

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA



## FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

### ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN HUMANA

#### TESIS

ADSORCIÓN DE PROTEÍNA EN HIDROGELES: PRODUCCIÓN,  
CARACTERIZACIÓN Y SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL *in vitro*.

#### **Autores:**

Bach. Estefany Deyhanyra Rengifo Silvano

Bach. Angelo Luis Torres Ipanama

#### **Asesores:**

Dr. Fernando Tello Célis

Ing. Giorgio Sergio Urro Rodríguez M.Sc.

**IQUITOS – PERÚ**

**2018**

## **TESIS**

**Titulo: “ADSORCIÓN DE PROTEÍNA EN HIDROGELES: PRODUCCIÓN,  
CARACTERIZACIÓN Y SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL *in vitro*”**

## AUTORIZACIÓN DE LOS ASESORES

El Dr. Fernando Tello Célis, docente asociado adscrito al Departamento de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias, el MSc. Giorgio Sergio Urro Rodríguez, docente asociado adscrito al Departamento de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias.

### INFORMAMOS:

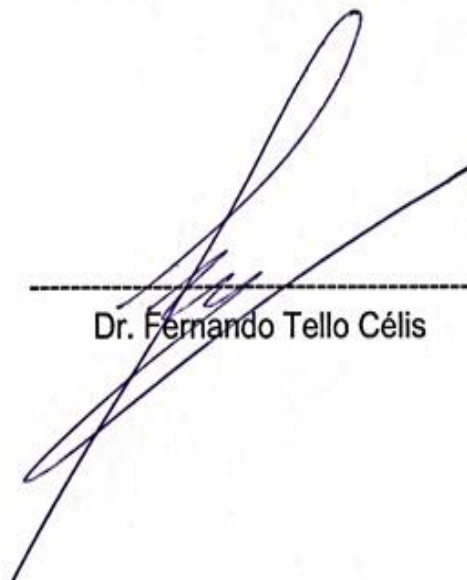
Que los Bachilleres **ESTEFANY DEYHANYRA RENGIFO** y **ANGELO LUIS TORRES IPANAMA**, han realizado bajo nuestra dirección, el trabajo contenido en la memoria intitulada: **ADSORCIÓN DE PROTEÍNA EN HIDROGELES: PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO***; y, considerando que 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: **LICENCIADO EN BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN HUMANA**.

### AUTORIZAMOS:

A los citados Bachilleres 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.



MSc. Giorgio Sergio Urro Rodríguez

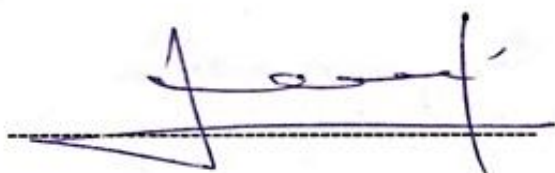


Dr. Fernando Tello Célis

## MIEMBROS DEL JURADO

Tesis aprobada en la Sustentación Pública el 12 de Abril del 2018 por el Jurado nombrado por la Dirección de la Escuela de Formación Profesional de Bromatología y Nutrición Humana para optar el Título de:

### LICENCIADO EN BROMATOLOGIA Y NUTRICION HUMNANA



Ing. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo

Presidente



Blga. Jessy Vásquez Chumbe

Miembro Titular



Ing. Littmán Gonzales Rios

Miembro Titular



Ing. Felix Humberto Cabrera Sánchez

Miembro Suplente



**UNAP**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Escuela de formación Profesional de Bromatología y  
Nutrición Humana.

## ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, siendo las .....<sup>16:20</sup> horas del día Jueves 12 de abril de 2018, en las instalaciones del Auditorium de la Facultad de Ciencias Económicas y de Negocios (FACEN) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, ubicado en la calle Nanay N° 352 de esta ciudad, se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis "**ADSORCIÓN DE PROTEÍNA EN HIDROGELES: PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL IN VITRO**", presentado por los Bachilleres: **ESTEFANY DEYHANYRA RENGIFO SILVANO** y **ANGELO LUIS TORRES IPANAMA**, con el asesoramiento de don **Fernando Tello Celis**, don **Giorgio Sergio Urro Rodríguez**.

Estando el Jurado Calificador conformado por los siguientes miembros, según Resolución Decanal N° 083-FIA-UNAP-2018, del 02 de Marzo de 2018.

Ing. ALENGUER GERÓNIMO ALVA ARÉVALO	:	Presidente
Blga. JESSY PATRICIA VÁSQUEZ CHUMBE	:	Miembro
Ing. LITTMAN GONZALES RÍOS	:	Miembro
Ing. FÉLIX HUMBERTO CABRERA SÁNCHEZ	:	Miembro Suplente

Siendo las .....<sup>17:20</sup> horas del mismo día, se dio por concluida la sustentación, habiendo sido .....<sup>APROBADO</sup> con la nota de .....<sup>10</sup> y el calificativo de .....<sup>EXCELENTE</sup>, estando los bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de Licenciados en Bromatología y Nutrición Humana.

