para encapsular aceite de vainilla mediante coacervación compleja, con el objetivo de mejorar la termoestabilidad y retención del sabor del aceite de vainilla.

### **1.2. Bases Teóricas**

#### **1.2.1 Metodología de Superficie de Respuesta**

Box y Wilson (1951) introdujo por primera vez la MSR, utilizando un modelo polinomial de segundo grado, que, inicialmente fue desarrollada con el objetivo de determinar las situaciones operativas óptimas en procesos químicos. No obstante, hoy en día se aplica en diferentes campos y aplicaciones no solo en ingeniería y física, sino también en la ciencia biológica, social y clínica (Zahraee et al. 2013).

La MSR puede ser definida como un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas útiles para desarrollar, mejorar y optimizar procesos (Myers et al. 2004). El principio básico de este método es determinar ecuaciones modelos que describan las interrelaciones entre variables dependientes e independientes (Rafieian, Keramat y Kadivar 2013), brindando respuestas estadísticamente confiables en menor tiempo y reduciendo el número requerido de pruebas experimentales (Bas y Boyaci 2007; Kurunczi et al. 2008). Los resultados se obtienen de un análisis de regresión bien diseñado que se basa en los valores

controlados de variables independientes. A partir de entonces, la variable dependiente se puede predecir en función de los nuevos valores de las variables independientes.(Mohamad Said y Mohamed Amin 2016).

Cuando se aplica el método MSR en el proceso de optimización dentro de la industria alimentaria, solo se requiere un corto período de tiempo para comprobar las variables relacionadas con la evaluación del consumidor, lo cual, hace más eficiente la etapa experimental. Además, la estimación de parámetros identifica las variables que están afectando la modelo, lo que ayuda al investigador a enfocarse en aquellas variables que favorecen a la aceptación del producto (Mohamad Said y Mohamed Amin 2016).

Y así, con el objetivo de aplicar MSR como herramienta de optimización se tiene que seguir los siguientes pasos: 1. Selección de las variables independientes más importantes y su nivel en el sistema mediante estudios de proyección. 2. Elección del diseño experimental y desarrollo de los experimentos de acuerdo a la matriz experimental seleccionada. 3. Desarrollo matemático estadístico de la información experimental obtenida a través del ajuste de una función polinomial. 4. Evaluación de la adecuación del diseño. 5. Verificación de la necesidad y posibilidad de realizar un desplazamiento en dirección a la región óptima; y la obtención de los valores óptimos para cada variable (Bashir et al. 2015)

El diseño Box-Behnken (DBB), es una de los métodos de MSR, basado en un diseño factorial incompleto de tres niveles (Ferreira et al. 2007 ; Souza, Gurak y Marczak 2017). Lo cual involucra tres pasos: (1) diseño rotativo compuesto central (DRCC), (2) respuesta modelada de superficie mediante análisis de regresión, y (3) factor de proceso optimización utilizando los modelos de superficie de respuesta. 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).

Los experimentos que utilizan el método de Box Behnken se pueden calcular mediante la siguiente fórmula:

$$N=2k(k-1)+C0(8)$$

Donde  $k$  representa al número factorial; mientras que  $C_0$  es el número de réplicas del punto central, este último, ayuda a estimar el error puro y permite el cálculo de niveles intermedios de la función de respuesta (Prakash Maran et al. 2013).

### 1.2.2 Ácidos grasos poliinsaturados

En la actualidad, el consumo habitual de los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) ha sido relacionado con la prevención y el tratamiento de diversas patologías, tales como, enfermedades cardiovasculares, mentales, inflamatorias, y algunos tipos de cáncer (Nogueira et al. 2019).

Los ácidos grasos (AG) son ácidos carboxílicos saturados o insaturados con cadenas de carbono que oscilan entre 2 y 36 átomos de carbono. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) se caracterizan por configuración de pentadieno de dobles enlaces (Tvrzicka et al. 2011). Los cuales, pueden ser clasificados de acuerdo con la ubicación del primer doble enlace, donde la diferencia entre ellos es expresada por el número de omega. Los compuestos más conocidos entre los AGP son las familias omega-3 y omega-6, para el primero, el doble enlace se encuentra en el tercer carbono al extremo de la cadena de metilo. En cambio, para el omega-6 el primer doble enlace se presenta en el sexto carbono (Sokoła-Wysoczańska et al. 2018).

Dentro de la familia de los ácidos omega-3, los principales representantes son el ácido alfa linolénico (ALA, C18:3, n-3), ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5, n-3) y docosahexaenoico Los ácidos (DHA, C22:6, n-3). Mientras que en la familia de los ácidos omega-6, tenemos al ácido linoleico (LA, C18:2 n-6), ácido dihomo-gamma-linolénico (ADGL, C20:3,n-6) y ácido araquidónico (AA, C20: 4 n-6) (Itsiopoulos et al. 2018). Tanto el ALA como el LA, son AG de cadena corta catalogados como esenciales, debido a que el el cuerpo humano no puede sintetizarlo de nuevo, y se consideran ácidos grasos parentales para las familias de AGP n-3 y n-6 (Tvrzicka et al. 2011). Según Dietitians of Canada (2013), el requerimiento diario de ALA varía entre 1.1 y 1.6 g según la edad y el sexo. Por su parte, La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación recomienda la ingesta de 0.5-0.6% ALA por día, para la prevención de síntomas de deficiencia en adultos, con una ingesta total de PUFA  $\omega$ -3 de 0.5 a 2% (FAO 2010). A su vez, el ALA es considerada un precursor de la síntesis

de AGP omega-3 de cadena larga como el EPA y el DHA, no obstante, este proceso es limitado, teniendo una tasa de conversión máxima de 4%. Por lo que, el aporte de ácidos grasos omega-3 de cadena larga en la alimentación diaria es de vital importancia (Shahidi y Ambigaipalan 2018).

Los peces marinos y las semillas y hojas de algunas plantas son la mayor fuente de AGP (Prasad et al. 2017). En fuentes dietarias de ALA se encuentra el grano de soya (*Glycine max*), linaza (*Linum usitatissimum*), semillas de grosella negra (*Ribes nigrum*) y hojas de borraja (*Borago officinalis*). Por otro lado, sus metabolitos EPA y DHA, pueden ser obtenidos de peces marinos y de sus aceites, los cuales son fuentes excelentes, donde una porción de pescado (150 gr) puede contener alrededor de 2gr de EPA además de DHA (Saini y Keum 2018).

Por otro lado, a pesar de los múltiples beneficios que los AGP ofrecen, poseen una estructura química inestable lo que los hace sensibles a la oxidación, isomerización, polimerización y pérdida de compuestos volátiles cuando son sometidos a factores externos como humedad, oxígeno, luz y temperatura (Shahidi y Ambigaipalan 2018).

#### 1.2.2.1 Aceite de pescado

El pescado es considerado como la mayor fuente de AG de cadena larga n-3 (como el EPA y el DHA), por lo que ha sido ampliamente utilizada en la industria, para la obtención de aceites concentrados ricos en estos (Rubio-Rodríguez et al. 2010). Siendo de gran interés, debido a que diversos estudios han demostrado que entre los omega 3, los más beneficiosos son el EPA y el DHA pues poseen propiedades antiinflamatorias (Pal et al. 2018), previenen ciertos tipos de cánceres (Fuentes et al. 2018), y tienen el potencial de mejorar la salud cardiovascular (Ciriminna et al. 2017). Así mismo, han demostrado ser efectivos para disminuir síntomas de la artritis reumatoide y bajar la dosis de AINES (Calder 2008). Además, protegen contra diferentes trastornos psicológicos, la depresión y el trastorno por déficit de atención (Sinn, 2007).

Los peces marinos tienen un mayor contenido de AGP n-3 que los peces de piscicultura, debido a que se alimentan del fitoplancton y zooplancton ricos en AGP n-3, en cambio, la alimentación de los peces de piscifactoría se basa

en alimentos hechos de cereales y aceites vegetales conteniendo más AGP n-6. A su vez, los AGP ayudan a los peces a adaptarse a las bajas temperaturas del mar (Saini y Keum 2018). Es por esto que el EPA y DHA son más frecuentes en los pescados grasos, por lo que, los suplementos de aceite de pescado usualmente contienen entre un 30% y un 50% de ácidos grasos  $\omega$ -3 (Van Dael 2021).

No obstante, el consumo de aceite de pescado como tal es limitado, pues en algunos sectores de la población su consumo es bajo, debido a diversos factores como, cultura, hábitos alimenticios, disponibilidad y por el desagradable olor y sabor que posee. Sumado a esto, son especialmente sensibles a la degradación oxidativa, lo que hace que su incorporación a productos sea limitada (Lytle et al. 2009; Jurić et al. 2020). Inclusive, niveles bajos de oxidación modifican el sabor del aceite, lo cual, causa problemas sensoriales en alimentos y bebidas. Por ello, mejorar las características organolépticas de productos enriquecidos con aceite de pescado y promover su consumo, es el desafío que enfrenta la industria de alimentos en estos días (Kampa et al. 2007).

Por lo que, hasta la fecha se han utilizado varias estrategias para prevenir la oxidación lipídica en alimentos fortificados con omega-3, siendo la encapsulación (en productos de emulsiones líquidas y polvo seco) el enfoque más exitoso y concreto (Hansen 2002).

Por otro lado, los procesos convencionales para la obtención de aceite de pescado incluyen 2 etapas: la extracción del aceite desde la matriz cruda y el refinamiento. Hoy en día, existen nuevos procesos para la obtención de concentrados de omega-3 para la industria farmacéutica y alimentaria, los cuales, incluyen métodos enzimáticos y métodos que emplean fluidos supercríticos (Rubio-Rodríguez et al. 2010).

#### 1.2.2.2 Aceite de sachá inchi

El sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), también conocido como “maní salvaje”, “oro inka” o “cacahuate inca”, es una planta oleaginosa de la familia Euphorbiaceae nativa de la Amazonía peruana (Vicente et al. 2015; Kumar et al. 2014). El uso de esta planta data desde hace siglos, siendo parte de la dieta de los nativos de la región amazónica, y actualmente experimenta una gran expansión en varios países de América y en algunos países orientales como

Tailandia, China y Vietnam (Gutiérrez et al. 2017). Debido a la alta cantidad y calidad de los aceites contenidos en sus semillas, siendo considerado como un alimento funcional de origen natural (Gutiérrez 2019).

El aceite de sacha inchi, es el principal producto comercial obtenido de la planta, el cual, se obtiene al prensar las semillas de sacha inchi, siendo de alto valor comercial debido a sus excelentes propiedades nutritivas (Gutiérrez 2019), Pues, presentan altos contenidos de ácidos grasos esenciales como el  $\alpha$ -linolenico (ALA, C18:3, omega-3) y linoleico (LA, C18:2, omega-6), variando entre 47 a 51%, y 34 y 37%, respectivamente; constituyendo de 80% a 85% del contenido total de ácidos grasos (Rave, Echeverri y Salamanca 2019). Aunque, también presentan proporciones menores de otros ácidos grasos como el oléico, palmítico y esteárico (Gutiérrez et al. 2017). Esta combinación única de ácidos grasos, hace de este aceite una excelente fuente de omegas 3 y 6, que al ser consumido con regularidad produce un efecto hipocolesterolémico e inflamatorio en el organismo, resultando beneficioso para la salud cardiovascular (Garmendia, Pando y Ronceros 2011). Además contienen, proteínas, saponinas, terpenoides, tocoferoles, fitoesteroles (REF), compuestos fenólicos (flavonoides), aminoácidos esenciales, minerales, vitaminas E y otros compuestos que le otorgan actividad antioxidante y antiproliferativas (Kumar et al. 2014; Chirinos et al. 2013; Medina-Mendoza et al. 2021). Asimismo, el aceite de sacha inchi presenta excelentes características sensoriales y se caracteriza por su sabor floral (Rodríguez et al. 2021).

Todas estas características, justifican el creciente interés de la ciencia al desarrollar diversos estudios sobre sus beneficios y su aplicación a matrices alimentarias (Muñoz 2013; Wang, Zhu y Kakuda 2018; da Silva Soares, Pinto, et al. 2019).

### 1.2.3 Microencapsulación de alimentos y nutrientes

La microencapsulación es el proceso que se basa en la formación de una estructura multicomponente donde se atrapa compuestos activos de interés (núcleo) dentro de un material de pared, formando una barrera entre el compuesto y el medio ambiente (Sánchez et al. 2016). A su vez que lo protege ante condiciones adversas como calor, humedad, oxígeno, pH; aumentando su estabilidad y vida útil (Pareta et al. 2014). En la industria alimentaria es utilizada,



para proveer resistencia y estabilidad a productos alimenticios durante el procesamiento, empaquetamiento y almacenamiento, y, por ende, logrando la optimización del sabor, aroma y valor nutritivo (da Silva Soares, Siqueira, et al. 2019).

Los productos resultantes de las diferentes técnicas de microencapsulación son matrices poliméricas denominadas micropartículas, aunque también existen otros términos como, microesferas, microcápsulas, microperlas, entre otros. No obstante, el término a utilizar depende de las características de la matriz en cuanto a su dimensión (promedio de 0.5 - 1000  $\mu\text{m}$ ), estructura y aplicación (Chang, Stone y Nickerson 2018).

Esta tecnología se introdujo por primera vez la década de 1950 por Green y Schleicher, mediante un registro de patente de la preparación de microcápsulas conteniendo tintes para ser incorporados al papel copia (Paulo y Santos 2017). Si bien es cierto, actualmente es empleada principalmente por la industria farmacéutica (68%), la industria alimentaria (13%) se encuentra en segundo lugar debido a la alta demanda de productos funcionales fortificados por parte de la población (Paulo y Santos 2021).

#### 1.2.4 Técnicas de microencapsulación

##### 1.2.4.1 Coacervación simple

La coacervación simple es un fenómeno en la que la adición de una sustancia inductora reduce la hidratación de una solución coloidal hidrofílica, dando como resultado la formación de dos fases, una es rica en moléculas coloidales (coacervado) y la otra es pobre en ellos (Shimokawa et al. 2013; Ocak, Gülümser y Baloğlu 2012). En este caso, a diferencia de la coacervación compleja, solo un biopolímero está involucrado, siendo el más utilizado la gelatina (GE), ya que es un polianfolito, que presenta cargas positivas y negativas constituyendo aproximadamente el 22 % de la longitud de la cadena del colágeno desnaturalizado, ideal para este tipo de procesos (Gu et al. 2010).

Generalmente, el sulfato de sodio o el etanol funcionan como inductores y promueven coacervación a través de la neutralización secuencial del auto carga de moléculas de gelatina que son en su mayoría intermoleculares. Como por ejemplo, cuando el sulfato de sodio se agrega gradualmente una solución de

gelatina en agitación, se forma un coacervado (Ocak, Gülümser y Baloğlu 2012). Dentro de todos los estudios realizados, se sabe muy poco sobre la cinética, el enfoque teórico integral que abarca la comprensión de separación de fases, la descomposición espinodal y la falta de sinéresis en la coacervación simple (Gupta y Bohidar 2005).

La principal ventaja de la coacervación simple en cuanto a otros métodos es que permite fácilmente la producción de microcápsulas que contienen sustancias hidrófobas, como los aceites esenciales (Lazko, Popineau y Legrand 2004).

#### 1.2.4.2 Coacervación Compleja

La palabra "coacervación" fue introducida por Bungenberg de Jong y Kruyt y deriva del latín "acervus", que significa agregación (un montón), y el prefijo "co", que significa juntos. "Coacervación" significa la unión de las partículas coloidales (Jong y Kruyt 1930). Actualmente, la coacervación compleja es uno de los métodos de microencapsulación más utilizados, y se refiere al sistema donde, un solvente que, conteniendo dos biopolímeros (generalmente proteínas y polisacáridos) con cargas iónicas opuestas, interaccionan electrostáticamente y forman complejos (Ma et al. 2019). Dando lugar a dos fases líquidas inmiscibles: una densa, rica en polímeros; y la otra, una fase de equilibrio que es pobre en polímeros (Jun-xia, Hai-yan y Jian 2011; Girard, Turgeon y Gauthier 2002). Los complejos coacervados pueden ser afectados por factores como el pH, la concentración, proporción y peso molecular de los biopolímeros, fuerza iónica, temperatura y homogeneización (Rios-Mera et al. 2019).

Comparado con otras técnicas de microencapsulación tradicionales como el *spray drying*, las ventajas de esta técnica incluyen, la producción de micropartículas con baja superficie de aceite, capacidad de carga de mayor al 50%, es decir, micropartículas estables con alto contenido de aceite (Kaushik et al. 2015). Asimismo, estas micropartículas poseen excelentes características para la liberación controlada y son resistentes al calor (Jun-xia, Hai-yan y Jian 2011). Este método es reproducible a escala industrial, y puede ser llevado a cabo en condiciones suaves y no necesita solventes tóxicos (Se 2004).

La coacervación compleja exhibe un gran potencial para aplicación industrial en la producción de ingredientes alimentarios multifuncionales, tratamiento y procesamiento de alimentos, residuos y lodos activados, microencapsulación, purificación de proteínas y biomateriales (Schmitt et al. 1999). Por lo que hasta la fecha, este método ha sido utilizado para microencapsular diferentes tipos de aceites que incluyen al de pescado, algas, oliva, girasol, lavanda, vainilla, etc. (Bakry et al. 2016).

#### 1.2.4.3 *Spray drying*

El *spray-drying* es una técnica que consiste en la transformación de un fluido en un polvo seco efecto de la atomización en una corriente de gas de secado caliente que usualmente es aire (Sosnik y Seremeta 2015). Actualmente, este proceso simple, versátil y económico es utilizado por la industria alimentaria y farmacéutica para la producción de una amplia gama de micropartículas basadas en la naturaleza inicial del líquido atomizado en dispersión (Mohd Yusop, Manaf y Hamzah 2017). Donde, la solución líquida conteniendo el agente de recubrimiento y el compuesto de interés se transforman en polvos secos de micropartículas. Las cuales, son de alto rendimiento, alta calidad, baja actividad de agua, estables, de fácil manejo y almacenamiento (Munin y Edwards-Lévy 2011).

De acuerdo a Bakry et al. (2016), la encapsulación por *spray drying* consiste de cuatro pasos fundamentales: (1) preparación de una emulsión estable; (2) homogeneización de la dispersión; (3) atomización de la emulsión; y (4) deshidratación de las micropartículas atomizadas. Generalmente, el primer paso se realiza disolviendo el material de pared con agua destilada y emulsionando o dispersando con la ayuda de un agitador magnético a 25 °C durante toda la noche, para promover saturación de las moléculas del biopolímero y evitar variaciones a causa de la temperatura. Luego, es posible adicionar el compuesto de interés (materiales del núcleo), y realizar la emulsión que debe permanecer estable hasta la etapa de secado (Mohammed et al. 2020).

Sin embargo, esta técnica requiere condiciones de alta temperatura y acceso al aire. Si bien, la temperatura del *spray drying* es alta, el bulbo húmedo requiere solamente una corta duración de exposición (pocos segundos), y la vaporización del agua se llevará a cabo en el rango de 30 a 50 °C, reduciendo

así el daño térmico que podrían afectar a los compuestos termolábiles (Schuck et al. 2009).

#### 1.2.5 Materiales de pared

La selección del material de pared es uno de los pasos importantes en la microencapsulación y son seleccionados en función de la aplicación final deseada. Generalmente son utilizados biopolímeros, tales como proteínas y polisacáridos, debido a su diversa funcionalidad y compatibilidad biológica. Además, las combinaciones de biopolímeros son de gran interés, debido a su resistencia mecánica mejorada, tendencia reducida a la disolución del agua, y al aumento de la porosidad de la membrana en comparación con los biopolímeros individuales (Rahman et al. 2012; Ma et al. 2019).

Asimismo, uno de los principales factores que influyen en la estabilidad de los compuestos encapsulados es la naturaleza del material de pared. Por lo que, los materiales poliméricos utilizados como encapsulantes deben poseer cualidades como, propiedades emulsificantes, propiedades formadoras de películas envolventes, baja higroscopicidad y baja viscosidad en altas concentraciones de sólidos. A su vez, estos deben ser solubles, de sabor y olor agradable, de fácil reconstitución y económicos (Raei, Rafe y Shahidi 2018).

Hasta la fecha, el sistema conformado por materiales como gelatina y goma arábica, es el par polímero convencional en el sistema de microencapsulación por coacervación compleja, y también uno de los más estudiados (Dubey, Shami y Bhasker Rao 2009).