El Jurado Calificador alcanzará a los sustentantes, si el caso lo requiere, las correcciones u observaciones presentadas.

  
**Alenguer Gerónimo Alva Arévalo**  
 Ingeniero en Industrias Alimentarias  
 CIP: 45167  
 Presidente

  
**Blga. Jessy Vásquez Chumbe**  
 CBP: 2584  
 Miembro Titular

  
**LITTMAN GONZALES RÍOS**  
 INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS  
 CIP: 35163  
 Miembro Titular

  
**Félix Humberto Cabrera Sánchez**  
 Ingeniero en Industrias Alimentarias  
 CIP: 77142  
 Miembro Suplente



## **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 mis padres, quienes siempre me han apoyado incondicionalmente, alentándome a luchar por mis sueños; así como el denodado apoyo de mi asesor principal.

*Estefany Deyhanyra*

Dedico este trabajo a Dios por las bendiciones y la oportunidad que me brindó para poder tener esta experiencia de investigación.

A mis adorados padres por brindarme su amor y apoyo económico y moral en los momentos que más lo necesite.

A todas las personas que contribuyeron a mi formación personal y profesional.

*Angelo Luis*

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, por el financiamiento otorgado al desarrollo de este trabajo de investigación a través del proyecto “Encapsulación de aceites de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) y aguaje (*Mauritia flexuosa*) en matrices poliméricas aplicadas a alimentos”, Resolución Rectoral n.º 0685-2015-UNAP.

A nuestros asesores, el Dr. Fernando Tello Célis, por su paciencia, amabilidad y carisma para enseñar las cosas, siendo ejemplo de dedicación y exigencia. Por el gran esfuerzo y apoyo incondicional que nos brindó durante la realización de este trabajo. Y el Ingº M.Sc. Giorgio Sergio Urro Rodríguez, por ser parte de este trabajo.

A los miembros del jurado calificador: Dr. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo, MSc. Jessy Patricia Vásquez Chumbe, Dr. Littman Gonzáles Ríos, Dr. Felix Humberto Cabrera Sánchez, por la atención y por las sugerencias presentadas para la finalización de esta tesis.

Al Ingº M.Sc. Rafael Segundo Vela Paredes por su asesoría en la redacción de la tesis y en el análisis estadístico, así mismo, por compartir sus valiosos conocimientos que fueron de gran ayuda para mejorar este trabajo, y por su amistad y apoyo incondicional.

A nuestros compañeros: Kitty, Patricia, Esteban, Nancy, Fernando, Claudia y Abby por su apoyo, amistad y por las gratas experiencias compartidas.

*Estefany Deyhanyra y Angelo Luis.*

## Resumen

La microencapsulación permite la obtención de hidrogeles capaces de proteger y mantener la estabilidad de bioactivos en condiciones adversas. No obstante, la estructura del hidrogel presenta permeabilidad, lo cual puede afectar la funcionalidad del bioactivo microencapsulado. Ante esto, el recubrimiento con proteínas es una solución ampliamente utilizada. Por otro lado, sangre bovina (SB) y clara de huevo (CH), son fuentes proteicas que aún no han sido aprovechadas como material de recubrimiento para hidrogeles. En este estudio, produjimos hidrogeles de pectina ( $H_{PEC}$ ) y alginato ( $H_{ALG}$ ) recubiertos con proteínas de SB y CH a distintas concentraciones (2, 4, 8, 10%). Los hidrogeles, fueron caracterizados en cuanto a adsorción proteica, humedad, ceniza, morfología y tamaño medio. Posteriormente, los hidrogeles con recubrimiento proteico de mayor concentración (10%) fueron expuestos a condiciones gastrointestinales *in vitro*, y evaluados en cuanto a resistencia física y solubilidad proteica. Fue observado, que la cantidad adsorbida de proteínas fue significativamente mayor en  $H_{PEC}$  ( $p < 0.05$ ) comparado con  $H_{ALG}$ , independientemente del tipo y concentración de proteína utilizada. Asimismo, el incremento de la concentración de proteína en solución resultó en mayor adsorción de proteína independientemente del tipo de hidrogel. Las estructuras de  $H_{PEC}$  recubiertos cedieron al final de la simulación gastrointestinal, en cambio,  $H_{ALG}$  recubiertos mostraron resistencia. Paralelamente, los valores de solubilidad proteica, sobrepasaron el 80% cuando los hidrogeles recubiertos fueron expuestos a condiciones intestinales. Los resultados encontrados demuestran que es posible la utilización de la sangre bovina y clara de huevo como material de recubrimiento de hidrogeles, logrando los efectos esperados, en cuanto a adsorción solubilidad en ambientes específicos. De manera que, el uso de esta tecnología tiene un gran potencial para futuros usos en la industria de alimentos y farmacéutica.

*Palabras claves: hidrogeles, gelificación iónica, sangre bovina, clara de huevo, resistencia gastrointestinal.*



## Abstract

Microencapsulation allows the obtaining of hydrogels capable of protecting and maintaining the stability of bioactive agents in adverse conditions. However, the structure of the hydrogel presents permeability, which can affect the functionality of the microencapsulated bioactive material, therefore, the coating with proteins is a widely used solution. On the other hand, bovine blood (SB) and egg white (CH) are protein sources that have not yet been used as a coating material for hydrogels. In this study, we produced pectin hydrogels (HPEC) and alginate (HALG) coated with SB and CH proteins at different concentrations (2, 4, 8, 10%). Which were characterized in terms of protein adsorption, humidity, ash, morphology and average size. Subsequently, the hydrogels with protein coating of higher concentration (10%) were exposed to gastrointestinal conditions *in vitro*, and evaluated in terms of physical resistance and protein solubility. It was observed that the adsorbed amount of proteins was significantly higher in H<sub>PEC</sub> ( $p < 0.05$ ) compared to H<sub>ALG</sub>, regardless of the type and concentration of protein used. Likewise, the increase in protein concentration in solution resulted in higher protein adsorption regardless of the type of hydrogel used. The structures of coated H<sub>PEC</sub> yielded at the end of the gastrointestinal simulation, whereas, coated H<sub>ALG</sub> showed resistance. In parallel, protein solubility values exceeded 80% when the coated hydrogels were exposed to intestinal conditions. The results show that it is possible to use bovine blood and egg white as hydrogel coating material, achieving the expected effects, in terms of adsorption, resistance and solubility in specific environments. So, the use of this technology has great potential for future uses in the food and pharmaceutical industry.

Keywords: hydrogels, ionic gelation, bovine blood, egg white, gastrointestinal resistance.

## Índice

Dedicatoria .....	i
Agradecimiento .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Resumen .....	iii
Abstract .....	iv
Índice .....	v
Lista de Tablas .....	viii
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Abreviaturas .....	x
I. INTRODUCCIÓN .....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
2.1. Microencapsulación. ....	5
2.2. Hidrogeles .....	6
2.2.1. Aplicaciones de hidrogeles .....	6
2.2.2. Biopolímeros utilizados para producir hidrogeles .....	7
2.2.2.1. Pectina .....	8
2.2.2.2. Alginato .....	8
2.2.2.3. Proteínas de clara de huevo .....	9
2.2.2.4. Proteínas de sangre bovina .....	10
2.2.3. Producción de hidrogeles .....	10
2.2.3.1. Gelificación iónica .....	11
2.2.3.2. Interacción electrostática .....	11
2.2.3.2.1. Punto isoeléctrico (pI) .....	12
2.2.3.2.2. Constante de disociación ácida (Pka) .....	12
2.2.3.3. Coacervación compleja .....	12
2.3. Adsorción de proteínas .....	13
2.4. Solubilidad de proteínas .....	14
2.5. Hidrogeles recubiertos sometidos a condiciones gastrointestinales simuladas	15
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	18
3.1. Materiales .....	18
3.2. Equipos .....	19
3.3. Métodos .....	20

3.3.1.	Caracterización de los biopolímeros .....	20
3.3.1.1.	Determinación de humedad .....	20
3.3.1.2.	Determinación de proteína .....	20
3.3.1.3.	Determinación de lípidos.....	20
3.3.1.4.	Determinación de ceniza.....	20
3.3.2.	Producción de hidrogeles.....	21
3.3.3.	Caracterización de los hidrogeles producidos por gelificación iónica .21	
3.3.3.1.	Análisis de humedad.....	21
3.3.3.2.	Análisis de cenizas .....	21
3.3.3.3.	Lípidos .....	21
3.3.3.4.	Eficiencia de encapsulación.....	21
3.3.3.5.	Morfología y determinación de tamaño medio .....	22
3.3.4.	Recubrimiento de los hidrogeles con proteínas de sangre bovina y clara de huevo.....	22
3.3.5.	Caracterización de los hidrogeles recubiertos con proteínas de sangre bovina y clara de huevo.....	22
3.3.5.1.	Determinación de adsorción de proteínas.....	23
3.3.5.2.	Análisis de humedad.....	23
3.3.5.3.	Análisis de cenizas .....	23
3.3.5.4.	Análisis de lípidos .....	24
3.3.5.5.	Morfología y determinación del tamaño medio .....	24
3.3.6.	Simulación del sistema gastrointestinal in vitro.....	24
3.3.7.	Análisis de los datos .....	25
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
4.1	Caracterización de los biopolímeros. ....	27
4.2.	Producción de hidrogeles por gelificación iónica.....	28
4.3.	Caracterización de los hidrogeles.....	29
4.4.	Recubrimiento de hidrogeles de alginato y pectina con proteínas de clara de huevo y sangre bovina en estado natural por interacción electrostática	32
4.5.	Caracterización de hidrogeles recubiertos.....	34
4.5.1.	Humedad de hidrogeles recubiertos con proteínas .....	34
4.5.2.	Ceniza .....	35
4.5.3.	Morfología y determinación de tamaño medio.....	36