##### 2.2.5.1 Goma arábica

La goma arábica, también conocida como goma de acacia, es un exudado gomoso seco comestible obtenido del tronco y ramas de Acacia Senegal y Acacia seyal (Devi et al. 2017). Actualmente, este heteropolisacárido aniónico es ampliamente utilizado como agente encapsulante (Anvari y Melito 2017) debido a su bajo costo, fácil manejo, versatilidad, solubilidad, propiedades de carga negativa, baja viscosidad en altas concentraciones y óptimas propiedades emulsionantes relacionadas con su porción proteica y la cadena principal de polisacárido (Hosseini et al. 2015; Shaddel et al. 2018). Pues, consiste de una combinación de polisacáridos con fracciones de 90 a 99% de arabinogalactano

y 1% de glicoproteína, asimismo, está compuesto por tres fracciones distintas con diferentes pesos moleculares y contenido de proteínas (Qv, Zeng y Jiang 2011).

La fracción 1 (84%), es deficiente en proteínas y consiste en una cadena principal de polisacárido de galactopiranososa que se encuentra altamente ramificada con residuos de galactopiranososa, que finaliza en arabinosa y ácido glucurónico y/o unidades de ácido 4-O-metil glucurónico. La fracción 2 (10.4%), está compuesta por un complejo arabinogalactano-proteína (Lv et al. 2013). Donde, las cadenas de arabinogalactano están fusionadas covalentemente a un polipéptido de una glucoproteína similar a la cadena principal de arabinogalactano-proteína. La fracción 3 (2.24%), está representada por 5 bloques de carbohidratos de masa molecular, y contiene 25% de la proteína conteniendo niveles más altos y diferentes secuencias de aminoácidos (Niu et al. 2015; Ickerson 2009).

No obstante, la composición química y propiedades físico-químicas de la goma arábica, puede variar con su origen (Acacia Senegal o Acacia seyal), la edad de los árboles que se recolecta, las condiciones climáticas y medio ambiente del suelo, y el proceso sometido después de su cosecha (Sanchez et al. 2018).

#### 2.2.5.2 Gelatina

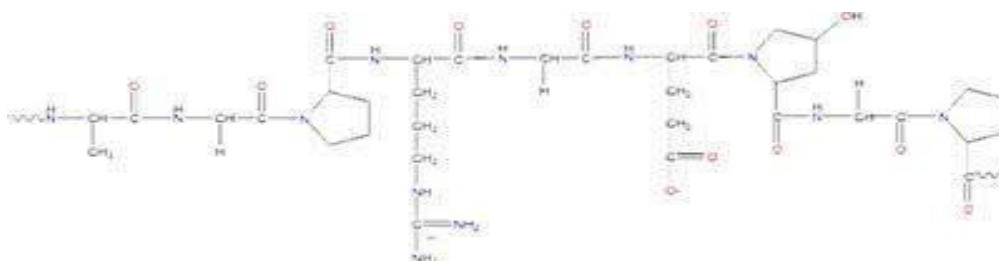
La gelatina es la forma de un colágeno desnaturalizado, utilizada ampliamente en la industria farmacéutica, alimentaria y fotografía entre otras aplicaciones. A través de los años, la gelatina aumento su demanda, se indica que casi 326,000 toneladas de gelatina, (46%) de la gelatina derivada de la piel de cerdo, (29.4%) de piel bovina, (23.1%) de huesos, (1.5%) de otras fuentes (Xu et al. 2017).

La gelatina de tipo A, extraída de la piel de cerdo es el resultado de la solubilización del colágeno en agua caliente. Las pieles de cerdo se someten a pretratamientos en un baño ácido y luego se lava en agua de 50 a 90 °C que conduce a la solubilización del colágeno en agua para dar gelatina. La gelatina obtenida se filtra, desmineraliza, concentra, esterilizado, secado y molido en gránulos (Duconseille et al. 2017).

La gelatina tipo B (GB), una proteína, se puede seleccionar como formadora de material de pared en encapsulación de compuestos hidrofóbicos debido a su disponibilidad, bajo costo, biodegradabilidad, no toxicidad y funcionalidad variada (Roy et al. 2017). Formada a partir de subproductos de la industria cárnica.

Se compone principalmente de 50.5% de carbono, 6.8% de hidrógeno y 25.2 de oxígeno, es el tipo de proteína insoluble causada por la hidrólisis de colágeno extraído de una variedad de fuente animal como los huesos, piel y tejidos conectivos (Hanani 2016).

Por otro lado, la comercialización del pescado es directamente para el consumo humano, eso resume que hay un aproximado de 35% de desperdicio, los cuales se puede emplear para la fabricación de ensilado y gelatina. Cerca de un 30% del desperdicio consiste en hueso y piel con un alto contenido de colágeno. Dentro de sus propiedades tiende a mejorar alteraciones en pacientes con artrosis en una fase inicial, movilidad articular, reducción del uso de analgésicos, caída de cabello y contrarresta la fragilidad de las uñas (Ketnawa et al. 2017).



**Figura 1.** Estructura química de la gelatina.

### 1.2.6 Reticulación enzimática

La reticulación es un proceso donde las cadenas que forman los biopolímeros se unen entre sí mediante enlaces covalentes, aumentando así la masa molecular del polímero como resultado de esta unión. Es una etapa muy importante en el proceso de producción de micropartículas ya que las uniones que forman estos enlaces covalentes son estables mecánica y térmicamente, es decir que una vez formadas son difíciles de romper. Si se consigue una buena reticulación de las micropartículas se puede conseguir que estas tengan una

buena estabilidad y no se desestabilicen fácilmente. La reticulación ha sido utilizada para alterar propiedades de barrera de las paredes de las micropartículas favoreciendo el control de liberación del activo encapsulado. Generalmente son reticulaciones proteicas y se refiere a la formación de enlaces covalentes en la propia cadena de polipéptidos intramoleculares o intermoleculares (Liang et al. 2004).

Entre los grupos presentes de las proteínas los residuos de las aminas usualmente están expuestos y son muy reactivos sin ningún tipo de una activación previa. Por eso muchos agentes reticulantes son formulados específicamente para atacar estos grupos. La gelatina por ejemplo contiene aproximadamente 33 grupos aminos y 120 grupos de ácidos carboxílicos en una molécula ideal de 100 kDa compuesta de 1000 residuos de aminoácidos (Song et al. 2009).

Se estudió el efecto de los agentes reticulantes transglutaminasa, formaldehído y glioxal sobre las propiedades de barrera de las retículas de gelatina los resultados indicaron una reducción de 20% de la solubilidad para todas las cubiertas reticuladas, en cuanto a la reducción de la permeabilidad o vapor de agua fue mayor para la cubierta reticulada con la transglutaminasa. Por otro lado, la mejora de las propiedades mecánicas de las cubiertas fue observada solamente para la cubierta reticulada con formaldehído. Utilizaron reticulación enzimática con transglutaminasa a partir de hidrolizados proteicos observando que el sistema no fue adecuado para producir buenos cubiertos. La acción de la enzima aumentó las cubiertas y la permeabilidad al vapor de agua (Sung et al. 1999).

#### 1.2.7 Enzima transglutaminasa

La transglutaminasa (TG) cataliza la reticulación entre los grupos  $\gamma$ -carboxiamida de la glutamina residuos y los grupos  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina en cadenas polipeptídicas, produciendo  $\epsilon$ - ( $\gamma$ -glutamil) enlaces de lisina (G-L). Al formar una estructura de red en la proteína a través de enlaces G-L, es posible aumentar la viscosidad de las soluciones de proteínas o provocar la gelificación. Han pasado casi treinta años desde TG microbiano (MTG) apareció en el mercado de enzimas alimentarias. Desde el inicio de la investigación y

desarrollo, MTG se ha utilizado en productos pesqueros como kamaboko (pasta de pescado hervida), carne productos como salchichas, productos lácteos como yogur, productos de soja procesada como tofu, y productos de trigo como pan y fideos. MTG ha proporcionado efectos como agregar nuevas funciones y reducción de residuos en aplicaciones alimentarias (Miwa 2020).

La enzima transglutaminasa cataliza una reacción de transferencia de acil entre el  $\gamma$ -grupo carboxiamida de residuos de glutamina unidos a péptidos y una variedad de aminoácidos. El uso de reacciones catalizadas por TG para modificar las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias continua siendo ampliamente estudiado (Ruiz-Carrascal y Regenstein 2002). La gelatina es un buen sustrato para la TG y, por lo tanto, la enzima se ha utilizado para modificar las propiedades de la gelatina para aplicaciones biomédicas y alimentarias (Fuchsbaauer et al. 1996).

#### 1.2.8 Oxidación de lípidos

Dentro de la industria alimentaria la oxidación de lípidos, es un problema extremadamente complejo, y se le considera un fenómeno porque provoca la formación y a la vez la descomposición de productos volátiles y no volátiles (Salcedo-Sandoval et al. 2015). La oxidación de lípidos es una reacción en cadena, que lleva a la producción de hidroperóxidos como productos primarios, que, al ser degradados dan lugar a productos finales. Tales como, aldehídos, cetonas, hidrocarburos, y epóxidos que afectan considerablemente la calidad de productos alimenticios (Serfert, Drusch y Schwarz 2010). Debido a que, no solo afectan sus características organolépticas (sabor, olor, textura, etc.), sino también su valor nutricional, además de atentar contra la salud de las personas, ya que, estos subproductos finales son tóxicos (Kamal-Eldin y Yanishlieva 2002).

Este proceso, se inicia con la presencia de pequeñas cantidades de radicales libres, las cuales, son átomos con al menos un electrón no apareado o un fotosensibilizador. Cualquiera de los anteriores, tienen la capacidad de sustraer un átomo de hidrógeno del grupo metileno que se encuentra entre los enlaces dobles. Lo cual, da como resultado, un nuevo radical libre, que reacciona con el oxígeno, generando radicales de peróxidos e hidroperóxidos (Taneja y Singh 2012). Por ende, mientras mayor sea el número de dobles enlaces mayor



será la variedad de hidroperóxidos producidos, es por esto que los AGP sufren oxidación con frecuencia, debido a su alto contenido de dobles enlaces.

### 1.2.9 Microscopía

La fácil y rápida preparación de la muestra a visualizar hace que, en la presente tesis, este equipo se haya utilizado para determinar el tamaño y la estabilidad relativa de las micropartículas formadas, y la morfología final de las micropartículas, además de poder visualizar si queda aceite libre al final del proceso. (Referencia)

#### 2.2.8.1 Microscopía óptica

La microscopía óptica resulta un método rápido y eficaz para determinar la morfología de las micropartículas. Además, debido a las opciones ópticas y de luminosidad que presenta, permite determinar si, en el caso de la presente tesis, estas micropartículas formadas contienen aceite en su interior (Noel y Lemineur 2020). Las imágenes ópticas sin etiquetas acopladas a una activación electroquímica se pueden utilizar para observar el funcionamiento de las propiedades físicas y electroquímicas de nanopartículas individuales, con alta resolución y sensibilidad (Noel y Lemineur 2020).

#### 2.2.8.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

El microscopio electrónico de barrido es la técnica que actualmente es utilizada para estudiar la microestructura de las micropartículas, permite generar imágenes de una superficie, con una alta resolución y un aspecto tridimensional, consiguiendo resoluciones de hasta un nanómetro, aspecto que facilita el estudio de la topografía de la micropartícula, determinando las características de la superficie, el tamaño y la distribución de las micropartículas.

A diferencia del microscopio óptico que utiliza haces de luz, la imagen proporcionada por el MEB se genera por la interacción de un haz de electrones que recorre la superficie de la muestra y de detectores que transforman las señales en corrientes eléctricas que se utilizan para formar la imagen.

### 1.3 Definición de términos básicos

#### **Metodología de superficie de respuesta (MSR)**

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de métodos estadísticos y matemáticos utilizados para establecer condiciones operativas óptimas, donde una variable de interés es influenciada por otras (Tilahun y Chun 2016).

#### **Optimización**

La optimización en los procesos de microencapsulación se definen como la aplicación de técnicas cuyo objetivo es evaluar los procedimientos para mejorar el rendimiento de las sustancias bioactivas (Pham et al. 2017).

#### **Microencapsulación**

Es un proceso mediante el cual se envasa ingredientes sólidos, líquidos o gaseosos dentro de una matriz protectora, la cual a ciertas condiciones puede liberar su contenido de una forma controlada (Ozkan et al. 2019).

#### **Coacervación compleja**

La coacervación compleja es un método de la microencapsulación, que se basa en las interacciones electrostáticas de dos polímeros que tienen cargas opuestas en cantidades iguales donde se asocian y llegan a formar complejos neutrales que precipitan, resultando en la separación de fases (Timilsena et al. 2018).

#### **Estabilidad oxidativa**

La estabilidad oxidativa, está relacionado con la protección de los ácidos grasos insaturados altamente sensibles a la degradación oxidativa, la cual, puede afectar las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos (Aladedunye y Przybylski 2014).

#### **Enzimas**

Las enzimas son productos de origen biológico que catalizan las reacciones bioquímicas relacionadas con la vida celular y forman combinaciones químicas con uno o varios sustratos. Catalizan la reacción de una gran cantidad de sustrato en un pequeño periodo de tiempo (Walz et al. 2018).

## **Transglutaminasa**

La transglutaminasa es una enzima ampliamente distribuida en varios organismos, incluidos vertebrados, invertebrados, plantas y microorganismos, y son responsable de ciertos eventos biológicos como la queratinización epidérmica, coagulación de la sangre y regulación de las membranas eritrocitarias (Yokoyama, Nio y Kikuchi 2004).

## **CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES**

### **2.1 Formulación de la hipótesis**

La optimización de la producción de micropartículas de gelatina y goma arábica conteniendo aceite de pescado con ácidos grasos poliinsaturados por coacervación compleja permitiría alta eficiencia de microencapsulación y protección de los aceites frente a la degradación oxidativa.

### **2.2 Variables y su Operacionalidad**

#### **2.2.1 Variables independientes**

Valores de pH: 3.5, 3.6, 4, 4.4 y 4.5

Material activo (aceite pescado): 1.25 gr, 1.6 gr, 2.5 gr, 3.3 gr, 3.75 gr.

#### **2.2.2 Variables dependientes**

Caracterización fisicoquímica

Eficiencia de encapsulación

Estabilidad oxidativa (índice de peróxidos)

### 2.2.3 Tabla 1. Operacionalidad de variables

Tabla 2.1 Operacionalidad de variables

Variables	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicador	Escala de medición	Categorías	Valores de las categorías	Medio de verificación
<b>Independientes</b>							
pH	El pH es una medida de acidez o alcalinidad que indica la cantidad de iones de hidrógeno presentes en una solución o sustancia.	Cuantitativa	H <sup>+</sup>	Razón	Básico	>7	Cuaderno de apuntes
					Neutro	7	
					Acido	< 7	
Estequiometria - polímeros: activo	Proporción de elementos que se combinan en el desarrollo de una reacción química.	Cuantitativa	Relación	Intervalo	GE-GA:ACEITE	1:0.75	Cuaderno de apuntes
						1:0.70	
						1:0.50	
						1:0.30	
						1:0.25	
<b>Dependientes</b>							
Humedad	Indicador de estabilidad del producto	Cuantitativa	Porcentaje	Razón	Humedad	>1.00%	Reporte de análisis
Eficiencia de encapsulación	La cantidad del compuesto que fue cargado, relacionada con la cantidad inicial utilizada	Cuantitativa	Porcentaje	Razón	%EE	>50.00%	Reporte de análisis
Estabilidad oxidativa	Cantidad de sustancia oxidada por efecto de la temperatura, luz u oxígeno	Cuantitativa	meq. Peróxidos de O <sub>2</sub> / kg de aceite	Razón	Índice de peróxidos	≥ 1.00%	Reporte de análisis
Solubilidad	Capacidad de una sustancia de disolverse en un medio determinado	Cuantitativa	Porcentaje	Razón	Solubilidad	>80.00%	Reporte de análisis
Higroscopicidad	Se define como la habilidad de un material de absorber la humedad en un ambiente de alta humedad relativa.	Cuantitativa	Porcentaje	Razón	Higroscopicidad	>1.00%	Reporte de análisis

## CAPITULO III: METODOLOGÍA

Los ensayos experimentales se realizaron en los laboratorios: Control de Calidad del CIRNA y los laboratorios de Análisis Físicoquímico, Microbiología e Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias (Planta Piloto), ubicado en el distrito de Iquitos, provincia de Maynas, región Loreto.

### 3.1 Material y equipos

#### Material

El aceite de pescado fue utilizado como material activo, gelatina porcina tipo A (lote: HY211105, VM S.R.L., Lima, Perú) y goma arábica (lote N°: #BCCC6490, Sigma-Aldrich, France) fueron utilizados como material de pared, Fish oil from menhaden (lote: SLCG4897, Sigma Aldrich, Lima, USA), 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.
- **Homogenizador Ultra Turrax** (ISOLAB, 621.12.001, 220-240V, Speed ~ 10000 30000 min<sup>-1</sup>, 2,4A 500W, Ser. No.: 500120036).
- **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.
- **Estufa** (MEMMERT, LOADING MODELS 30-750, CODIGO: E24 899).
- **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)

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Tipo y diseño de estudio

El presente trabajo fue de tipo experimental. El trabajo ha sido realizado en dos partes:

### 3.2.2 Condiciones para la optimización de la producción de micropartículas

El diseño del estudio para la optimización de las micropartículas por coacervación compleja fue conducido a través de la técnica metodología de superficie de respuesta (MSR). Para la cual se utilizó un procedimiento Box-Wilson, comúnmente denominado diseño compuesto central rotacional (DCCR), para evaluar la relevancia de dos factores: pH ( $X_1$ ), material activo (aceite de pescado) ( $X_2$ ), sobre las respuestas: Eficiencia de encapsulación (EE) y producción de peróxidos. El DCCR consistió en 4 experimentos factoriales, así como, 4 puntos axiales y 5 repeticiones en los puntos centrales, para ajustarse a un modelo polinomial de segundo orden. Los cálculos indican que se requieren 13 experimentos para este procedimiento. Los puntos axiales proporcionaran 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 será:

$$Y_i = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{12}X_1X_2$$

#### Donde:

$Y_i$  ( $i = 1-2$ ) es la respuesta prevista para la eficiencia de encapsulación y producción de peróxidos. El  $a_0$  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.

La Tabla 3.1. Muestra las variables experimentales utilizadas en el presente con el objetivo de optimizar la producción de micropartículas por coacervación compleja.

**Tabla 3.1** Variables experimentales utilizadas en el estudio

Variables	Definición y unidades	Nomenclatura	Valor o rango
Fijas	Relación de biopolímeros	RB	2.5 : 2.5 gr
Independiente	pH	pH	3.5 - 4.5
	Aceite (pescado)	AP	1.25 - 3.75 gr
Dependiente	Eficiencia de encapsulación (%)	EE o $y_1$	
	Producción de peróxidos (meq $O_2$ / kg de aceite)	PP o $y_2$	

La Tabla 3.2 muestra los valores codificados de las variables independientes (pH y aceite) y sus rangos de variación de las variables independientes. En este trabajo se escogió la goma arábica y gelatina tipo A como materiales de pared debido a sus características como seguro para consumo humano y alta eficiencia de encapsulación.

**Tabla 3.2.** Factores analíticos y niveles para MSR

	-1.41	-1	0	+1	+1.41
$X_1 = \text{pH}$	3.5	3.6	4.0	4.4	4.5
$X_2 = \text{Aceite}$	1.25	1.6	2.5	3.3	3.75



**Tabla 3.3** Condiciones operativas ensayadas

Tratamiento	Variable		Respuesta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	EE%	Índice de peróxidos	Higroscopicidad
1	-1	-1	y <sub>11</sub>	y <sub>12</sub>	y <sub>13</sub>
2	+1	-1	y <sub>21</sub>	y <sub>22</sub>	y <sub>23</sub>
3	-1	+1	y <sub>31</sub>	y <sub>32</sub>	y <sub>33</sub>
4	+1	+1	y <sub>41</sub>	y <sub>42</sub>	y <sub>43</sub>
5	- 1.41	0	y <sub>51</sub>	y <sub>52</sub>	y <sub>53</sub>
6	1.41	0	y <sub>61</sub>	y <sub>62</sub>	y <sub>63</sub>
7	0	-1.41	y <sub>71</sub>	y <sub>72</sub>	y <sub>73</sub>
8	0	1.41	y <sub>81</sub>	y <sub>82</sub>	y <sub>83</sub>
9	0	0	y <sub>91</sub>	y <sub>92</sub>	y <sub>93</sub>
10	0	0	y <sub>10 1</sub>	y <sub>10 2</sub>	y <sub>10 3</sub>
11	0	0	y <sub>11 1</sub>	y <sub>11 2</sub>	y <sub>11 3</sub>
12	0	0	y <sub>12 1</sub>	y <sub>12 2</sub>	y <sub>12 3</sub>
13	0	0	y <sub>13 1</sub>	y <sub>13 2</sub>	y <sub>13 3</sub>

### 3.2.3 Diseño muestral

Se considerará como población a los biopolímeros (goma arábica y gelatina) y el aceite (pescado) importado.