4.6.	Resistencia de hidrogeles de pectina y alginato con y sin recubrimiento de proteínas de sangre bovina y clara de huevo, sometidas a condiciones gastrointestinales.....	38
4.7.	Solubilidad de proteínas adsorbidas en hidrogeles sometidas a condiciones gastrointestinales.....	44
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	47
5.1.	Conclusiones .....	47
5.2.	Recomendaciones .....	48
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## Lista de Tablas

<b>Tabla 4.1.</b> Caracterización de biopolímeros.....	27
<b>Tabla 4.2.</b> Caracterización de los hidrogeles producidos por gelificación iónica.....	29
<b>Tabla 4.3.</b> Cantidad de proteína adsorbida en hidrogeles de pectina y alginato.....	33
<b>Tabla 4.4.</b> Contenido de humedad de hidrogeles recubiertos a diferentes concentraciones.....	35
<b>Tabla 4.5.</b> Caracterización de ceniza en hidrogeles recubiertos con proteínas al 10%.....	36
<b>Tabla 4.6.</b> Tamaño medio de hidrogeles recubiertos con proteínas.....	36
<b>Tabla 4.7.</b> Solubilidad de proteínas adsorbidas en hidrogeles de pectina y alginato sometido a condiciones gastrointestinales.....	44

## Lista de Figuras

- Figura 2.1.** Diferentes morfologías de matrices obtenidas por microencapsulación: (a) microcápsula, (b) microesfera, (c) hidrogeles.....6
- Figura 2.2.** Esquematización de la liberación de un bioactivo a partir de una micropartícula hidrofílica, sensible al pH.....7
- Figura 4.1.** Imágenes obtenidas por MO. A = Hidrogel húmedo de pectina. B = Hidrogel húmedo de alginato. Barra MO = 100  $\mu\text{m}$ . Objetivo: 10x.....32
- Figura 4.2.** Imágenes obtenidas por MO de hidrogeles recubiertos con proteína. SB= Sangre bovina, CH= Clara de Huevo. Fila 1: Hidrogeles recubiertos con sangre bovina (A-pectina, B- alginato). Fila 2: Hidrogeles recubiertos con sangre bovina (C-pectina, D- alginato). Barra MO = 50  $\mu\text{m}$ . Objetivo= 40x.....38
- Figura 4.3.** A y B: Imágenes obtenidas por MO de hidrogeles de alginato y pectina sin tratamiento enzimático (tiempo 0). C y D, hidrogeles sometidas a simulación secuencial de jugo gástrico artificial (JGA). E y F, hidrogeles sometidas a simulación del jugo intestinal artificial (JIA). Barra MO = 100  $\mu\text{m}$ . Objetivo= 10x.....39
- Figura 4.4. A y B:** Imágenes obtenidas por MO de hidrogeles de pectina recubiertos con sangre bovina y clara de huevo. C y E, hidrogeles de pectina recubiertos con sangre bovina y huevo sometidas a simulación secuencial de jugo gástrico artificial (JGA). D y F, Hidrogeles de pectina recubiertas con sangre bovina y clara de huevo sometidas a simulación del jugo intestinal artificial (JIA). Barra MO = 100  $\mu\text{m}$ . Objetivo= 10x.....41
- Figura 4.5. A y B:** Imágenes obtenidas por MO de hidrogeles de alginato recubiertas con sangre bovina y clara de huevo. C y E, hidrogeles de alginato recubiertas con sangre bovina y huevo sometidas a simulación secuencial de jugo gástrico artificial (JGA). D y F, hidrogeles de alginato recubiertas con sangre bovina y clara de huevo sometidas a simulación del jugo intestinal artificial (JIA). Barra MO= 100  $\mu\text{m}$ .....42

## Lista de Abreviaturas

AS	Alginato de sodio.
CH	Clara de huevo.
EE	Eficiencia de encapsulación.
E <sub>ALG</sub>	Emulsión de alginato.
E <sub>PEC</sub>	Emulsión de pectina.
MO	Microscopia óptica.
CH	Proteínas de clara de huevo.
H <sub>ALG</sub>	Hidrogeles de alginato.
H <sub>PEC</sub>	Hidrogeles de pectina.
PC	Pectina cítrica.
pI	Punto isoeléctrico.
SB	Sangre bovina.
JGA	Jugo gástrico artificial.
JIA	Jugo intestinal artificial.
S <sub>ALG</sub>	Solución de alginato.
S <sub>PEC</sub>	Solución de pectina.