### 3.2.4 Procedimientos de recolección de datos

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

### 3.2.5 Procesamiento y análisis de los datos

Para los diseños experimentales, será realizado análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar las posibles variaciones y las interacciones entre los factores. De existir diferencias entre los promedios, será realizado el test de comparación múltiple (Tukey) a 5% de significancia.

## 3.3 Métodos analíticos

Todas las mediciones analíticas fueron realizadas por triplicado

### 3.3.1 Determinación de humedad y cenizas

Los materiales serán caracterizados con relación al contenido de humedad y cenizas según metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2002).

### 3.3.2 Determinación de proteína

Los materiales serán caracterizados con relación al contenido de proteína de acuerdo con la metodología descrito por la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2012), utilizando 5.55 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.

### 3.3.3 Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos fue determinado por la metilación previa del aceite según el método de Hartman y Lago (1973) basado en la saponificación y esterificación, con adaptaciones basadas en el método Ce 1b-89 (AOCS, 2003). En la mayoría de los casos, los ésteres metílicos pasarán a la etapa de análisis por cromatografía gaseosa de alta resolución, utilizando un cromatógrafo de Gases Perkin Elmer GC-2010 Clarus 690 con detector Fid, equipado con una columna RTX-Wax (30 m, 0,32 mm, 0,25,  $\mu\text{m}$ ) - Crossbond Carbowax de polietilenglicol, a un detector de ionización de llama, con auto inyector e inyección Split. Una solución de patrón interno de 0,1 mg / ml de concentración fue preparada en hexano, y 100  $\mu\text{l}$  de esta solución se añadió directamente a 1mL de la muestra metilada en tubo de Eppendorf. El volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{L}$ . Las temperaturas del inyector y el detector se fijaron a 250 °C. El gas de arrastre fue el nitrógeno con velocidad lineal promedio de 1,2 mL / min. La

muestra se inyectó a una razón de 1:20 en el modo Split. El horno de la columna se programó de la siguiente manera: 60 °C (mantenido por 0 minutos), 20 °C/minuto hasta 210 °C (mantenido por 7 minutos), 30 °C/minuto hasta 240 °C (mantenido durante 15 minutos). Los ésteres metílicos saturados e insaturados producidos fueron identificados por comparación del tiempo de retención con el de los ésteres metílicos de ácidos grasos estándares.

#### 3.3.4 Producción de micropartículas por coacervación compleja

Las micropartículas coacervadas fueron producidas con soluciones de gelatina tipo B y goma arábica y, como material activo se utilizó aceite de pescado de acuerdo con la metodología descrita por Tello et al. (2016), con modificaciones de acuerdo a las etapas siguientes: a) Preparar 100mL de solución de solución de gelatina (2.5%, m/m), fue emulsificado con aceite de pescado (1.25, 1.61, 2.50, 3.38 y 3.75 gr) a 50°C en Ultra Turrax (IKA-WERKE, T 25 DIGITAL) a 10000rpm, durante 3 minutos. Posteriormente añadir 100mL de solución de goma arábica (2.5%, m/m) a 50°C, añadir 400mL de agua destilada a la misma temperatura, el sistema se mantuvo en agitación lenta, b) Se ajustó el pH del sistema a pH de coacervación (3.5, 3.6, 4.0, 4.4 y 4.5) utilizando soluciones de HCl 0.5 y 2.5 M y/o NaOH 0.1M. c) El sistema conteniendo micropartículas coacervadas se disminuyó la temperatura gradualmente de 50°C a 10°C en baño de hielo, manteniéndolo en agitación magnética lenta y constante. Esperar hasta decantación de las micropartículas. Luego, las micropartículas fueron lavadas con agua desionizada con pH ajustado de coacervación y filtradas en tamiz con malla de 25 µm. Finalmente las micropartículas fueron guardadas en congelación a -10 °C.

#### 3.3.5 Reticulación de micropartículas con enzima transglutaminasa

Para la reticulación se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Tello et al. (2016), la enzima transglutaminasa fue adicionada las micropartículas húmedas con las concentraciones de 10, 30 y 50 unidades de actividad de enzima por gramo de proteína. La cantidad de enzima fue debidamente pesada, solubilizada con 5 mL de agua destilada y adicionada directamente al sistema conteniendo las micropartículas coacervadas. Todas las reticulaciones fueron efectuadas en pH 4.0. La reacción de reticulación fue realizada durante 06 horas, a temperatura ambiente sobre agitación magnética.

Después del periodo de reacción se eliminó la solución sobrenadante y las micropartículas fueron lavadas 3 veces con agua destilada para retirar el exceso de la enzima. Finalmente se eliminó el agua residual utilizando un tamiz de 25µm. Después de la reacción con transglutaminasa, seguido del lavado, las micropartículas húmedas fueron sometidas a secado (congelamiento lento para liofilización). Una parte de las micropartículas húmedas se utilizó para caracterización por microscopía óptica.

### 3.3.6 Caracterización de las micropartículas

#### 3.3.6.1 Secado

El secado de las micropartículas húmedas fue realizado en liofilizador (LABCONCO Free Zone 12 plus, modelo 7934042). 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.

#### 3.3.6.2 Determinación de lípidos

Para la determinación del contenido lipídico fue necesario la realización de una digestión previa de la proteína que recubre a la micropartícula, de esta manera se extrajo por completo el contenido lipídico. Para esto se pesó 0,5g de micropartículas húmedas y liofilizadas en la cual se adicionaron enzimas pancreáticas (0.20 gramos de pancreatina en solución) y se mantuvo por 12 horas en un baño maría de 37°C. Después de esta etapa, se adicionó citrato de sodio en la concentración de 3% (m/m), para la liberación del aceite. Posteriormente la cuantificación de aceite se determinó mediante la metodología de (Bligh y Dyer, 1959).

#### 3.3.6.3 Eficiencia de encapsulación (EE)

Para la determinación del aceite total en las micropartículas se utilizó la siguiente metodología (Bligh y Dyer, 1959). Fue pesado 5 gr de muestras, a la cual se le añadieron 20 mL de cloroformo y 20 MI de metanol y se agitó por 30 min. Posteriormente fue adicionado 10 MI de cloroformo y 10 MI de Sulfato de Sodio al 15%, para luego ser agitado por 2 min intensamente. Los tubos de ensayo se dejaron en reposo hasta la separación de dos fases. La eficiencia de encapsulación fue determinada por la siguiente relación:

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

#### 3.3.6.4 Microscopía óptica y microscopía electrónica de barradura

La observación de la morfología y determinación del tamaño medio de las micropartículas húmedas fueron realizados por microscopía óptica (MO), utilizando microscopio óptico (ZEISS - Primo Start) con captación de imágenes a través de cámara digital controlada por el programa ZEN 2.3 (blue edition) (zen Imaging Software, Germany). Las fotos digitalizadas de 500 micropartículas de cada muestra fueron medidas y procesadas con auxilio del programa Microcal Origin pro 9.1 (Microcal Software, Inc., MA, USA).

El análisis de la microestructura de las micropartículas fue realizado a través de microscopía electrónica de barrido (MEB). Para evaluar microestructura de las micropartículas, las muestras se pulverizaron de acuerdo con los procedimientos descritos por Rosenberg y Young (1993), con una capa de oro de 30 nm y se absorbieron en un microscopio electrónico de barrido (LEO435 VP, Leo Electron Microscopy Ltd., Cambridge, Inglaterra), a un voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras se fotografiaron con un aumento de 1500 X. Las imágenes se obtuvieron por el LEO software, versión 3.01.

#### 3.3.6.5 Solubilidad de las micropartículas

La solubilidad de las micropartículas se determinó de acuerdo con la metodología descrito por Cano-Chauca et al. (2005), se colocaron en un vaso de precipitado aproximadamente 1g de micropartículas y 100 mL de agua destilada. El vaso de precipitado se colocó en agitador magnético y se mezcló durante 5 min. Después, la solución se centrifugó (3000 g, 15 min) en una centrifuga Hettich MOD. 320R. Posteriormente, se transfirieron 25 mL del sobrenadante a un vaso de precipitado de 50 mL y se secaron a 105°C durante 24 h en estufa. La solubilidad (%) se calculó a partir de la diferencia de peso antes y después del secado usando la educación:

Donde: = masa del vaso de precipitados y las muestras después del secado, peso inicial del vaso de precipitado pesado.

### 3.3.7 Resistencia de las micropartículas reticuladas

Las micropartículas estudiadas fueron sometidas a diferentes tratamientos con la finalidad de evaluar la resistencia física de la cobertura modificada por la reticulación

#### 3.3.7.1 Hinchamiento de las micropartículas

La hinchazón de las micropartículas se evaluó mediante microscopía óptica. Observando el cambio en el diámetro medio de las micropartículas secas después de suspensión en agua desionizada durante 1 minuto, 1 hora y 24 horas. Fue utilizado el microscopio óptico (ZEISS - Primo Start) con captura de imágenes a través de una cámara digital controlada por el programa ZEN 2.3 (blue edition) (zen Imaging Software, Germany) usando lentes 10x.

#### 3.3.7.2 Resistencia de las micropartículas en soluciones conteniendo SDS

Micropartículas húmedas y solución (2% y 5%) de SDS, en la proporción de 1: 2 (p / p) se pesaron y se transfirieron a tubos de ensayo. Los tubos se agitaron durante 15 segundos y el tiempo de mantenimiento de las micropartículas en el medio fue de 1 hora a temperatura ambiente. Después del tratamiento las muestras se observaron cómo se describe en el ítem 3.2.8.1

#### 3.3.7.3 Resistencia de las micropartículas a diferentes temperaturas

Para evaluar el efecto del grado de reticulación en el mantenimiento integridad de micropartículas coacervadas, muestras de micropartículas húmedas en agua destilada en una proporción de 1: 3 (p / p) se transfirieron a tubos de ensayo y sometido a tratamiento térmico a 75°C, 85°C y 95°C durante 1 hora. Después del tratamiento, las micropartículas se observaron utilizando un microscopio óptico (ZEISS - Primo Start) con captación de imágenes a través de cámara digital controlada por el programa ZEN 2.3 (blue edition) (zen Imaging Software, Germany).

#### 3.3.7.4 Resistencia de las micropartículas a diferentes condiciones de pH

Micropartículas coacervadas reticuladas liofilizadas y no reticuladas se pesaron (100 mg) para evaluar el efecto del grado de reticulación manteniendo la integridad de la pared agregando 1 mL de solución acuosa ajustado a los valores de pH 2, 3 y 8 con HCl 0.1 N a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del tratamiento, las imágenes se observaron con la ayuda de un microscopio óptico (ZEISS - Primo Start) con captación de imágenes a través de cámara digital controlada por el programa ZEN 2.3 (blue edition) (zen Imaging Software, Germany).

#### 3.3.7.5 Resistencia de las micropartículas a la acción de las enzimas digestivas

Las micropartículas coacervadas sin y retículas con 10, 30 y 50 U de transglutaminasa, fueron sometidos a condiciones gastrointestinales simuladas de acuerdo con la metodología descrita por Mozzi et al. (2009) y Sultana et al. (2000). En tubos de vidrio de 30 mL, conteniendo 20 mL de jugo gástrico artificial (JGA) con el pH ajustado a 2.0, fue añadido dos gramos de hidrogeles húmedos e incubados a 37°C, en baño maría con agitación, por 2 horas. El jugo gástrico artificial (JGA) fue elaborado con 1.12 g / L KCl; 2g / L NaCl; (0.11CaCl<sub>2</sub>; 0.4 g / L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> g / L; y 0.26 g / L de pepsina y HCl para ajuste de pH.

Para la simulación del jugo intestinal artificial (JIA), fue alterado el pH a 7.0 al utilizarse una solución de NaHCO<sub>3</sub> en la concentración de 20% (m / v) y añadiendo pancreatina en la concentración de 1.95 g / L, y se incubaron las muestras por otras 5 horas más. Pasados intervalos de tiempo de dos, y cinco horas fueron retiradas para evaluar la morfología de las micropartículas.

Después de 2 y 7 horas de simulación de las condiciones gastrointestinales, alícuotas de 10 mL fueron separadas y colocadas en baño de hielo, donde permanecieron inmersas por 15 minutos para inactivación de las

enzimas. A continuación, las alícuotas fueron centrifugadas por 20 minutos a 5000 rpm (centrífuga). La proteína que se desprendió de las micropartículas quedó soluble en el sobrenadante y fue cuantificado por el método de Kjeldahl. Asimismo, fue preparado un blanco, conteniendo sólo JGA y pancreatina para el ajuste del nitrógeno proveniente de las enzimas.

### 3.3.8 Determinación de peróxidos del aceite libre y microencapsulado

Para los ensayos de estabilidad, un gramo de micropartículas fue depositada en placas petri abiertas almacenadas y depositadas en una cámara climática bajo temperatura de 45°C a lo largo de cuatro semanas, siendo el aceite libre utilizado como control. Las muestras fueron analizadas con relación a la producción de peróxidos.

La determinación del valor de peróxidos fue realizada espectrofotométricamente de acuerdo con el método estándar IDF 74A: 1991. Una porción de aceite de 0.1 a 0.3 g fue pesado, en el caso del polvo, a una alícuota de 200 µL del medio de extracción fueron añadidos a 9.6 mL de una mezcla de cloroformo / metanol (7: 3). Para la formación de color, se añadirán 50 µL de soluciones de cloruro de hierro (II) y 50 µL de tiocianato de amonio. La muestra fue agitada, y mantenida en reposo, en la oscuridad, durante 5 minutos y para medirse la absorbancia a 500 nm en espectrofotómetro. Las medidas fueron realizadas en triplicado. Se construyó una curva estándar de concentración de Fe<sup>+3</sup> frente a la absorbancia de acuerdo con la metodología descrito por Shanta y Decker (1994). Seguidamente se preparó una solución de cloruro de hierro. Fue pesado 0.5 g de hierro en polvo, para ser disuelto en 50 mL de HCl 10N. A la solución obtenida se añadió 1-2 mL de peróxido de hidrógeno, el exceso fue removido por la ebullición de esta mezcla durante aproximadamente 5 minutos. Al enfriarse, el preparado será transferido a un matraz de 500 mL y su volumen se completó con agua destilada. Una alícuota de 1 mL fue retirada y diluida en 100 mL de solución de cloroformo / metanol (7:3). Preparando diluciones de 1 a 20 µg de Fe<sup>+3</sup> y por el método IDF se construyó la curva estándar.

El valor de peróxido, expresado en miliequivalente de peróxido por kg de aceite, fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Índice\_Peróxido} = ((A_s - A_b) \times m) / (55,84 \times m_o \times 2)$$



Donde:

$A_s$  = absorbancia de las muestras;

$A_b$  = absorbancia del blanco;

$m$  = coeficiente angular de la curva estándar construida;

$m_o$  = masa en gramos de la muestra;

55,84 = masa atómica del hierro;

2 = factor 2, es necesario para que el valor de peróxido se exprese en miliequivalente de peróxido en lugar de miliequivalente de oxígeno, según lo mencionado por el método IDF.

### 3.4 Procesamiento y análisis de los datos

Para los diseños experimentales, fue realizado análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar las posibles variaciones y las interacciones entre los factores. Las diferencias entre los promedios, fue realizado el test de comparación múltiple (Tukey) a 5% de significancia.

### 3.5 Aspectos éticos

La información recolectada y generada en el presente proyecto 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

Micropartículas obtenidas por coacervación compleja fueron optimizadas considerando condiciones de procesamiento y de composición previamente evaluada en trabajo anterior de Tello et al. (2016) y presentados en la Tabla 4.1. Estas condiciones fueron escogidas con la finalidad de obtener micropartículas íntegras, esféricas, multinucleadas, representando distribución de tamaño unimodal, conteniendo cantidad razonable de compuesto hidrofóbico (aceite de pescado).

Tabla 4.1. Condiciones para reticulación

<b>Condiciones</b>	<b>Transglutaminasa</b>
Concentración	10, 30 y 50 U/g. ptn
pH	4.0
Tiempo de reacción	6 horas
Temperatura	25 °C

El objetivo principal del presente estudio fue optimizar la producción de micropartículas utilizando coacervación compleja para determinar la más alta eficiencia de encapsulación. El segundo objetivo, fue la finalidad de hacer viable la modificación del perfil lipídico de las hamburguesas producto principal del proyecto, se realizó la reticulación de las micropartículas utilizando la enzima transglutaminasa. Los trabajos con transglutaminasa fueron investigados anteriormente, siendo posible observar que la reticulación promovió mejoras en la resistencia física y en la porosidad de las micropartículas, permitiendo el secado por liofilización. En otro estudio, el mejoramiento de la resistencia física, debido a la reticulación fue verificada utilizando soluciones de SDS y se observó que las micropartículas reticuladas se mantuvieron íntegras comparadas con el comportamiento de las micropartículas sin reticular (Dong et al. 2008).

Recientemente, la transglutaminasa (TG) se ha utilizado para reticular hidrogeles a partir de gelatina tipo A y gelatina tipo B, en la que se produjo la formación de reticulación covalente intramolecular/intermolecular de los dos tipos de gelatina (Liu et al. 2020).

La coacervación compleja ocurre en condiciones extremadamente específicas de balance de cargas de los biopolímeros, que está influenciada por el fino ajuste del pH y fuerza iónica del sistema acuoso, la formación de los

coacervados generalmente ocurre entre el pKa del polisacárido y el pI de la proteína (Klemmer et al. 2012).

Inicialmente el contenido de proteína de la gelatina y de la goma arábica fue determinado y alcanzaron  $88.97\pm 0.17\%$  y  $2.09\pm 0.06\%$  de proteína respectivamente, presentan contenido de humedad de  $11.30\pm 0.15\%$  y  $10.31\%$  para gelatina y goma arábica respectivamente.

La goma arábica es ampliamente utilizada como emulsificante especialmente en la emulsificación de *flavors* constituidos por aceites esenciales especialmente utilizando secado por *spray drying* para posterior uso en diversas matrices alimenticias (Chuyen et al. 2019). Se atribuye la capacidad emulsificante a la fracción proteica presente en la goma arábica (Anderson, Howlett y McNab 1985, Randall, Phillips y Williams 1988).

#### 4.1 Caracterización de materiales encapsulantes

Los materiales utilizados en el estudio se caracterizaron con relación al contenido de proteína, humedad y cenizas de acuerdo con la metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2012) y con relación al contenido de lípidos se utilizará el método Soxhlet según AOAC (2012). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 4.2. Composición centesimal de materiales encapsulantes

Material	Composición centesimal (%)			
	Humedad	Proteína	Lípido	Carbohidrato(*)
Goma Arabiga	$10.31\pm 0.18$	$2.09\pm 0.06$	$0.35\pm 0.09$	$87.02\pm 0.33$
Gelatina	$11.30\pm 0.15$	$88.97\pm 0.17$	$0.13\pm 0.04$	---

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

#### 4.2 Perfil de ácidos grasos de aceite de pescado

El aceite utilizado como material activo fue caracterizado de acuerdo con el perfil de ácidos grasos poliinsaturados.

Tabla 4.3. Perfil de ácidos grasos de aceite de pescado

Ácido graso	Cn:m	Contenido (%)
Mirístico	14:0	8.0
Palmítico	16:0	19.8
Palmitoleico	16:1	9.8
Estearico	18:0	4.0
Oleico	18:1	12.0
Linoleico	18:2	1.1
Linolénico	18:3	0.9
Araquidónico	20:4	1.2
Eicosapentaenoico	20:5	12.9
Docosahexaenoico	22:6	14.0

Fuente : Andreuccetti C, Grosso C. (2011). Emerging Technologies. *Effect of the crosslinking with transglutaminase or glutaraldehyde on the properties of microparticles obtained by complex coacervation*, 69.

#### 4.3 Diseño experimental de producción de micropartículas por coacervación compleja

Los ensayos experimentales de producción de micropartículas fueron realizados siguiendo un diseño experimental utilizando como variables independientes, el pH y el material activo (aceite de pescado). Un diseño compuesto central incluyendo 4 factoriales, 4 experimentos en condiciones axiales y 5 puntos centrales de repeticiones, totalizando 13 experimentos. La Tabla 3, muestra los experimentos, para estudiar los efectos del pH y el material activo. La variable respuesta considerada fue la eficiencia de encapsulación (EE) y producción de peróxidos. Para la obtención de respuesta entre estas dos variables se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) utilizando el modelo Box-Behnken y el programa de Estadística Software Versión 6.0. Se realizó 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.

Tabla 4.4. Condiciones operativas ensayadas y resultado experimental de micropartículas producidas por coacervación compleja

Experimentos	Variables independientes			Respuestas		
	pH	Aceite de pescado	Eficiencia de encapsulación	Humedad	Solubilidad	Higroscopicidad
1	3.60 (-1)	1.61 (-1)	89.33±0.62 <sup>b</sup>	3.35±0.07 <sup>abcd</sup>	7.32±0.62 <sup>a</sup>	4.15±0.53 <sup>def</sup>
2	4.40 (1)	1.61(-1)	83.59±0.65 <sup>d</sup>	3.57±0.96 <sup>abcd</sup>	6.99±0.28 <sup>d</sup>	3.52±0.51 <sup>f</sup>
3	3.60 (-1)	3.38 (1)	85.93±0.64 <sup>c</sup>	2.54±0.15 <sup>cde</sup>	6.32±0.89 <sup>c</sup>	3.47±0.66 <sup>f</sup>
4	4.40 (1)	3.38 (1)	84.22±0.62 <sup>d</sup>	2.25±0.68 <sup>e</sup>	6.26±0.55 <sup>d</sup>	5.34±0.38 <sup>cdef</sup>
5	3.50(-1.41)	2.50 (0)	89.17±0.63 <sup>b</sup>	3.02±0.32 <sup>bcd</sup>	4.75±0.88 <sup>b</sup>	3.77±0.48 <sup>bef</sup>
6	4.50 (1.41)	2.50 (0)	81.22±0.65 <sup>e</sup>	4.09±0.18 <sup>ab</sup>	4.77±0.64 <sup>e</sup>	5.74±0.22 <sup>bcd</sup>
7	4.00 (0)	1.25 (-1.41)	96.35±0.57 <sup>a</sup>	4.50±0.15 <sup>a</sup>	7.25±0.32 <sup>a</sup>	5.39±0.95 <sup>cdef</sup>
8	4.00 (0)	3.75 (1.41)	78.20±0.67 <sup>f</sup>	2.55±0.23 <sup>de</sup>	4.61±0.59 <sup>f</sup>	7.86±0.32 <sup>ab</sup>
9	4.00 (0)	2.50 (0)	82.27±0.55 <sup>e</sup>	2.97±0.29 <sup>bcd</sup>	4.80±0.97 <sup>e</sup>	5.97±0.82 <sup>bcd</sup>
10	4.00 (0)	2.50 (0)	81.23±0.70 <sup>e</sup>	3.85±0.10 <sup>abc</sup>	4.53±0.24 <sup>e</sup>	7.30±1.26 <sup>abc</sup>
11	4.00 (0)	2.50 (0)	82.36±0.60 <sup>e</sup>	2.95±0.26 <sup>bcd</sup>	5.76±0.97 <sup>e</sup>	8.44±1.04 <sup>a</sup>
12	4.00 (0)	2.50 (0)	81.83±0.85 <sup>e</sup>	3.73±0.28 <sup>abcd</sup>	4.99±0.95 <sup>e</sup>	6.99±1.03 <sup>abc</sup>
13	4.00 (0)	2.50 (0)	82.19±0.60 <sup>e</sup>	3.58±0.36 <sup>bcd</sup>	6.15±0.99 <sup>e</sup>	7.18±0.22 <sup>abc</sup>

Promedio ± desvío estadístico (n = 3). Letras diferentes en la misma columna representan diferencia significativa (p<0.05) entre las medias obtenidas a través de la prueba Tukey.

Las variables independientes corresponden a los valores reales. Los valores entre paréntesis corresponden a los valores codificados. Potencial de hidrogeno (pH); Aceite de pescado (gr), %EE representan valores de tres determinaciones.

#### 4.4 Selección del modelo apropiado para eficiencia de encapsulación en micropartículas por coacervación compleja

La Tabla 4.4, muestra los resultados de los experimentos de las micropartículas producidas por coacervación compleja, asimismo, muestra los resultados determinados para la variable dependiente. La eficiencia de encapsulación de los tratamientos sometidos a diferentes valores de pH y el material activo (aceite) y con los datos de la Tabla 3.1, se encontró los valores de R<sup>2</sup> y, suma de cuadrados del error que permitieron elegir el modelo adecuado para predecir la eficiencia de encapsulación.

Los modelos estudiados fueron: 1) sólo términos lineales; y 2) términos cuadráticos. Determinando que el modelo que correlaciona mejor los datos experimentales para la eficiencia de encapsulación de micropartículas por coacervación compleja fue el tratamiento número 7, con un pH de 4.0 y 1.25 gr.

de material activo (aceite). Obteniendo una eficiencia de encapsulación de  $96.35 \pm 0.57\%$ .

Tabla 4.5. Regresión de superficie de Respuesta: EE vs. pH; Aceite. Análisis de Varianza.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	119.489	29.8722	31.06	0.000
Lineal	2	88.342	44.1709	45.92	0.000
pH	1	50.547	50.5467	52.55	0.000
Aceite	1	37.795	37.7951	39.29	0.000
Cuadrado	2	31.285	15.6426	16.26	0.002
pH*pH	1	18.935	18.9349	19.69	0.002
Aceite*Aceite	1	14.331	14.3305	14.90	0.005
Error	8	7.695	0.9619		
Falta de ajuste	4	6.637	1.6593	6.27	0.052
Error puro	4	1.058	0.2645		
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>127.184</b>			

Tabla 4.6. Resumen del Modelo de Eficiencia de Encapsulación de aceite en micropartículas por coacervación compleja.

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
<b>0.980758</b>	93.95%	90.92%	73.21%

Fuente: Statistica 12

El elevado valor de coeficiente de determinación ( $R^2$ ) del modelo seleccionado para predecir la eficiencia de encapsulación ( $R^2=0.980758$ ), que permite interpretar los resultados mediante gráficos de superficie de respuesta (Figura 4.1) y contorno (Figura 4.2). Donde la región baja representa la combinación del pH y el material activo (aceite) para obtener alta eficiencia de encapsulación de micropartículas por coacervación compleja.

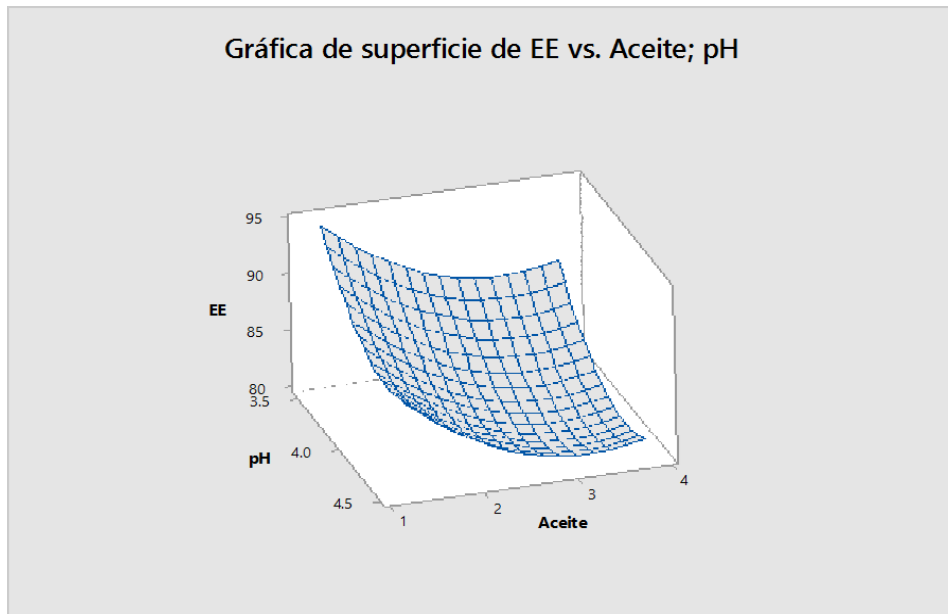


Figura 4.1. Superficie de respuesta de la eficiencia de encapsulación de micropartículas por coacervación compleja.

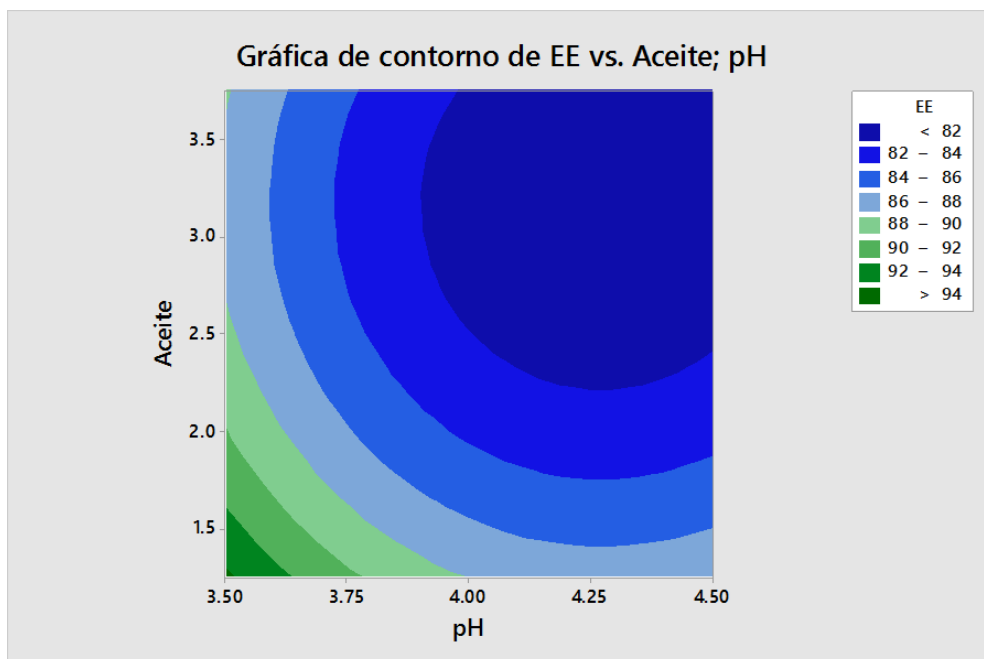


Figura 4.2. Gráfico de contorno de la eficiencia de encapsulación de micropartículas por coacervación compleja.

El buen ajuste de los datos experimentales con los predichos se puede corroborar en la Figura 4.3, 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.

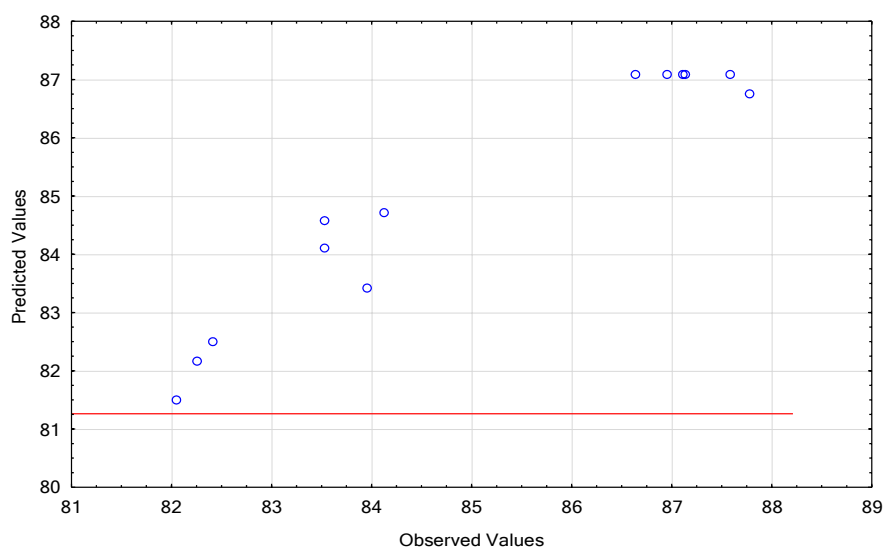


Figura 4.3. Valores observados vs Valores predichos de la eficiencia de encapsulación de aceite en micropartículas por coacervación compleja.

Tabla 4.7. Análisis de la varianza para la variable de eficiencia de encapsulación de micropartículas por coacervación compleja.

ANOVA; Var.:EE; R-sqr=.980758; Adj:.88626 (Spreadsheet1) 2 factors, 1 Blocks, 13 Runs; MS Residual=.559807 DV: EE					
Fuente	GL	SC	MC	F	P
Modelo	4	119.489	29.8722	31.06	0.000
Lineal	2	88.342	44.1709	45.92	0.000
pH	1	50.547	50.5467	52.55	0.000
Aceite	1	37.795	37.7951	39.29	0.000
Cuadrado	2	31.285	15.6426	16.26	0.002
pH*pH	1	18.935	18.9349	19.69	0.002
Aceite* Aceite	1	14.331	14.3305	14.90	0.005
Error	8	7.695	0.9619		
Falta de ajuste	4	6.637	1.6593	6.27	0.052
Error Puro	4	1.058	0.2645		
Total	12	127.184			

Fuente: Statistica 12



#### 4.5 Optimización de eficiencia de encapsulación de aceite en micropartículas por coacervación compleja

Para determinar los valores óptimos del pH y aceite se procedió a transformar la variable respuesta en una variable llamada “deseable”, para lo cual, se requieren determinar cuál es la combinación de pH y aceite, para obtenerla máxima eficiencia de encapsulación de micropartículas por el método de coacervación compleja. Como se puede apreciar en la Figura 4.5 de superficie de respuesta y gráfico de contorno, donde el máximo valor se encuentra localizado en la región más alta, la cual pertenece a la combinación pH (3.5 – 4.00) y aceite (1.25g – 1.61g).

Tabla 4.8. Coeficiente de variación para predecir la eficiencia de encapsulación aceite en micropartículas por coacervación compleja.

Regr. Coefficients; Var.:EE; R-sqr=.93365; Adj:.88626 (Spreadsheet1) 2 factors, 1 Blocks, 13 Runs; MS Residual=.559807 DV: EE					
Término	Coef	EE. del coef	Valor T	Valor p	FIV
Constante	82.060	0.437	187.73	0.000	
pH	-2.664	0.367	-7.25	0.000	1.00
Aceite	-2.175	0.347	-6.27	0.000	1.00
pH*pH	1.954	0.440	4.44	0.002	1.00
Aceite* Aceite	1.429	0.370	3.86	0.005	1.00

Fuente: Statistica 12

La ecuación matemática que puede predecir la eficiencia de encapsulación para cualquier combinación de pH y aceite se muestra a seguir:  $EE = 321.6 - 104.4 (\text{pH}) - 11.56 (\text{aceite}) + 12.21 (\text{pH} \cdot \text{pH}) + 1.824 (\text{aceite} \cdot \text{aceite})$ . Los cuales son los coeficientes de regresión según el modelo seleccionado.

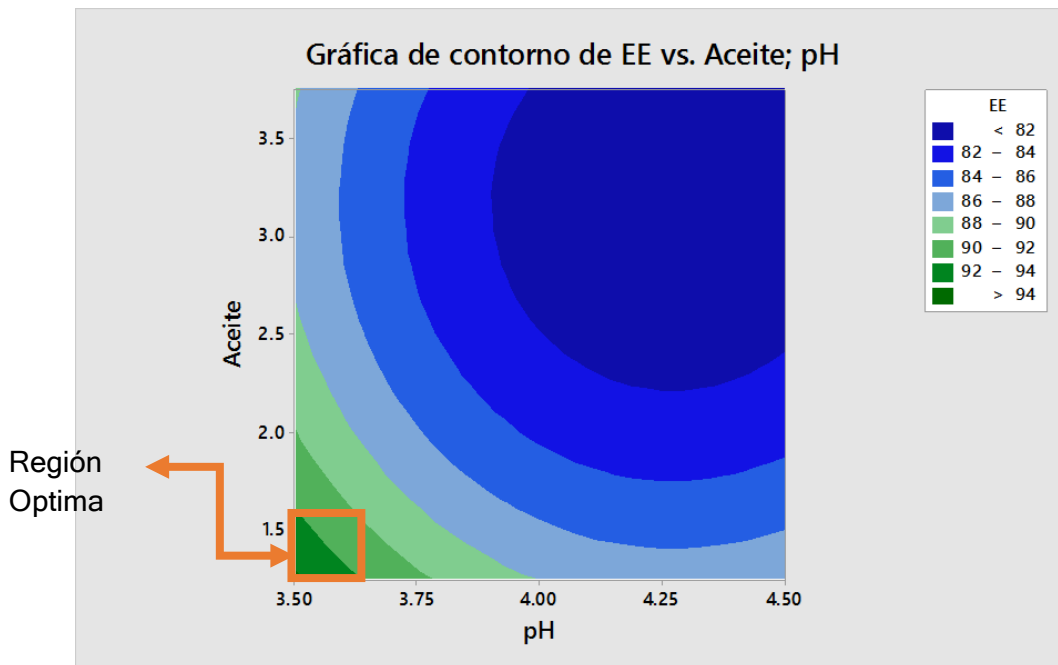
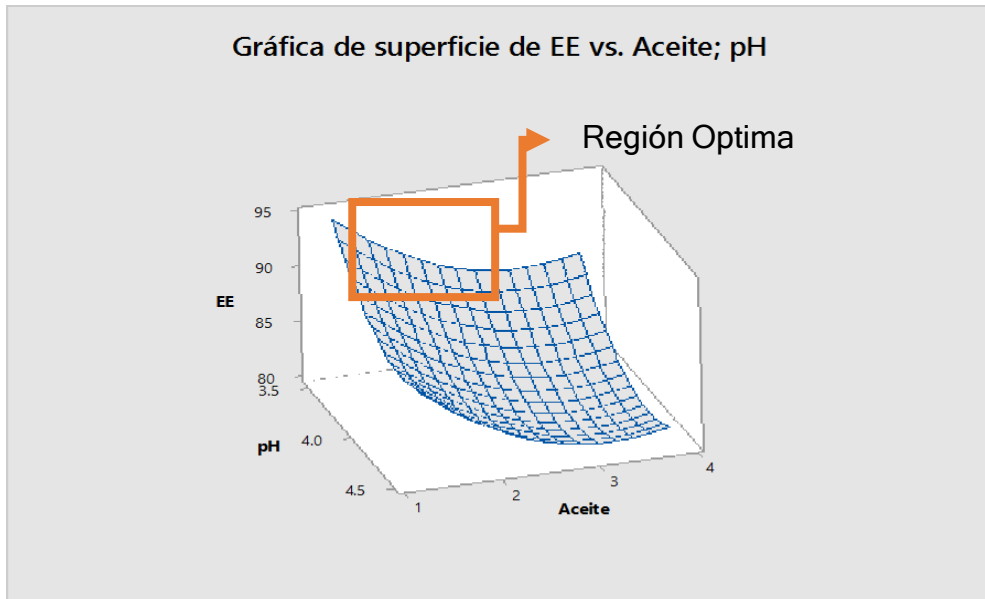


Figura 4.5. A. Superficie de respuesta del valor deseable de la eficiencia de encapsulación de micropartículas por *coacervación compleja*. B. Gráfico de contorno del valor deseable de la eficiencia de encapsulación de micropartículas por *coacervación compleja*.

#### 4.6 Eficiencia de encapsulación de aceite en micropartículas producidas por coacervación compleja

De acuerdo con la Tabla 4.3, la eficiencia de encapsulación de las micropartículas se vio significativamente influenciada por la cantidad de aceite utilizado, ya que el sistema producido con la menor cantidad de aceite dió como resultado el mayor %EE cuando comparado con las micropartículas producidas

con mayor cantidad de aceite. Los valores de %EE variaron de  $78.20 \pm 0.67\%$  a  $96.35 \pm 0.57\%$  para los tratamientos con 3.75 g y 1.25 g de aceite como material de activo, respectivamente.