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**



## I. INTRODUCCIÓN

La microencapsulación es una tecnología utilizada para preservar y/o proteger componentes alimenticios sensibles de factores como, el calor, la humedad, el pH, etc., dentro de matrices poliméricas (micropartículas, microcápsulas, microesferas, hidrogeles, etc.) (Paulo y Santos, 2017). A su vez, una de las técnicas más utilizadas es la gelificación iónica debido al uso de polisacáridos atóxicos seguros para consumo humano. Sin embargo, esta técnica produce hidrogeles porosos, característica que limita la resistencia física de hidrogeles. Con la finalidad de disminuir la porosidad y mejorar las características de protección del hidrogel, ha sido propuesto en la literatura el recubrimiento por interacción electrostática con proteínas de carga opuesta para formar complejos electrostáticos (Patil *et al.*, 2010). El recubrimiento de hidrogeles con proteínas mediante interacción electrostática tiene importancia en diversas áreas como: biología, medicina, biotecnología y alimentos (Al-tahami y Singh, 2007).

Las proteínas de sangre bovina tienen propiedades funcionales deseables por la industria alimentaria, que incluyen capacidad de emulsificación, gelificación, retención de agua y colorante natural (Ofori y Hseih, 2011). La hemoglobina presente en la sangre bovina es fuente de hierro heme, con alta tasa de adsorción, constituyéndose en una excelente fuente de hierro para el suplemento nutricional (Walter *et al.*, 1993; Walker, 1998; Simões *et al.*, 1999). Así mismo, las proteínas de la clara de huevo poseen importantes proteínas funcionales con propiedades espumantes, gelificantes, entre otros, siendo de gran importancia para la industria alimenticia (Powrie y Nakai, 1986). La principal proteína de la clara de huevo: la ovoalbúmina, posee estructura globular con alto valor nutritivo y propiedades funcionales (Delben y Stefancich, 1998). Cabe destacar que, las fuentes proteicas mencionadas anteriormente aún no han sido utilizadas en su estado natural para el recubrimiento de hidrogeles.

Frente a lo expuesto, nuestra hipótesis de investigación fue que la capa proteica adsorbida en la superficie de hidrogeles podría mejorar su resistencia física para proteger efectivamente al principio activo durante el tránsito por el tracto gastrointestinal *in vitro*.

Por consiguiente, para probar la hipótesis formulada, hidrogeles de pectina y alginato fueron recubiertos con proteínas de sangre bovina y clara de huevo. Los hidrogeles con mayor porcentaje de proteína adsorbida (10%) fueron sometidos posteriormente a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. Cambios morfológicos en los hidrogeles y el desprendimiento (solubilidad) de la proteína adsorbida fueron utilizados para comparar la resistencia de los hidrogeles

El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de los hidrogeles producidos por gelificación iónica utilizando alginato y pectina frente al recubrimiento con proteínas de sangre bovina y clara de huevo. La resistencia de los hidrogeles con o sin recubrimiento proteico fue evaluada mediante la solubilidad de las proteínas adsorbidas y los cambios morfológicos ocurridos durante la simulación gastrointestinal *in vitro*.

# **CAPÍTULO II**

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Microencapsulación.

La tecnología de la microencapsulación busca proteger un principio activo en estado sólido, líquido o gaseoso dentro de una matriz resistente y estable. La estructura que se forma a partir del agente encapsulante alrededor del núcleo se denomina pared, la cual protege al activo frente a condiciones adversas y facilita su liberación controlada en ambientes específicos (Gibbs *et al.*, 1999; Young *et al.*, 1992; Madene *et al.*, 2006).

Actualmente, la microencapsulación es aplicada para preservar diversas variedades de ingredientes aplicados en la industria farmacéutica, biológica, cosmética, gráfica y de alimentos (Pszczola, 1998; Brazel, 1999; Gibbs *et al.*, 1999). En el área de alimentos es utilizado para proteger componentes sensibles, a condiciones adversas como calor, humedad, pH, permitiendo mantener la viabilidad del producto (Yañez *et al.*, 2002). Así mismo, promueven alta resistencia durante el procesamiento y empaquetamiento de productos alimenticios optimizando el sabor, aroma, valor nutritivo, y estabilidad de los productos (Montes *et al.*, 2007). Por otro lado, varios términos son utilizados para describir a las matrices encapsulantes, que incluyen: micropartículas, microesferas, microcápsulas, microperlas, hidrogeles, entre otros. Por lo que, el uso de la terminología adecuada para denominar la matriz obtenida va a depender de su dimensión (promedio de 0.5-1000 micrones de tamaño medio), estructura y aplicación (Campos *et al.*, 2013).

Las micropartículas presentan morfologías variadas, algunas poseen geometría esférica con una fase interna continua cubierta por una pared continua (partícula simple), en contraste a otras micropartículas que tienen geometría irregular con la fase interna dispersada en una matriz de material de pared (Shahidi y Han, 1993; Thies, 1996).