#### 4.7 Producción de micropartículas optimizadas por coacervación compleja.

Para la continuidad de los ensayos experimentales se utilizó goma arábica y gelatina Tipo A, como material de pared para producir micropartículas conteniendo aceite de pescado de acuerdo con metodología descrito por Tello et al. (2016), las micropartículas fueron producidas utilizando de gelatina (2.5% m/m) y goma arábica (2.5% m/m) como material encapsulante. Como material activo (aceite de pescado) 1.25 % (m/m) a 50°C. Para la formación de las micropartículas el pH del sistema fue ajustado a (pH 4.0) con HCL 0.1 N. Fue utilizado baño de hielo para bajar la temperatura de 50°C - 10°C, aproximadamente por 3 horas. La solución fue preparada con agua destilada y con agitación magnética que fue mantenida durante todo el proceso de la producción de micropartículas. Las micropartículas producidas fueron estables y visualmente con buen aspecto.

#### 4.8 Caracterización de micropartículas coacervadas conteniendo aceite

Para dar continuidad a los ensayos experimentales se produjeron micropartículas con los datos optimizados, la Tabla 4.9 muestra los valores de contenido de humedad, proteína, lípido y ceniza. Con relación al contenido de humedad alcanza el  $80.86 \pm 1.26\%$  y  $40.29 \pm 0.87\%$  de proteína, el  $17.65 \pm 0.53\%$  de lípidos.

Tabla 4.9. Composición centesimal (Base Seca) de micropartículas coacervadas conteniendo aceite

Micropartícula	Humedad (%)	Ceniza (%)	Lípidos (%)	Proteína (%)	Carbohidrato (*) (%)	EE (%)
MCCSR	$80.86 \pm 1.26$	$0.23 \pm 0.01$	$17.65 \pm 0.53$	$40.29 \pm 0.87$	$41.83 \pm 1.33$	$95.12 \pm 1.48$

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

#### 4.9 Morfología y microestructura de micropartículas coacervadas con y sin reticulación

Las imágenes captadas por microscopía óptica y microscopía electrónica permiten observar detalles de la morfología y la microestructura de las micropartículas húmedas y liofilizadas. La microscopía óptica ha sido utilizada para obtención de informaciones relativas a la forma, tamaño y en algunos casos para la distribución de las gotas de aceite en el interior de la micropartícula. La Figura 4.6 muestra las imágenes de las micropartículas en la se observa que tienen forma esférica y multinucleadas. Observaciones semejantes fueron presentadas en otros trabajos de investigación.

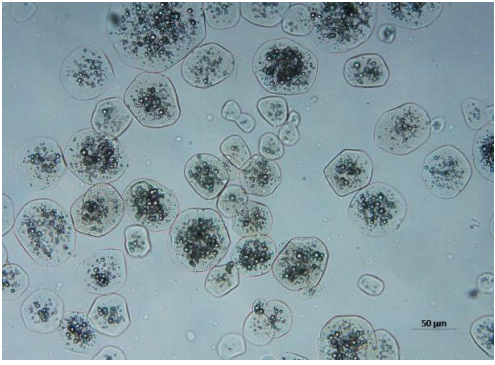

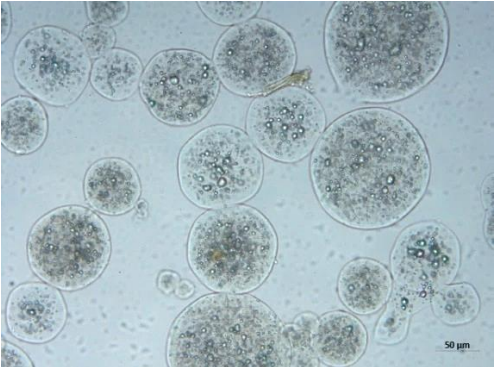
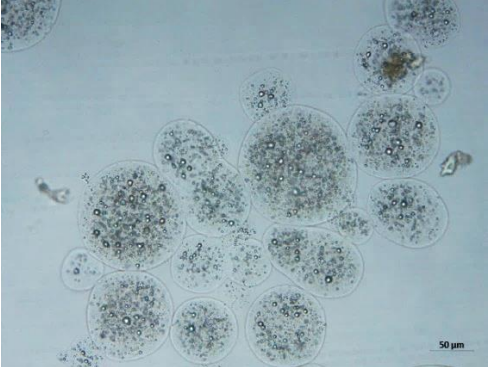
Tratamiento	Microscopía óptica
MCCSR	
MCCR10	
MCCR30	
MCCR50	

Figura 4.6. Imágenes de morfología de micropartículas coacervadas húmedas obtenida por microscopía óptica.

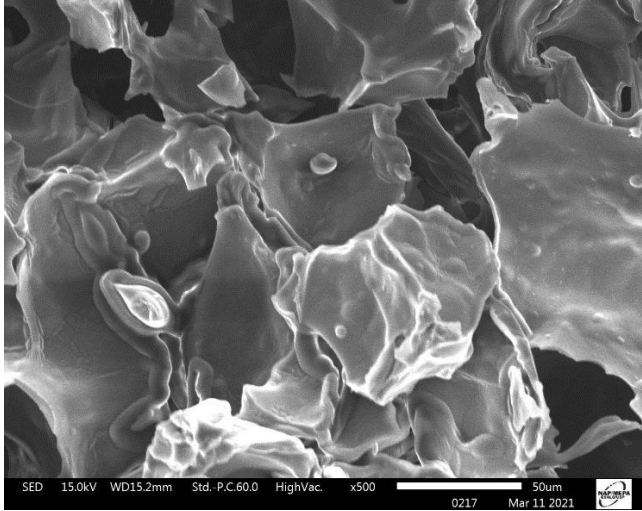
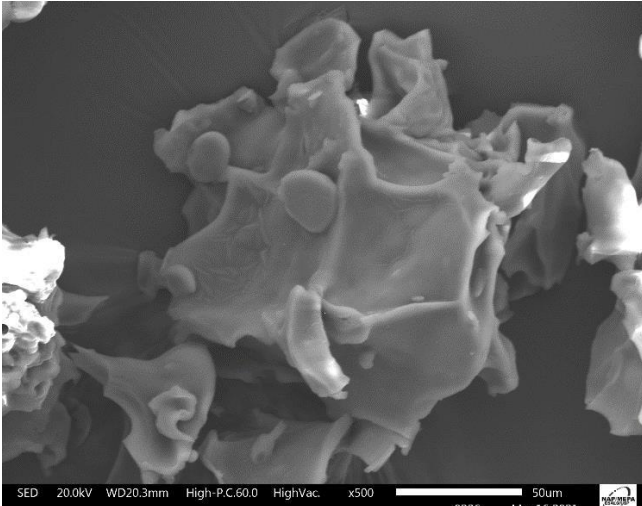
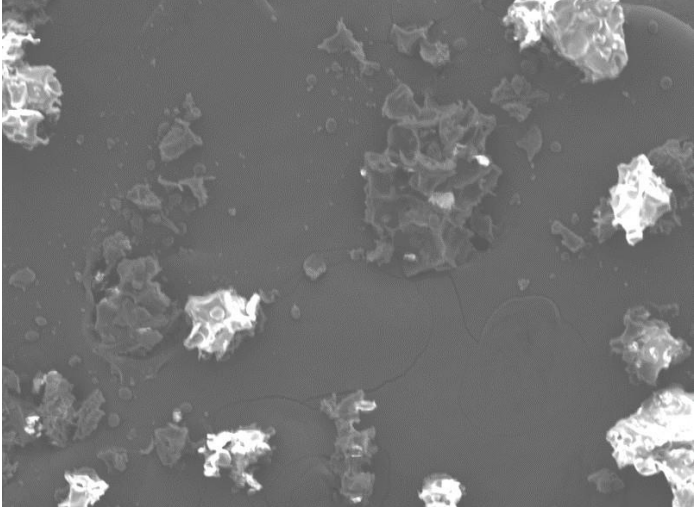
Tratamiento	Microscopia electrónica
MCCSR	 <p>SED 15.0kV WD15.2mm Std. P.C.60.0 HighVac. x500 50um 0217 Mar 11 2021</p>
MCCR30	 <p>SED 20.0kV WD20.3mm High-P.C.60.0 HighVac. x500 50um 0226 Mar 16 2021</p>
MCCR50	 <p>SED 20.0kV WD20.0mm High-P.C.60.0 HighVac. x100 100um 0238 Mar 16 2021</p>

Figura 4.7. Imágenes de microestructura de las micropartículas coacervadas liofilizadas obtenida por microscopia electrónica de barradura.

#### 4.10 Tamaño de micropartículas con y sin reticulación enzimática

Los tamaños medios de las micropartículas coacervadas húmedas fueron determinados por microscopía óptica. La Tabla 4.10, muestra los tamaños determinados. El tamaño y la forma de las micropartículas son parámetros importantes que deben tenerse en cuenta para la formulación de matrices alimenticias, ya que se desean micropartículas esféricas con una distribución uniforme para la incorporación.

Tabla 4.10. Tamaño de micropartículas coacervadas conteniendo aceite

Micropartícula	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )
MCCSR	56.93 $\pm$ 3.48
MCCR10	54.41 $\pm$ 2.89
MCCR30	61.73 $\pm$ 6.51
MCCR50	62.85 $\pm$ 4.21

Promedio  $\pm$  desvío estadístico (n=3)

El tamaño de las micropartículas obtenidas están de acuerdo con los resultados de Alvim y Grosso (2010), quienes obtuvieron micropartículas de oleoresina de pimentón por coacervación compleja, utilizando gelatina y goma arábica con diámetros alrededor de 52  $\mu\text{m}$ . En otro estudio de Ferreira y Nicoletti (2020), reportaron tamaños de que variaron de 57 a 87  $\mu\text{m}$  cuando encapsularon aceite de jengibre por coacervación compleja.

#### 4.11 Reticulación de micropartículas húmedas conteniendo aceite con enzima transglutaminasa.

En esta parte del trabajo se estudió la reticulación de las micropartículas formadas mediante coacervación compleja utilizando gelatina y goma arábica como materiales de pared, convencionalmente se han reticulado con glutaraldehído o formaldehído, sustancias no adecuadas para alimentos por su alta toxicidad. El resultado de la primera parte de este estudio fue de importancia para la continuidad del trabajo de investigación, en la que fue determinada las variables óptimas (pH y aceite) para la eficiencia de encapsulación, los resultados fueron utilizados para obtener la eficiencia de micropartículas y posteriormente utilizados para la reticulación de las micropartículas.



#### 4.12 Resistencia de las micropartículas al hinchamiento

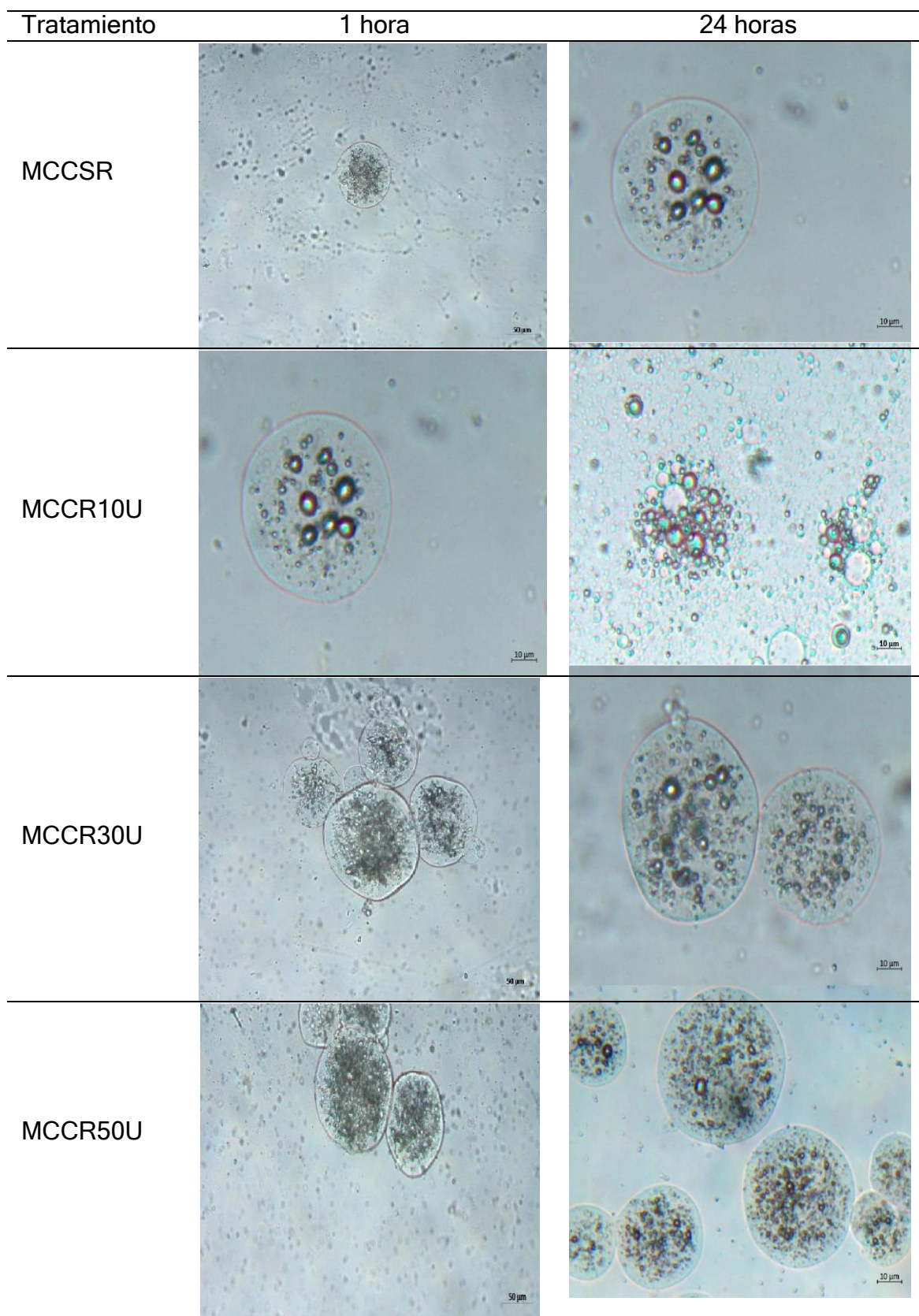


Figura 4.9. Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de una hora de suspensión bajo acción de temperatura obtenida por microscopía óptica.



La Figura 4.9 muestra la micrografía óptica de las micropartículas deshidratadas sometidas a hinchamiento por 1 y 24 horas, se puede observar que las micropartículas al ser sometidas a hidratación adquieren su forma original.

La Figura 4.10 muestra la micrografía óptica de las micropartículas sometidas a incubación en pH 2 y 8 durante 1 en solución acuosa. En pH 8 todas las micropartículas permanecen intactas para todos los tratamientos incluido las micropartículas no reticuladas, cuando el pH bajo para 2, condición ácida las micropartículas se alteraron visiblemente, este pH representa las condiciones del estómago humano.

La resistencia de las micropartículas a soluciones acuosas de SDS en concentraciones de 2% y 5% fue evaluada por microscopía óptica. La Figura 11 muestra las imágenes. De la observación de la Figura 11, evidencia que las micropartículas sin reticulación fueron destruidas con liberación total del aceite. El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un surfactante con actividad superficial entre dos fases, tales como aire/agua, aceite agua y en la superficie s de los sólidos.

#### 4.13 Resistencia de las micropartículas a efectos de temperatura

Micropartículas reticuladas húmedas conteniendo aceite (MPA) fueron sometidas a 4 diferentes temperaturas (65°C, 75°C, 85°C y 95 °C) para determinar su resistencia física en función del nivel de reticulación.

La resistencia de las micropartículas sometida a condiciones térmicas fue evaluada cualitativamente utilizando la microscopía óptica. Micropartículas no reticuladas no soportaron el efecto de la temperatura (Figuras 4.8A y 4.8B) en todos los niveles utilizados.

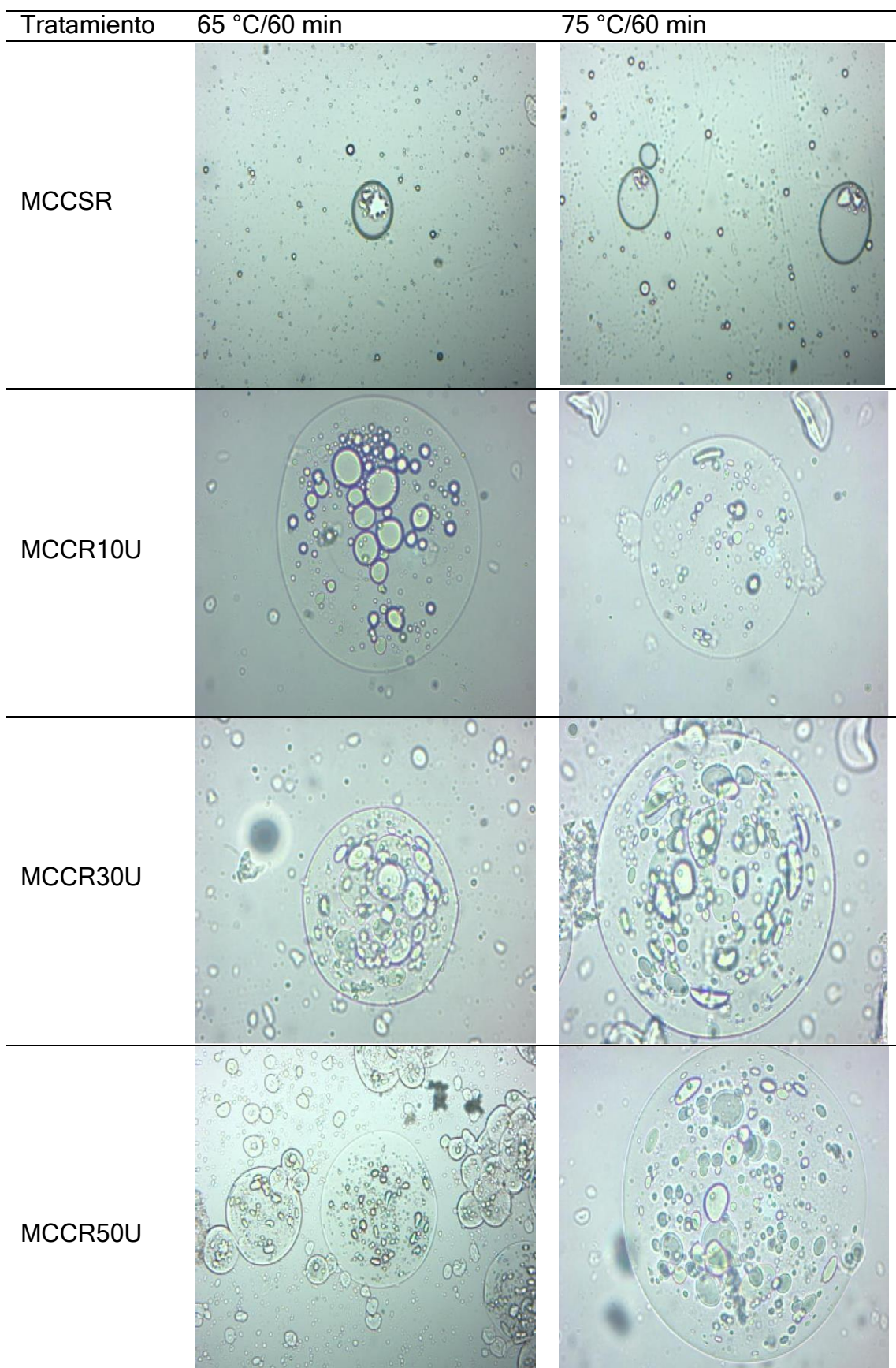


Figura 4.8A. Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de una hora de suspensión bajo acción de temperatura obtenida por microscopía óptica.

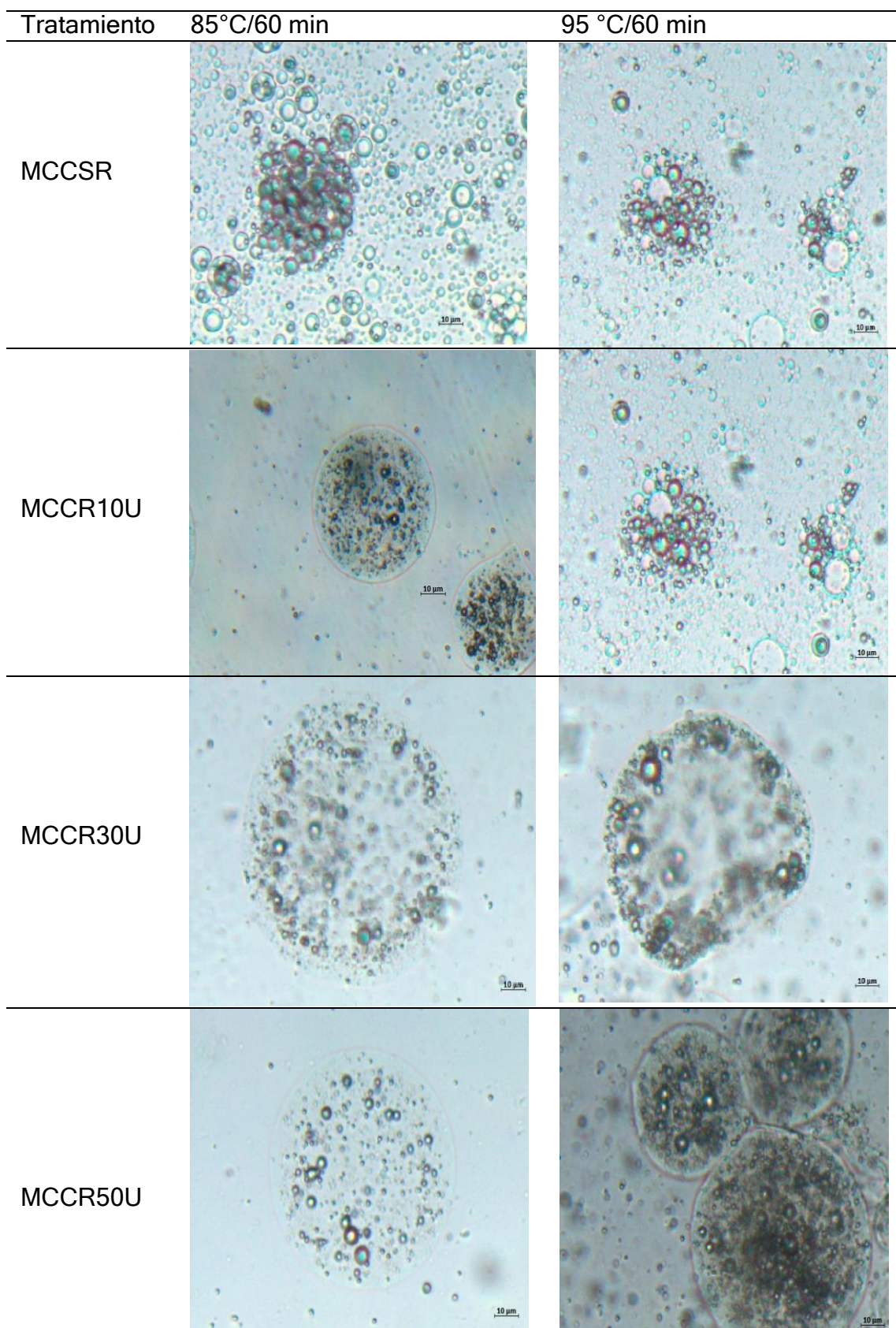


Figura 4.8B. Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de una hora de suspensión bajo acción de temperatura obtenida por microscopía óptica.



#### 4.14 Resistencia de las micropartículas a diferentes condiciones de pH

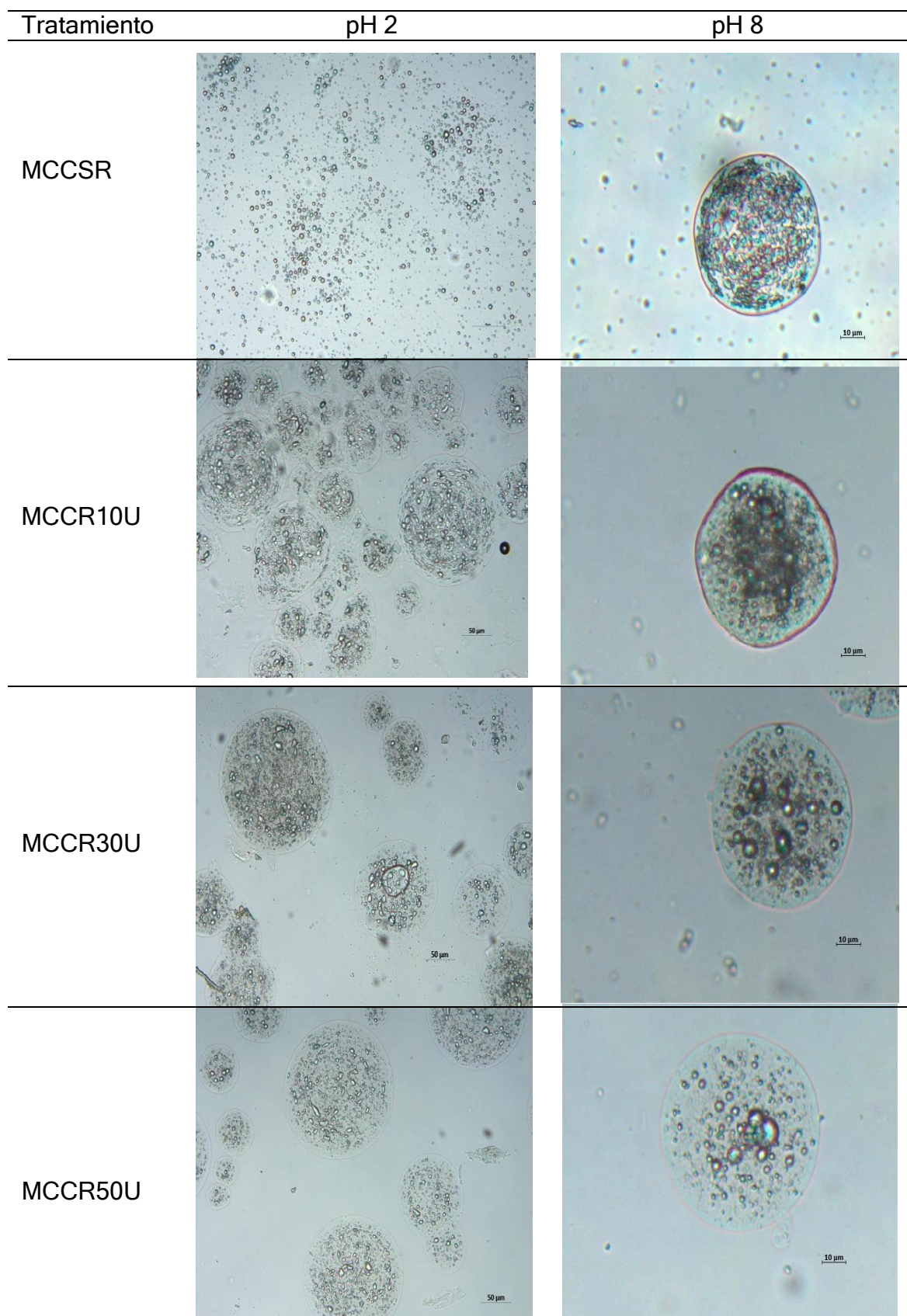


Figura 4.10. Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de una hora de suspensión bajo acción de temperatura obtenida por microscopía óptica.

#### 4.15 Resistencia de las micropartículas en soluciones de SDS 2% y 5%

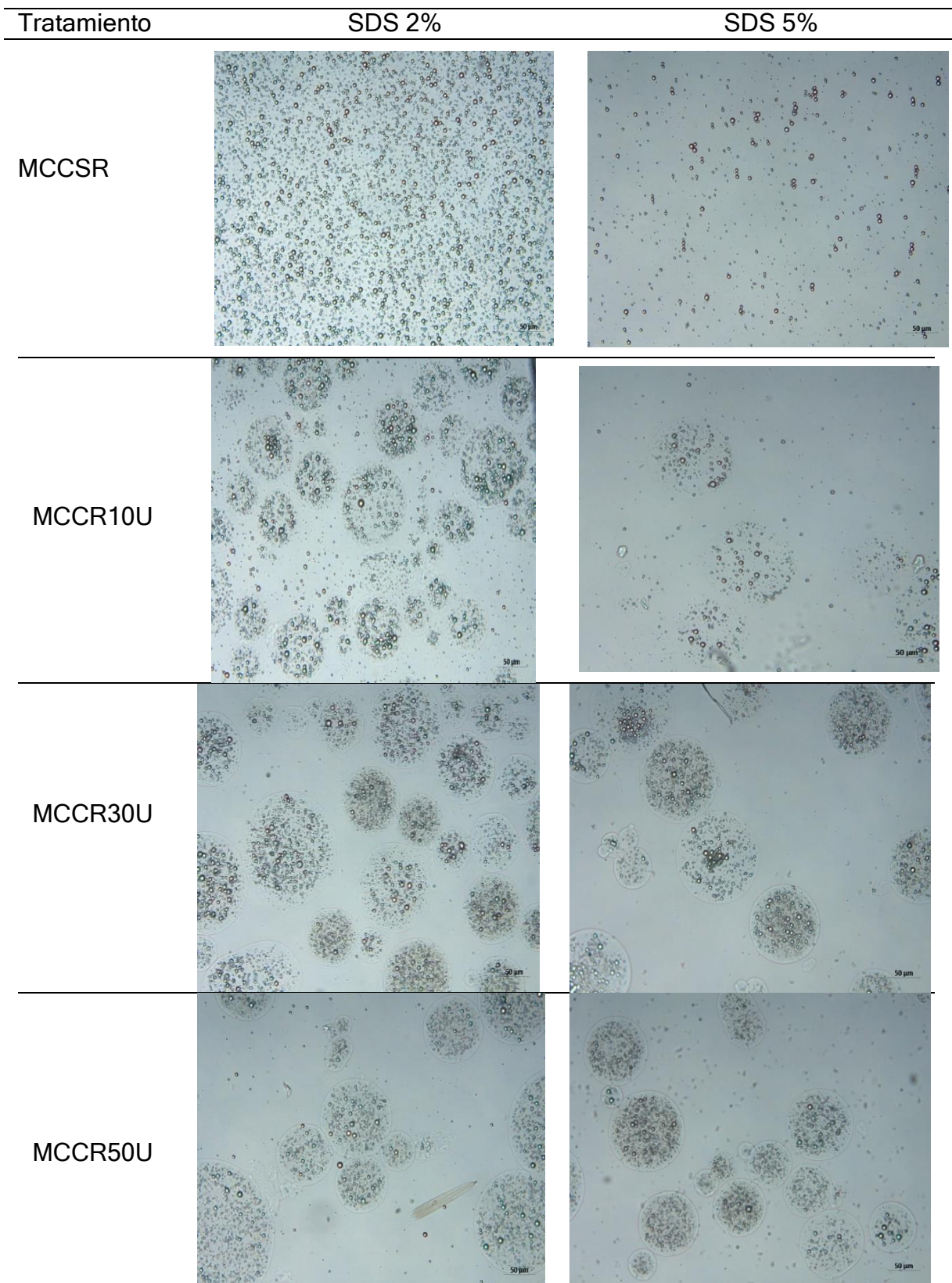


Figura 4.11. Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de someter a soluciones de SDS.



4.16 Estudio de eficiencia de la reticulación en condiciones gástricas (pH ácido y pepsina)

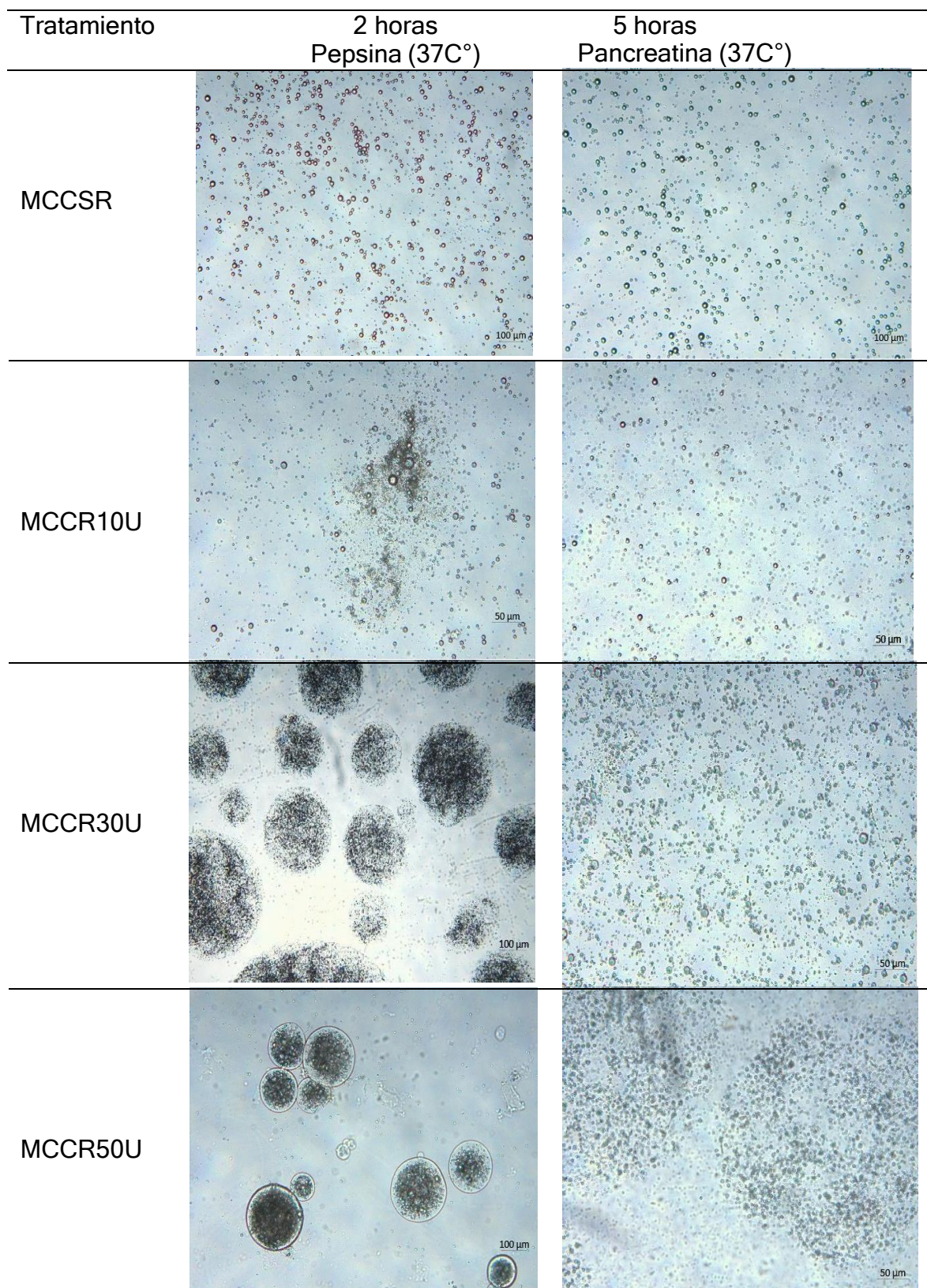


Figura 4.12. Imágenes de micropartículas coacervadas húmedas después de someter a soluciones de SDS.

La Figura 4.12 muestra las micrografías de las micropartículas sometidas a acción enzimática, temperatura y pH característico del estómago (2 horas) con posterior intercambio a condiciones intestinales (5 horas), para todas micropartículas estudiadas.

Las micropartículas no reticuladas y las reticuladas con 10U/g. ptn fueron severamente destruidas después de dos horas de incubación. Micropartículas reticuladas con las mayores cantidades de enzima (30 y 50 U/g. ptn) mantuvieron su integridad después de dos horas en las condiciones del estómago. Todas las micropartículas independiente de la cantidad de enzima, fueron destruidas, resultando en la liberación total del aceite microencapsulado cuando sometidas en condiciones intestinales.

#### 4.17 Estabilidad oxidativa del aceite libre y microencapsulado por coacervación compleja sin y con reticulación enzimática

Micropartículas de gelatina y goma arábiga conteniendo aceite de pescado sin y con reticulación de 10U, 30U y 50U de transglutaminasa por gramo de proteína después de la liofilización fueron evaluados con relación a la producción de peróxidos, también fue evaluado la estabilidad oxidativa del aceite libre, durante cuatro semanas a 45 °C. La temperatura de almacenamiento fue utilizada para promover el proceso de oxidación, debido al poco tiempo de almacenamiento. Los índices de peróxido del aceite libre y encapsulado en las micropartículas se muestran en la Figura 4.12.

Inicialmente, de acuerdo con la Figura 4.12, en el tiempo cero, el aceite libre presentó el menor nivel de oxidación, 1.78 meq de peróxido O<sub>2</sub>/ kg de aceite. Los aceites contenidos en las micropartículas reticuladas presentaron nivel bajo de oxidación, variando de 4.38±1.05 a 5.12± 0.27 meq de peróxido O<sub>2</sub>/ kg de aceite, probablemente debido a la manipulación durante la producción de las micropartículas.

Después de una semana de almacenamiento, a 45 °C, el aceite libre presentó el mayor nivel de oxidación de 81.40±0.95 y para los sistemas estudiados. El menor valor equivalente a 64.38±1.05 meq de peróxido O<sub>2</sub>/ kg de aceite, para la micropartícula reticulada con 50 U de transglutaminasa. Todos los aceites contenidos en las micropartículas presentaron diferencias significativas entre los promedios (p>0.05) cuando comparado entre los mismos (Tabla 4.13).

En la segunda y tercera semana de almacenamiento, la tendencia del nivel de oxidación fue semejante, siendo el mayor índice de oxidación observado para el aceite libre, seguido del aceite encapsulado en micropartículas sin reticulación. El aceite contenido en micropartículas reticuladas con 50 U de transglutaminasa nuevamente presentaron el menor índice de oxidación después de la tercera semana de almacenamiento ( $114.71 \pm 0.63$  meq de peróxido  $O_2$ / kg de aceite).

En la cuarta semana de almacenamiento, el aceite contenido en micropartículas sin recubrimiento oxidó más que el aceite libre equivalente a  $185.05 \pm 0.91$  meq de peróxido / kg de aceite frente a  $153.53 \pm 0.91$  meq de peróxido / kg de aceite. Este comportamiento posiblemente se debe a la mayor área del aceite libre.

Micropartículas reticuladas con la mayor cantidad de enzima transglutaminasa (50U), se presenta como la más efectiva para protección del aceite, considerando el menor índice de peróxidos observado al final del periodo de almacenamiento ( $146.58 \pm 1.84$ ).

Los resultados del presente trabajo indican que la formación de peróxidos continúa aumentando en todos los sistemas de micropartículas incluido el aceite libre a lo largo del periodo de almacenamiento, este comportamiento indica que ninguno de los sistemas estudiados favoreció la oxidación en una proporción para que la fase de terminación sea alcanzada. Asimismo, el índice de peróxidos utilizado en el presente trabajo es un indicador útil en oxidación de lípidos, especialmente en el inicio de la oxidación lipídica. Por otro lado, para la evaluación de productos secundarios el uso de peróxidos puede resultar insuficiente.