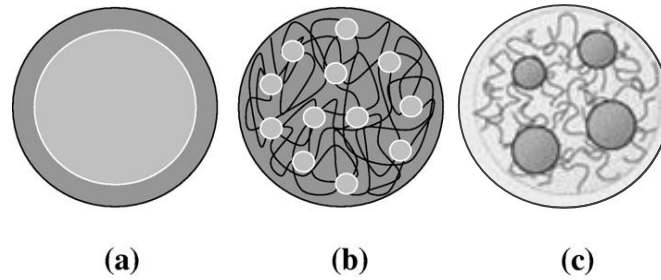


Figura 2.1. Diferentes morfologías de matrices obtenidas por microencapsulación: (a) microcápsula, (b) microesfera, (c) hidrogeles (Nesterenko *et al.*, 2013).

## 2.2. Hidrogeles.

Los hidrogeles responden al concepto de redes poliméricas, estos son estabilizados por entrecruzamientos físicos o químicos, a su vez, presentan gran capacidad de absorber agua o fluidos sin alterar su estructura tridimensional (Dragan, 2014). Sus estructuras porosas son altamente permeables y promueven el intercambio de oxígeno, nutrientes y metabolitos. Adicionalmente, son biocompatibles y presentan propiedades que se asemejan a tejidos biológicos, a causa de su alto contenido de humedad y a su textura suave y elástica (Lee y Mooney, 2012). Ante lo anteriormente expuesto, los hidrogeles representan una alternativa innovadora para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos y bioactivos (Hoare y Kohane, 2008; Lee *et al.*, 2013).

### 2.2.1. Aplicaciones de hidrogeles.

Las aplicaciones de los hidrogeles para la encapsulación, protección y liberación de compuestos bioactivos son diversas, teniendo como foco de mayor interés, aquellos que se producen a partir de biopolímeros de grado alimenticio (proteínas y / o polisacáridos) debido a que son adecuados para encapsular una variedad de agentes bioactivos para uso oral e ingestión (McClements, 2017).

Por otro lado, los nutraceuticos son moléculas bioactivas presentes en algunos alimentos que promueven la salud y el bienestar del ser humano (Espin *et al.*, 2007; Herrero *et al.*, 2006; Wildman y Kelley, 2007). Sin embargo, la eficacia de la mayoría de estos se encuentra limitada por sus características desfavorables de baja solubilidad, baja estabilidad química, y baja

biodisponibilidad (Huang *et al.*, 2010; McClements *et al.*, 2009; Velikov y Pelan, 2008). Una solución a este problema es la microencapsulación en hidrogeles, producidos a partir de proteínas y / o polisacáridos las cuales pueden mejorar la funcionabilidad de los nutraceuticos protegiéndolos de factores externos.

El revestimiento de hidrogeles con proteínas puede ser empleado cuando se desea que un activo sea liberado en áreas específicas del cuerpo humano. Un ejemplo de esto sería la liberación de bioactivos inestables en el ambiente del colón. Para que sea posible, se necesita de una matriz recubierta con proteínas que lo proteja de la degradación durante el tránsito por el estómago e intestino delgado, para que luego los liberen en el lugar del colón (Solanki *et al.*, 2013).

En la actualidad es de gran interés el desarrollo de hidrogeles sensibles a un estímulo, o “hidrogeles inteligentes”, estos al recibir un estímulo externo o interno (pH, temperatura, etc.), lo transmiten y procesan, produciendo un efecto utilizable. Y así, el diseño de nuevos sistemas con el empleo de estímulos internos (pH, temperatura) que predominen sobre los estímulos externos es de gran utilidad (George y Abraham, 2006).

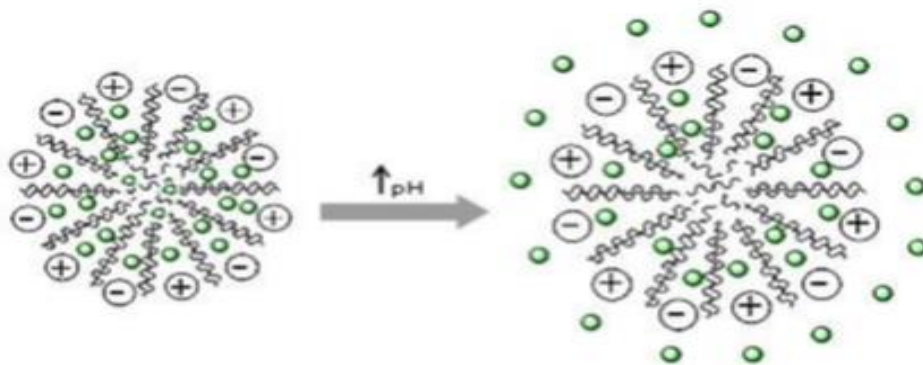


Figura 2.2. Esquematización de la liberación de un bioactivo a partir de un hidrogel hidrofílico, sensible al pH (Agüero, 2016).

### 2.2.2. Biopolímeros utilizados para producir hidrogeles

Biopolímeros tales como polisacáridos que incluyen alginatos y pectinas son utilizados como material encapsulante de bioactivos para su posterior liberación, debido a su disponibilidad, precio accesible y estructuras apropiadas. Así mismo, estas estructuras son modificables, estables, atóxicas, hidrofílicas,

biodegradables y formadoras de gel. Éstos incluyen polisacáridos de origen natural obtenidos de plantas (goma guar, inulina), algas (alginatos) o microbianos (dextranos), entre otros. Además, debido a que estos polisacáridos pueden ser descompuestos por la microflora del colon en monosacáridos simples, hacen que sean reconocidos como seguros para su consumo (Ashord *et al.*, 1993).

Sobre la base de las ideas expuestas, es justificable el uso de los ya mencionados biopolímeros para la producción de hidrogeles nutricionalmente eficientes con destino al consumo humano, debido a sus características inocuas y nutritivas que podrían ser beneficiosas para la población.

#### **2.2.2.1. Pectina.**

La pectina es un polisacárido aniónico que cuenta con una estructura lineal, formada por regiones lisas y peludas, cuenta con varias unidades de polímeros tales como ácido  $\alpha$  -(1→4)-D-galacturónico (Pérez *et al.*, 2000). Esta se encuentra generalmente en frutas cítricas, principalmente en el limón. De esta forma, la pectina se ha usado en la industria alimenticia (Willats *et al.*, 2006) y en la industria farmacéutica (Valenta, 2005). Este polisacárido forma matrices con alta capacidad de adsorción de agua (Guilherme, 2010).

#### **2.2.2.2. Alginato.**

Químicamente el alginato es un compuesto co-polimérico, con estructura lineal de alta masa molar con secciones rígidas y flexibles. Está conformado por dos tipos de ácidos urónicos: ácido  $\beta$ -D manurónico (M) y ácido  $\alpha$ -L gulurónico (G) sus bloques pueden ser homopoliméricos o heteropoliméricos (Cottrell y Kovacs, 1980; Draget y Taylor, 2011). Las unidades G pueden formar geles debido a su capacidad de interacción con iones divalentes (Ström *et al.*, 2009). Debido a esto, son capaces de formar geles estables, las cuales poseen mayor permeabilidad en comparación con alginatos que contienen altos niveles de unidades M (Martinsen, Skjåk-Bræk y Smidsrød, 1989). Las interacciones de los alginatos se desarrollan según el modelo "caja de huevos" (Grant *et al.*, 1973) y presentan valor de pKa entre 3.20 – 3.38 (Martinsen *et al.*, 1992).

Además, es un biopolímero biocompatible que posee ventajas sobre otros biopolímeros debido a su menor tasa de degradación, es hidrofílico y relativamente inerte (Rahman *et al.*, 2006).

### **2.2.2.3. Proteínas de clara de huevo.**

El huevo es uno de los productos alimenticios de consumo humano más ampliamente usados en todo el mundo, sin importar raza o religión (Stadelman y Cotterill, 2001). Se encuentra altamente disponible en la naturaleza, considerado como la mejor fuente de proteínas debido a su variada composición aminocídica. No obstante, su nivel de consumo ha ido decreciendo en los últimos tiempos, debido a que ciertas comunidades científicas han alarmado a la población sobre el alto contenido graso y de colesterol que posee. No obstante, es bien sabido el huevo aporta beneficios nutricionales únicos que involucran el aporte de aminoácidos esenciales, ácidos grasos y algunos minerales y vitaminas indispensables en la alimentación cotidiana (Carbajal, 2006).

Los huevos presentan tres constituyentes principales: cáscara (9 - 12%), clara (60%) y yema (30-33%) (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005). Las proteínas del huevo se distribuyen entre la clara y la yema, mientras que los lípidos se concentran principalmente en la yema (Stadelman y Cotterill, 2001).

La clara de huevo contiene 9.7-10.6% de proteína, de las cuales se han identificado y aislado más de 24 diferentes tipos de proteína (Mine, Shahidi, 2006). La principal proteína es la ovoalbúmina (54%), conalbúmina (12%), ovomucóide (11%), ovomucina (3.5%), y lisozima (3.4%) (Mine, 1995). Cada una de estas proteínas tiene gran potencial para su uso en la industria alimentaria y farmacéutica, ya sea en su estado natural o como aislados proteicos, debido a sus múltiples propiedades, es una área emergente de investigación con diversas aplicaciones. Por ejemplo, la ovotransferrina se emplea como transportador de metales, agente antimicrobiano y anticancerígeno, en cambio la lisozima se usa principalmente como conservante de alimentos. Por su parte, la ovoalbúmina se usa ampliamente como suplemento nutricional y la ovomucina como un agente de supresión tumoral. Así también, a pesar de que el ovomucóide sea el principal alérgeno del huevo, puede inhibir el crecimiento de tumores y, de esta forma, puede usarse como un agente anticancerígeno (Abheyathne *et al.*, 2013).