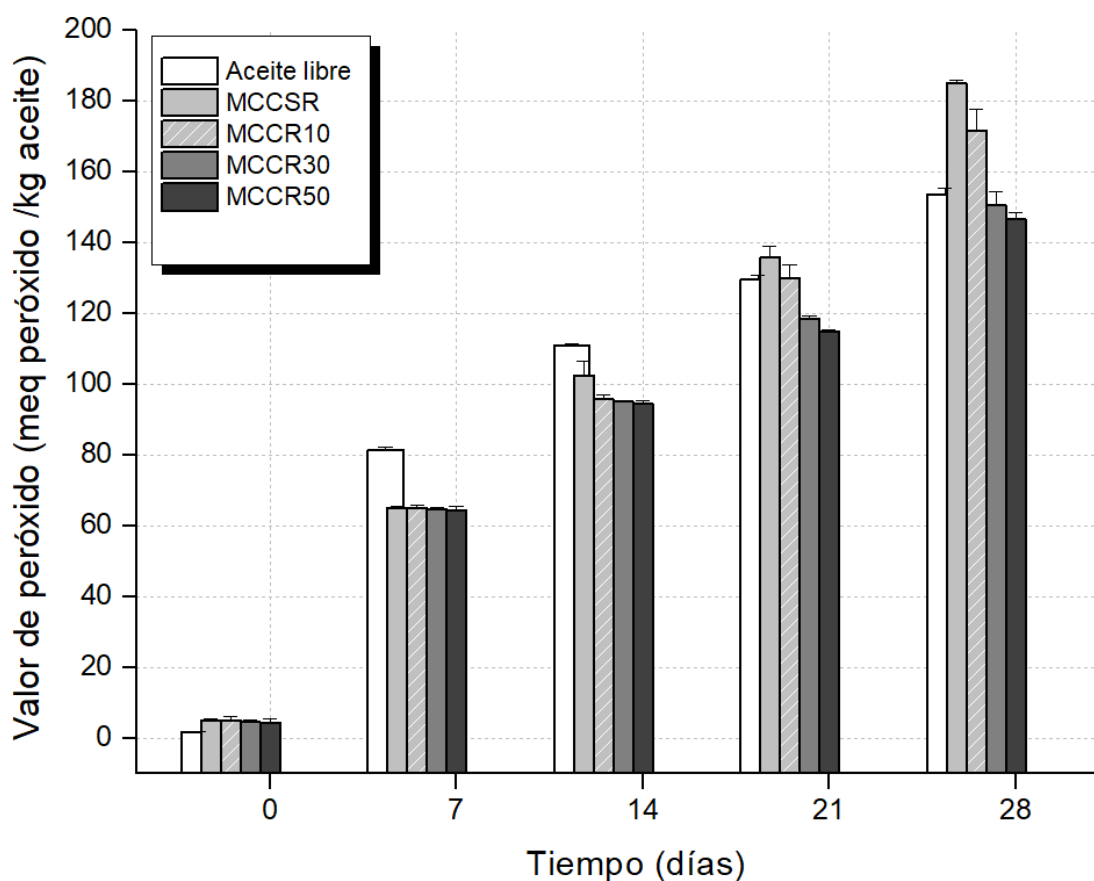


Figura 4.13. Índice de peróxido de aceite libre y encapsulado almacenado por cuatro semanas a 45 °C.

#### 4.18 Humedad

La Tabla 4.4, muestra los valores obtenidos para la humedad contenido en las micropartículas liofilizadas. Los valores de humedad varían de 2.09 a 4.50%, es posible observar menor humedad cuando se utilizó mayor cantidad de material lipídico. Valores próximos de contenido de agua fueron encontrados en trabajo de Rodrigues da Cruz et al. (2019), cuando utilizaron gelatina y goma arábica para producir micropartículas coacervadas liofilizadas.

#### 4.19 Solubilidad de las micropartículas

La evaluación de la solubilidad se realizó para observar el comportamiento de las micropartículas en agua; esto es para verificar si las micropartículas se hidrolizan en este medio. Como se esperaba para micropartículas producidas por coacervación, la solubilidad en agua fue bajo para todas las formulaciones estudiadas, lo que confirma el mantenimiento de la integridad de las micropartículas. Por lo tanto, ambos el método y los agentes de encapsulación utilizados permitieron obtener micropartículas estables en medio acuoso, con favorables propiedades de liberación controlada.

La solubilidad de las micropartículas liofilizadas varió de 4.53 a 7.32%, similar a los obtenidos por Santos et al. (2015 y Rodrigues da Cruz et al. (2019) para micropartículas coacervadas. Los valores bajos de solubilidad son favorables porque es importante para la estabilidad de las micropartículas en un medio acuoso.

#### 4.20 Higroscopicidad de las micropartículas

Los valores de higroscopicidad variaron de 3.47 a 8.44 g/100g, indicando baja higroscopicidad de las micropartículas, facilitando así su conservación y la preservación del material encapsulado. Los valores cercanos a este rango se evidenciaron en las publicaciones para productos encapsulados semejantes (Rodrigues da Cruz et al. 2019).

## CAPITULO VI: CONCLUSIONES

La optimización de la producción de micropartículas por coacervación compleja fue realizada satisfactoriamente utilizando el diseño Box-Behnken. Los resultados muestran, que la cantidad del material activo es determinante para una mayor eficiencia de encapsulación. La óptima eficiencia de encapsulación se encuentra en el rango de **1.25** a **1.61** gramos de aceite para 2.5 g de gelatina y 2.5 g de goma arábica a pH 4.

Los valores predeterminados de los parámetros de producción óptimos fueron consistentes cuando se determinaron los valores experimentales.

La solubilidad e higroscopicidad de las micropartículas fueron bajas, la microscopia óptica evidenció los efectos cuando las micropartículas fueron sometidas a la acción del pH, SDS, temperatura y enzimas digestivas.

Las micropartículas que fueron sometidas a la acción de las enzimas digestivas fueron destruidas con liberación del aceite microencapsulado en condiciones intestinales.

En el estudio de oxidación del aceite microencapsulado, las micropartículas sin recubrimiento fueron menos protectivas y sufrieron mayor oxidación que el aceite libre en la cuarta semana de almacenamiento debido a la superficie de contacto del aceite. Micropartículas reticuladas con 50 U /g. ptn ofrecieron mejor protección al aceite microencapsulado.

## CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

Formular nuevos productos alimenticios utilizando activos microencapsulados para mayor protección

Utilizar otros materiales de biopolimericas para sistemas de encapsulación como el almidón de yuca.

Producir micropartículas con otro método de encapsulación como la gelificación para otras matrices alimenticias como productos de panificación

Desarrollar investigaciones utilizando la técnica de gelificación iónica para incorporar activos a matrices alimenticias como productos de panificación

## CAPÍTULO VII: FUENTES DE INFORMACIÓN

- ALADEDUNYE, F. y PRZYBYLSKI, R., 2014. Phosphatidylcholine and dihydrocaffeic acid amide mixture enhanced the thermo-oxidative stability of canola oil. *Food Chemistry* [en línea], vol. 150, pp. 494-499. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.10.165. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.165>.
- ALVIM, I.D. y GROSSO, C.R.F., 2010. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 30, no. 4, pp. 1069-1076. ISSN 0101-2061. DOI 10.1590/S0101-20612010000400036.
- ANDERSON, D.M.W., HOWLETT, J.F. y MCNAB, C.G.A., 1985. The amino acid composition of the proteinaceous component of gum arabic (*Acacia Senegal* (L.) Willd.). *Food Additives & Contaminants*, vol. 2, no. 3, pp. 159-164. DOI 10.1080/02652038509373539.
- ANVARI, M. y MELITO, H.S.J., 2017. Effect of fish gelatin and gum arabic interactions on concentrated emulsion large amplitude oscillatory shear behavior and tribological properties. *Food Hydrocolloids*, vol. 79, pp. 1-8.
- 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.
- BAS, 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.
- BASHIR, M.J.K., AMR, S.S.A., AZIZ, S.Q., CHOON AUN, N. y SETHUPATHI, S., 2015. Wastewater Treatment Processes Optimization Using Response Surface Methodology (RSM) Compared with Conventional Methods: Review and Comparative Study. *Middle-East Journal of Scientific Research*, vol. 23, no. 2, pp. 244-252. ISSN 1990-9233. DOI

10.5829/idosi.mejsr.2015.23.02.52.

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. DOI <https://doi.org/10.1139/o59-099>.

BOX, G.E.P. y WILSON, K.B., 1951. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, vol. 13, no. 1, pp. 1-38. DOI 10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x.

CAI, Y.Z. y CORKE, H., 2000. Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. *JFS: Sensory and Nutritive Qualities of Food*, vol. 65, no. 3600, pp. 1248-1252.

CALDER, P.C., 2008. Review Polyunsaturated fatty acids , inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. , pp. 885-897. DOI 10.1002/mnfr.200700289.

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.

CANO-CHAUCA, M., STRINGHETA, P.C., RAMOS, A.M. y CAL-VIDAL, J., 2005. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *ScienceDirect*, vol. 6, pp. 420-428. DOI 10.1016/j.ifset.2005.05.003.

CARNEIRO, H.C.F., TONON, R. V., GROSSO, C.R.F. y HUBINGER, M.D., 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering* [en línea], vol. 115, no. 4, pp. 443-451. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033>.

CHANG, C., STONE, A.K. y NICKERSON, M.T., 2018. Microencapsulated Food Ingredients. , pp. 1-5.

CHEN, Z., WANG, Cong, GAO, X., CHEN, Y., SANTHANAM, R.K., WANG,

- Chunli, XU, L. y CHEN, H., 2019. Interaction characterization of preheated soy protein isolate with cyanidin- 3- O -glucoside and their effects on the stability of black soybean seed coat anthocyanins extracts. *Food Chemistry*, vol. 271, no. July 2018, pp. 266-273.
- CHIRINOS, R., ZULOETA, G., PEDRESCHI, R., MIGNOLET, E., LARONDELLE, Y. y CAMPOS, D., 2013. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, vol. 141, no. 3, pp. 1732-1739. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.04.078.
- CHUYEN, H. V, ROACH, P.D., GOLDING, J.B., PARKS, S.E. y NGUYEN, M.H., 2019. Encapsulation of carotenoid-rich oil from Gac peel: Optimisation of the encapsulating process using a spray drier and the storage stability of encapsulated powder. *Powder Technology*, vol. 344, pp. 373-379.
- CIRIMINNA, R., MENEGUZZO, F., DELISI, R. y PAGLIARO, M., 2017. Enhancing and improving the extraction of omega-3 from fish oil. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, vol. 5, no. March, pp. 54-59.
- COELHO, T.L.S., BRAGA, F.M.S., SILVA, N.M.C., DANTAS, C., LOPES JÚNIOR, C.A., DE SOUSA, S.A.A. y VIEIRA, E.C., 2019. Optimization of the protein extraction method of goat meat using factorial design and response surface methodology. *Food Chemistry* [en línea], vol. 281, pp. 63-70. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.12.055. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.055>.
- 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* [en línea], vol. 61, pp. 442-457. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2016.06.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.003>.
- COMUNIAN, T.A., GOMEZ-ESTACA, J., FERRO-FURTADO, R., CONCEIÇÃO, G.J.A., MORAES, I.C.F., DE CASTRO, I.A. y FAVARO-TRINDADE, C.S.,

2016. Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, vol. 150, pp. 319-329. ISSN 01448617. DOI 10.1016/j.carbpol.2016.05.044.
- DA SILVA SOARES, B., PINTO, R.S., DE CARVALHO, M.G., VICENTE, J. y GARCÍA-ROJAS, E.E., 2019. Microencapsulation of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) using complex coacervation : Formation and structural characterization. *Food Chemistry* [en línea], vol. 298, no. June, pp. 125045. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.125045. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125045>.
- DA SILVA SOARES, B., SIQUEIRA, R.P., DE CARVALHO, M.G., VICENTE, J. y GARCIA-ROJAS, E.E., 2019. Microencapsulation of sachcha 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.
- DA SILVA, T.M., DE DEUS, C., DE SOUZA FONSECA, B., LOPES, E.J., CICHOSKI, A.J., ESMERINO, E.A., DE BONA DA SILVA, C., MULLER, E.I., MORAES FLORES, E.M. y DE MENEZES, C.R., 2019. The effect of enzymatic crosslinking on the viability of probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus*) encapsulated by complex coacervation. *Food Research International* [en línea], vol. 125, no. April, pp. 108577. ISSN 18737145. DOI 10.1016/j.foodres.2019.108577. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108577>.
- DE JONG, G. y KOPPELMAN, S., 2002. Transglutaminase Catalyzed Reactions : Impact on Food Applications. *JFS: Concise Reviews and Hypotheses in Food Science*, vol. 67, no. 8, pp. 2798-2806.
- DEVI, N., SARMAH, M., KHATUN, B. y MAJI, T.K., 2017. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide - protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science* [en línea], vol. 239, pp. 136-145. ISSN 0001-8686. DOI 10.1016/j.cis.2016.05.009. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>.
- DONG, Z., XIA, S., HUA, S., HAYAT, K., ZHANG, X.-M. y XU, S.-Y., 2008. Optimization of cross-linking parameters during production of



- transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. *Colloids and Surfaces B*, vol. 63, pp. 41-47. DOI 10.1016/j.colsurfb.2007.11.007.
- DUBEY, R., SHAMI, T.C. y BHASKER RAO, K.U., 2009. Microencapsulation technology and applications. *Defence Science Journal*, vol. 59, no. 1, pp. 82-95. ISSN 0011748X. DOI 10.14429/dsj.59.1489.
- DUCONSEILLE, A., WIEN, F., AUDONNET, F., TRAORE, A., REFREGIERS, M., ASTRUC, T. y SANT, V., 2017. The effect of origin of the gelatine and ageing on the secondary structure and water dissolution. *Food Hydrocolloids*, vol. 66, pp. 378-388.
- ESPINOSA-ANDREWS, H., BAEZ-GONZALES, J.G., CRUZ-SOSA, F. y VERNON-CARTER, E.J., 2007. Gum Arabic - Chitosan Complex Coacervation. *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 1313-1318.
- FAO, J., 2010. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. *FAO food and nutrition paper*. S.I.:
- FERREIRA, S. y NICOLETTI, V.R., 2020. Microencapsulation of ginger oil by complex coacervation using atomization: Effects of polymer ratio and material concentration. *Journal of Food Engineering*, vol. 291, pp. 110214.
- 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.
- FUCHSBAUER, H.L., GERBER, U., ENGELMANN, J., SEEGER, T., SINKS, C. y HECHT, T., 1996. Influence of gelatin matrices crosslinked with transglutaminase on the properties of an enclosed bioactive material using  $\beta$ -galactosidase as model system. *Biomaterials*, vol. 17, no. 15, pp. 1481-1488. ISSN 01429612. DOI 10.1016/0142-9612(96)89772-9.
- FUENTES, N.R., KIM, E., FAN, Y.Y. y CHAPKIN, R.S., 2018. Omega-3 fatty acids, membrane remodeling and cancer prevention. *Molecular Aspects of Medicine* [en línea], vol. 64, no. March, pp. 79-91. ISSN 18729452. DOI 10.1016/j.mam.2018.04.001. Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.04.001>.

GARMENDIA, F., PANDO, R. y RONCEROS, G., 2011. EFECTO DEL ACEITE DE SACHA INCHI (*Plukenetia volúbilis* L) SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO EN PACIENTES CON HIPERLIPOPROTEINEMIA. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, vol. 28, no. 4, pp. 628-632. ISSN 17264642.

GIRARD, M., TURGEON, S.L. y GAUTHIER, S.F., 2002. Interbiopolymer complexing between b -lactoglobulin and low- and high- methylated pectin measured by potentiometric titration and ultra ® ltration. , vol. 16, pp. 585-591.

GU, X., ZHU, X., KONG, X. y TAN, Y., 2010. Comparisons of simple and complex coacervations for preparation of sprayable insect sex pheromone microcapsules and release control of the encapsulated pheromone molecule. , vol. 27, no. 4, pp. 355-364. DOI 10.3109/02652040903221532.

GUPTA, A. y BOHIDAR, H.B., 2005. Kinetics of phase separation in systems exhibiting simple coacervation. , no. July, pp. 1-9. DOI 10.1103/PhysRevE.72.011507.

GUTIÉRREZ, L., 2019. Effects of Dehulling Sacha Inchi ( *Plukenetia volubilis* L .) Seeds on the Physicochemical and Sensory Properties of Oils Extracted by Means of Cold Pressing. , DOI 10.1002/aocs.12270.

GUTIÉRREZ, L., QUIÑONES-SEGURA, Y., SANCHEZ-REINOSO, Z., DÍAZ, D.L. y ABRIL, J.I., 2017. Physicochemical properties of oils extracted from c -irradiated Sacha Inchi ( *Plukenetia volubilis* L .) seeds. *Food Chemistry*, vol. 237, pp. 581-587.

HANANI, Z.A.N., 2016. Gelatin. *Encyclopedia of Food and Health*, pp. 191-195.

HANSEN, L.T., 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bi ç* do bacterium spp . in milk and simulated gastrointestinal conditions. , pp. 35-45. DOI 10.1006/fmic.2001.0452.

HARTMAN, L. y LAGO, C.A., 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, vol. 22, no. 7, pp. 475-476. ISSN 0023-6853.

HOSSEINI, A., JAFARI, S.M., MIRZAEI, H., ASGHARI, A. y AKHAVAN, S.,

2015. Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum. *Carbohydrate Polymers* [en línea], vol. 126, pp. 1-8. ISSN 01448617. DOI 10.1016/j.carbpol.2015.03.020. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.020>.
- ICKERSON, M.I.T.N., 2009. Effect of pH , Salt , and Biopolymer Ratio on the Formation of Pea Protein Isolate - Gum Arabic Complexes. , pp. 1521-1526.
- ITSIOPOULOS, C., MARX, W., MAYR, H.L., TATUCU-BABET, O.A., DASH, S.R., GEORGE, E.S., TRAKMAN, G.L., KELLY, J.T., THOMAS, C.J. y BRAZIONIS, L., 2018. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in the management of type 2 diabetes mellitus : A narrative review. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, vol. 14, pp. 42-51.
- JONG, V.H.G.B. de y KRUYT, H.R., 1930. Koacervation (Entmischungt in kolloiden Systemen.). ,
- JUN-XIA, X., HAI-YAN, Y. y JIAN, Y., 2011. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry* [en línea], vol. 125, no. 4, pp. 1267-1272. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2010.10.063. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.063>.
- JURIĆ, S., JURIĆ, M., SIDDIQUE, A.B. y FATHI, M., 2020. Vegetable Oils Rich in Polyunsaturated Fatty Acids : Nanoencapsulation Methods and Stability Enhancement. *Food Reviews International* [en línea], vol. 00, no. 00, pp. 1-38. ISSN 8755-9129. DOI 10.1080/87559129.2020.1717524. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1717524>.
- KAMAL-ELDIN, A. y YANISHLIEVA, N. V., 2002. N-3 fatty acids for human nutrition: Stability considerations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 104, no. 12, pp. 825-836. ISSN 14387697. DOI 10.1002/1438-9312(200212)104:12<825::AID-EJLT825>3.0.CO;2-N.
- KAMPA, M., NIFLI, P., NOTAS, G. y CASTANAS, E., 2007. Polyphenols and cancer cell growth. , no. June, pp. 79-113. DOI 10.1007/112.
- KAUSHIK, P., DOWLING, K., BARROW, C.J. y ADHIKARI, B., 2015. Complex

- coacervation between flaxseed protein isolate and flaxseed gum. *Food Research International* [en línea], vol. 72, pp. 91-97. ISSN 0963-9969. DOI 10.1016/j.foodres.2015.03.046. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.046>.
- KETNAWA, S., BENJAKUL, S., MARTÍNEZ-ALVAREZ, O. y RAWDKUEN, S., 2017. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. *Food Chemistry*, ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.07.145.
- KLEMMER, K.J., WALDNER, L., STONE, A., LOW, N.H. y NICKERSON, M.T., 2012. Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. *Food Chemistry* [en línea], vol. 130, no. 3, pp. 710-715. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.07.114. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.114>.
- KUMAR, B., SMITA, K., CUMBAL, L. y DEBUT, A., 2014. Synthesis of silver nanoparticles using Sacha inchi ( *Plukenetia volubilis* L .) leaf extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences* [en línea], vol. 21, no. 6, pp. 605-609. ISSN 1319-562X. DOI 10.1016/j.sjbs.2014.07.004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.07.004>.
- KURUNCZI, A., BOLZANI, E., WILHELM, H.M. y PEREIRA, L., 2008. Optimization of the ethanolysis 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.
- LAZKO, J., POPINEAU, Y. y LEGRAND, J., 2004. Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method. , vol. 37, pp. 1-8. DOI 10.1016/j.colsurfb.2004.06.004.
- LIANG, H.C., CHANG, W.H., LIANG, H.F., LEE, M.H. y SUNG, H.W., 2004. Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide. *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 91, no. 6, pp. 4017-4026. ISSN 00218995. DOI 10.1002/app.13563.
- LIU, Yexue, WENG, R., WANG, W., WEIE, X., LI, J., CHEN, X., LIU, Yihan y LI, Y., 2020. Tunable physical and mechanical properties of gelatin hydrogel after transglutaminase crosslinking on two gelatin types. *International*

*Journal of Biological Macromolecules* [en línea], vol. 162, pp. 405-413.  
ISSN 0048-9697. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142649>.

- LV, Y., YANG, F., LI, X., ZHANG, X. y ABBAS, S., 2013. Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin / gum arabic based complex coacervation. *Food Hydrocolloids*, pp. 1-10. DOI 10.1016/j.foodhyd.2013.06.003.
- LYTLE, J.S., LYTLE, T.F., NEWMARK, H.L. y DESCHNER, E.E., 2009. Stability of a commercially prepared fish oil ( omega - 3 fatty acid ) laboratory rodent diet. , no. January 2015, pp. 37-41. DOI 10.1080/01635589209514186.
- MA, T., ZHAO, H., WANG, J. y SUN, B., 2019. Effect of processing conditions on the morphology and oxidative stability of lipid microcapsules during complex coacervation. *Food Hydrocolloids*, vol. 87, no. 11, pp. 637-643. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2018.08.053.
- MEDINA-MENDOZA, M., RODRIGUEZ-PÉREZ, R.J., ROJAS-OCAMPO, E., TORREJÓN-VALQUI, L., FERNÁNDEZ-JERI, A.B., IDROGO-VÁSQUEZ, G., CAYO-COLCA, I.S. y CASTRO-ALAYO, E.M., 2021. Rheological, bioactive properties and sensory preferences of dark chocolates with partial incorporation of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Heliyon*, vol. 7, no. 2. ISSN 24058440. DOI 10.1016/j.heliyon.2021.e06154.
- MIWA, N., 2020. Innovation in the food industry using microbial transglutaminase: Keys to success and future prospects. *Analytical Biochemistry*, vol. 597, pp. 113698.
- MOHAMAD SAID, K.A. y MOHAMED AMIN, M.A., 2016. Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes. *Journal of Applied Science & Process Engineering*, vol. 2, no. 1, pp. 8-17. ISSN 2289-7771. DOI 10.33736/jaspe.161.2015.
- MOHAMMED, N.K., TAN, C.P., MANAP, Y.A., MUHIALDIN, B.J. y HUSSIN, A.S.M., 2020. *Spray Drying for the Encapsulation of Oils—A Review*. 2020. S.l.: s.n.
- MOHD YUSOP, F.H., MANAF, S.F.A. y HAMZAH, F., 2017. Preservation of Bioactive Compound via Microencapsulation. *Chemical Engineering*

*Research Bulletin*, vol. 19, pp. 50. ISSN 0379-7678. DOI 10.3329/cerb.v19i0.33796.

- MOZZI, F., GERBINO, E., DE VALDEZ, G. y TORINO, M.I., 2009. Functionality of Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an in vitro gastric system. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 107, no. 1, pp. 56-64. ISSN 13645072. DOI 10.1111/j.1365-2672.2009.04182.x.
- MUNIN, A. y EDWARDS-LÉVY, F., 2011. *Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review*. S.l.: s.n. ISBN 3332691805.
- MUÑOZ, A.M.J., 2013. Estudio nutricional de Plukenetia huayllabambana. , vol. 79, no. 1, pp. 47-56.
- MYERS, R.H., MONTGOMERY, D.C., GEOFFREY VINING, G., BORROR, C.M. y KOWALSKI, S.M., 2004. Response Surface Methodology: A Retrospective and Literature Survey. *Journal of Quality Technology*, vol. 36, no. 1, pp. 53-78. ISSN 00224065. DOI 10.1080/00224065.2004.11980252.
- NIU, F., DONG, Y., SHEN, F., WANG, J., LIU, Y. y SU, Y., 2015. Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin e gum arabic complex coacervation. *Food hydrocolloids* [en línea], vol. 43, pp. 1-7. ISSN 0268-005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2014.02.009. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.009>.
- NOEL, J.-M. y LEMINEUR, J.-F., 2020. Optical microscopy to study single nanoparticles electrochemistry: from reaction to motion. *Current Opinion in Electrochemistry* [en línea], vol. 184, no. August, pp. 107229. ISSN 0360-1323. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2020.107229>.
- NOGUEIRA, M.S., SCOLARO, B., MILNE, G.L. y CASTRO, I.A., 2019. Oxidation products from omega-3 and omega-6 fatty acids during a simulated shelf life of edible oils. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 101, no. July 2018, pp. 113-122.
- OCAK, B., GÜLÜMSER, G. y BALOĞLU, E., 2012. Microencapsulation of Melaleuca alternifolia ( Tea Tree ) Oil by Using Simple Coacervation Method Microencapsulation of Melaleuca alternifolia ( Tea Tree ) Oil by Using Simple Coacervation Method. *Journal of Essential Oil Research*, no.

July 2012, pp. 37-41. DOI

<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2011.9700470> PLEASE.

OZKAN, G., FRANCO, P., DE MARCO, I., XIAO, J. y CAPANOGLU, E., 2019.

A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, vol. 272, no.

August 2018, pp. 494-506. ISSN 18737072. DOI

10.1016/j.foodchem.2018.07.205.

PAL, J., SHUKLA, B.N., MAURYA, A.K. y VERMA, H.O., 2018. A review on role

of fish in human nutrition with special emphasis to essential fatty acid.

*International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, vol. 6, no. 2, pp.

427-430. ISSN 2394-0506.

PARETA, R.A., MCQUILLING, J.P., FARNEY, A.C. y OPARA, E.C., 2014.

*Microencapsulation Technology* [en línea]. S.I.: Elsevier Inc. Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398523-1.00043-4>.

PAULO, F. y SANTOS, L., 2017. Design of experiments for microencapsulation

applications : A review. *Materials Science and Engineering C* [en línea], vol.

77, pp. 1327-1340. ISSN 0928-4931. DOI 10.1016/j.msec.2017.03.219.

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>.

PAULO, F. y SANTOS, L., 2021. Deriving valorization of phenolic compounds

from olive oil by-products for food applications through microencapsulation

approaches: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science*

*and Nutrition* [en línea], vol. 61, no. 6, pp. 920-945. ISSN 15497852. DOI

10.1080/10408398.2020.1748563. Disponible en:

<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1748563>.

PHAM, H.N.T., VUONG, Q. Van, BOWYER, M.C. y SCARLETT, C.J., 2017.

Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Helicteres hirsuta* Lour .

for enhanced total phenolic compound and antioxidant yield. *Journal of*

*Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, vol. 7, no. July, pp.

113-123.

PRAKASH MARAN, J., MANIKANDAN, S., VIGNA NIVETHA, C. y DINESH, R.,

2013. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from

*Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered

- response surface design. *Arabian Journal of Chemistry* [en línea], vol. 10, pp. S1145-S1157. ISSN 18785352. DOI 10.1016/j.arabjc.2013.02.007. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.007>.
- PRASAD, Y., WANG, B., ADHIKARI, R. y ADHIKARI, B., 2017. Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) -rich plant oils using complex coacervation: A review. *Food hydrocolloids* [en línea], vol. 69, pp. 369-381. ISSN 0268-005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2017.03.007. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.007>.
- QV, X., ZENG, Z. y JIANG, J., 2011. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food hydrocolloids*, vol. 25, no. 6, pp. 1596-1603. ISSN 0268-005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2011.01.006.
- RAEI, M., RAFE, A. y SHAHIDI, F., 2018. Rheological and structural characteristics of whey protein-pectin complex coacervates. *Journal of Food Engineering*, vol. 228, pp. 25-31. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2018.02.007.
- RAFIEIAN, F., KERAMAT, J. y KADIVAR, M., 2013. Optimization of gelatin extraction from chicken deboner residue using RSM method. *Journal of Food Science and Technology*, vol. 50, no. 2, pp. 374-380. ISSN 09758402. DOI 10.1007/s13197-011-0355-7.
- RAHMAN, M.M., PERVEZ, S., NESA, B. y KHAN, M.A., 2012. Preparation and characterization of porous scaffold composite films by blending chitosan and gelatin solutions for skin tissue engineering. *Polymer International*, vol. 62, no. 1, pp. 79-86. DOI 10.1002/pi.4299.
- RANDALL, R.C., PHILLIPS, G.O. y WILLIAMS, P.A., 1988. *The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic*. 1988. S.l.: s.n.
- RAVE, M.C., ECHEVERRI, J.D. y SALAMANCA, C.H., 2019. Improvement of the physical stability of oil-in-water nanoemulsions elaborated with Sacha inchi oil employing ultra-high-pressure homogenization. *Journal of Food Engineering* [en línea], pp. 109801. ISSN 0260-8774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2019.109801. Disponible en:



<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109801>.

- RIOS-MERA, J.D., SALDAÑA, E., RAMÍREZ, Y., AUQUIÑIVÍN, E.A., ALVIM, I.D. y CONTRERAS-CASTILLO, C.J., 2019. Encapsulation optimization and pH- and temperature-stability of the complex coacervation between soy protein isolate and inulin entrapping fish oil. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 116, no. August.
- RODRIGUES DA CRUZ, M.C., DAGOSTIN, J.L., PERUSSELLO, C.A. y MASSON, M.L., 2019. Assessment of physicochemical characteristics, thermal stability and release profile of ascorbic acid microcapsules obtained by complex coacervation. *Food Hydrocolloids*, vol. 87, no. April 2018, pp. 71-82. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2018.07.043.
- RODRÍGUEZ, G., SQUEO, G., ESTIVI, L., QUEZADA BERRU, S., BULEJE, D., CAPONIO, F., BRANDOLINI, A. y HIDALGO, A., 2021. Changes in stability, tocopherols, fatty acids and antioxidant capacity of sachu inchi (*Plukenetia volubilis*) oil during French fries deep-frying. *Food Chemistry*, vol. 340, no. April 2020. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2020.127942.
- ROSENBERG, M. y YOUNG, S.L., 1993. Whey Proteins as Microencapsulating Agents. Microencapsulation of Anhydrous Milkfat - Structure Evaluation. *Food Structure*, vol. 12, no. 12, pp. 31-41. ISSN 00220302.
- ROY, J.C., SALAÜN, F., GIRAUD, S., FERRI, A. y GUAN, J., 2017. Surface Behavior Bulk Properties of Aqueous Chitosan and Type-B Gelatin Solutions for Effective Emulsion Formulation. *Carbohydrate Polymers*, vol. 173, pp. 202-214. ISSN 01448617. DOI 10.1016/j.carbpol.2017.06.001.
- RUBIO-RODRÍGUEZ, N., BELTRÁN, S., JAIME, I., DE DIEGO, S.M., SANZ, M.T. y CARBALLIDO, J.R., 2010. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 11, no. 1, pp. 1-12. ISSN 14668564. DOI 10.1016/j.ifset.2009.10.006.
- RUIZ-CARRASCAL, J. y REGENSTEIN, J.M., 2002. Emulsion Stability and Water Uptake Ability of Chicken Breast Muscle proteins as Affected by Microbial Transglutaminase. *Food Engineering and Physical Properties*,

vol. 67, no. 2, pp. 734-739.

SAINI, R.K. y KEUM, Y.-S., 2018. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance: A review. *Life Sciences*, vol. 203, no. April, pp. 255-267.

SALCEDO-SANDOVAL, L., RUIZ-CAPILLAS, C., COFRADES, S., TRIKI, M. y JIMÉNEZ-COLMENERO, F.F., 2015. Shelf-life of n-3 PUFA enriched frankfurters formulated with a konjac-based oil bulking agent. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 62, pp. 711-717. DOI 10.1016/j.lwt.2015.01.043.

SANCHEZ, C., NIGEN, M., MEJIA TAMAYO, V., DOCO, T., WILLIAMS, P., AMINE, C. y RENARD, D., 2018. Acacia gum: History of the future. *Food Hydrocolloids* [en línea], vol. 78, pp. 140-160. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2017.04.008. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.008>.

SÁNCHEZ, F.M., GARCÍA, F., CALVO, P., BERNALTE, M.J. y GONZÁLEZ-GÓMEZ, D., 2016. Optimization of broccoli microencapsulation process by complex coacervation using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 34, pp. 243-249.

SANTOS, M.G., BOZZA, F.T., THOMAZINI, M. y FAVARO-TRINDADE, C.S., 2015. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. *Food Chemistry*, vol. 171, pp. 32-39. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2014.08.093.

SCHMITT, C., SANCHEZ, C., THOMAS, F. y HARDY, J., 1999. Complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. , vol. 13, pp. 483-496.

SCHMITT, C. y TURGEON, S.L., 2011. Protein - polysaccharide complexes and coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 167, pp. 63-70. DOI 10.1016/j.cocis.2007.07.007.

SCHUCK, P., DOLIVET, A., MÉJEAN, S., ZHU, P., BLANCHARD, E. y JEANTET, R., 2009. Drying by desorption: A tool to determine spray drying parameters. *Journal of Food Engineering* [en línea], vol. 94, no. 2, pp. 199-204. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2008.08.014. Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.08.014>.

SE, G., 2004. Micro-encapsulation : industrial appraisal of existing technologies and trends. , vol. 15, pp. 330-347. DOI 10.1016/j.tifs.2003.10.005.

SERFERT, Y., DRUSCH, S. y SCHWARZ, K., 2010. Sensory odour profiling and lipid oxidation status of fish oil and microencapsulated fish oil. *Food Chemistry*, vol. 123, no. 4, pp. 968-975. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2010.05.047.

SHADDEL, R., HESARI, J., AZADMARD-DAMIRCHI, S. y HAMISHEHKAR, H., 2018. Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation International Journal of Biological Macromolecules Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervat. *International Journal of Biological Macromolecules* [en línea], vol. 107, no. January 2018, pp. 1800-1810. ISSN 0141-8130. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.044. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.044>.

SHAHIDI, F. y AMBIGAIPALAN, P., 2018. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annual review of Food Science and Technology*,

SHANTA, N.C. y DECKER, E.A., 1994. Rapid, sensitive, Iron-Based Spectrophotometric Methods for Determination of Peroxide Values of Food Lipids. *Journal of AOAC International*, vol. 77, no. 2, pp. 421-424.

SHIMOKAWA, K., SAEGUSA, K., WADA, Y. y ISHII, F., 2013. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Physicochemical properties and controlled drug release of microcapsules prepared by simple coacervation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 104, pp. 1-4. ISSN 0927-7765. DOI 10.1016/j.colsurfb.2012.11.036.

SOKOŁA-WYSOCZAŃSKA, E., WYSOCZAŃSKA, T., WAGNER, J., CZYŻ, K., BODKOWSKI, R., LOCHYŃSKI, S. y PATKOWSKA-SOKOŁA, B., 2018. Polyunsaturated Fatty Acids and Their Potential Therapeutic Role in Cardiovascular System Disorders – A Review. *Nutrients*, pp. 1-21. DOI 10.3390/nu10101561.

SONG, F., ZHANG, L.M., YANG, C. y YAN, L., 2009. Genipin-crosslinked

- casein hydrogels for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 373, no. 1-2, pp. 41-47. ISSN 03785173. DOI 10.1016/j.ijpharm.2009.02.005.
- SOSNIK, A. y SEREMETA, K.P., 2015. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science* [en línea], vol. 223, pp. 40-54. ISSN 00018686. DOI 10.1016/j.cis.2015.05.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>.
- SOUZA, A.C., GURAK, P. y FERREIRA MARCZAK, L., 2017. Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace. *Food and Bioprocesses Processing* [en línea], vol. 102, pp. 186-194. ISSN 09603085. DOI 10.1016/j.fbp.2016.12.012. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.012>.
- SULTANA, K., GODWARD, G., REYNOLDS, N., ARUMUGASWAMY, R., PEIRIS, P. y KAILASAPATHY, K., 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 62, no. 1-2, pp. 47-55. ISSN 01681605. DOI 10.1016/S0168-1605(00)00380-9.
- SUNG, H.W., HUANG, D.M., CHANG, W.H., HUANG, R.N. y HSU, J.C., 1999. Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study. *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 46, no. 4, pp. 520-530. ISSN 00219304. DOI 10.1002/(SICI)1097-4636(19990915)46:4<520::AID-JBM10>3.0.CO;2-9.
- TANEJA, A. y SINGH, H., 2012. Challenges for the Delivery of Long-Chain n-3 Fatty Acids in Functional Foods. *Annual Review of Food Science and Technology* [en línea], vol. 3, no. 1, pp. 105-123. ISSN 1941-1413. DOI 10.1146/annurev-food-022811-101130. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-022811-101130>.
- TELLO, F., PRATA, A.S., RODRIGUES, R.A.F., SARTORATTO, A. y GROSSO, C.R.F., 2016. Improving the performance of transglutaminase-

- crosslinked microparticles for enteric delivery. *Food Research International* [en línea], vol. 88, pp. 153-158. ISSN 09639969. DOI 10.1016/j.foodres.2016.02.020. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.020>.
- TILAHUN, A. y CHUN, B., 2016. Optimization of coffee oil flavor encapsulation using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology* [en línea], vol. 70, pp. 126-134. ISSN 0023-6438. DOI 10.1016/j.lwt.2016.02.025. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.025>.
- TIMILSENA, Y.P., AKANBI, T.O., KHALID, N., ADHIKARI, B. y BARROW, C.J., 2018. PT US CR. *International Journal of Biological Macromolecules*, pp. #pagerange#. ISSN 0141-8130. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144.
- TIMILSENA, Y.P., WANG, B., ADHIKARI, R. y ADHIKARI, B., 2017. Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. *Food Hydrocolloids*, vol. 69, pp. 369-381. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2017.03.007.
- TVRZICKA, E., KREMMYDA, L.S., STANKOVA, B. y ZAK, A., 2011. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers*, vol. 155, no. 2, pp. 117-130. ISSN 12138118. DOI 10.5507/bp.2011.038.
- VALENZUELA, R., BARRERA, C., GONZÁLEZ-ASTORGA, M., SANHUEZA, J. y VALENZUELA, A., 2014. Alpha linolenic acid (ALA) from Rosa canina, sacha inchi and chia oils may increase ALA accretion and its conversion into n-3 LCPUFA in diverse tissues of the rat. *Food and Function*, vol. 5, no. 7, pp. 1564-1572. ISSN 2042650X. DOI 10.1039/c3fo60688k.
- VAN DAEL, P., 2021. Role of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in human nutrition and health: review of recent studies and recommendations. *Nutrition Research and Practice* [en línea], vol. 15, no. 2, pp. 137. DOI Role of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in human nutrition and health: review of recent studies and recommendations. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8007408/>.

- VELASCO, J., DOBARGANES, C. y MÁRQUEZ-RUIZ, G., 2003. Variables affecting lipid oxidation in dried microencapsulated oils Dried microencapsulated oils are essentially. *Grasas y Aceites*, vol. 54, no. 3, pp. 304-314.
- VICENTE, J., GERALDO, M., CARVALHO, D. y GARCIA-ROJAS, E.E., 2015. Fatty acids profile of Sacha Inchi oil and blends by <sup>1</sup>H NMR and GC - FID. *FOOD CHEMISTRY*, vol. 181, pp. 215-221. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.02.092.
- WALZ, M., HAGEMANN, D., TRENTZSCH, M., WEBER, A. y HENLE, T., 2018. Degradation studies of modified inulin as potential encapsulation material for colon targeting and release of mesalamine. *Carbohydrate Polymers*, vol. 199, no. July, pp. 102-108. ISSN 01448617. DOI 10.1016/j.carbpol.2018.07.015.
- WANG, B., ADHIKARI, B. y BARROW, C.J., 2014. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin - sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food Chemistry*, vol. 158, pp. 358-365.
- WANG, S., ZHU, F. y KAKUDA, Y., 2018. Sacha inchi ( *Plukenetia volubilis* L .): Nutritional composition , biological activity , and uses Seed kernels. , vol. 265, no. April, pp. 316-328.
- WEINBRECK, F., MINOR, M. y KRUIF, C.G.D.E., 2004. Microencapsulation of oils using whey protein / gum arabic coacervates. *Journal of Microencapsulation*, vol. 21, no. 6, pp. 667-679. DOI 10.1080/02652040400008499.
- 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.
- YOKOYAMA, K., NIO, N. y KIKUCHI, Y., 2004. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 64, no. 4, pp. 447-454. ISSN 01757598. DOI 10.1007/s00253-003-1539-5.
- ZAHRAEE, S.M., MEMARI, A., REZAEI, G., AFSHAR, J. y ROHANI, J.B.M., 2013. Teaching the Design of Experiment and Response Surface Methodology Using Paper Helicopter Experiment. *The 4th International*

*Graduate Conference on Engineering Science & Humanity*. S.l.: s.n., pp. 1-11.