#### **2.2.2.4. Proteínas de sangre bovina**

Hoy en día la sangre resultante del beneficio del ganado vacuno es descartada en el medio ambiente, contribuyendo a la contaminación ambiental. Aunque, si bien es cierto en países de mayor industrialización, la sangre es tratada antes de ser descartada en el ambiente, lo cual requiere mayores gastos. Por lo que, con la finalidad de minimizar la pérdida de este subproducto y mitigar su impacto en el ambiente se han desarrollado estrategias que implican la utilización de la sangre bovina a gran escala, generando productos con valor agregado destinados a la alimentación humana y animal (Hseih y Ofori, 2011).

El contenido de la sangre bovina consta de 80.9% de agua, 17.3% de proteína, 0.23% de lípidos, 0.07% de carbohidratos y 0.62% de minerales (Duarte *et al.*, 1999). Además, las proteínas de la sangre poseen propiedades funcionales deseables, que incluyen capacidad de emulsificación, gelificación y retención de agua. A causa de esto, la sangre bovina es usada en la industria alimentaria, como agente gelificante y colorante natural. Cabe destacar que la hemoglobina, que se encuentra constituyendo los glóbulos rojos, representa alrededor del 50% del total de las proteínas presentes (Liu *et al.*, 1996; Hseih y Ofori, 2011). El contenido de hierro heme de la sangre es de alta absorción, resultando un recurso útil para combatir la anemia ferropénica (Walter *et al.*, 1993; Hseih y Ofori, 2011).

Además, del alto contenido de hierro, la sangre también contiene proteínas esenciales, que pueden ser empleadas para mejorar el contenido nutricional de alimentos (Nogueira, 1992). Para tal fin, la obtención de sangre debe ser realizada en aislamiento de cada animal, en recipientes separados, teniendo en cuenta las buenas prácticas de higiene en el proceso de recolección y pre-tratamiento del subproducto (Ribeiro *et al.*, 2006).

#### **2.2.3. Producción de hidrogeles.**

Diferentes métodos son utilizados para la producción de hidrogeles, cada uno con diferentes propiedades, cuyos productos finales incluyen hidrogeles solubles e insolubles en agua, en ellos se producen estructuras deseables para la industria alimentaria, farmacéutica, química, cosmética, entre otros (Kruif, Weinbreck y Vries, 2004). Generalmente, podemos dividir los métodos en tres

grupos: 1) **métodos fisicoquímicos**: coacervación simple o compleja (separación de la fase acuosa), evaporación de disolvente de emulsión (consiste en la evaporación de la fase orgánica), en emulsión, solidificación, envolvimiento liposomal y gelificación iónica; 2) **métodos físicos**: spray drying (secado por aspersion), spray coating (revestimiento por aspersion), spray chilling, lecho fluidizado extrusión, centrifugación con múltiples orificios, co-cristalización, liofilización; 3) **métodos químicos**: polimerización interfacial, inclusión molecular (Jackson y Lee, 1991; Dziezak, 1988; Ré, 1998; Gibbs *et al.*, 1999).

#### **2.2.3.1. Gelificación iónica.**

La técnica de la gelificación iónica nos brinda un ambiente de trabajo con condiciones suaves, siendo un proceso de bajo costo y sencillo. Este proceso, se basa en la interacción de las moléculas presentes en solución acuosa de biopolímero que entra en contacto con algún ion de bajo peso molecular con el objetivo de formar un complejo (hidrogel). Los polisacáridos más empleados como material de pared, son pectina cítrica y alginato de sodio, entre otros (Mestdagh y Axelos, 1998). Posteriormente, en el proceso de endurecimiento del hidrogel los iones se continúan difundiendo en el polisacárido lo que produce que el gel se vaya endureciendo con el tiempo. Es importante mencionar que la dureza del gel es manipulable, modificando las condiciones de pH, concentración de iones, concentración de polisacárido, etc. (King, 1988).

#### **2.2.3.2. Interacción electrostática.**

Los hidrogeles obtenidos por gelificación iónica presentan alta porosidad y elevado índice de difusión, lo cual puede acelerar la liberación del bioactivo encapsulado (Sezer y Akbuga, 1999). Por esta razón, ha sido propuesta la formación de complejos estables de polisacáridos con proteínas, basada principalmente en la interacción electrostática entre dos biopolímeros con carga opuesta, resultando en la formación de un complejo sobre la superficie del hidrogel (Thu *et al.*, 1996).

Las proteínas adquieren carga positiva en un valor de pH debajo de su punto isoeléctrico, facilitando la interacción con grupos carboxílicos disponibles

cargados negativamente en la superficie de hidrogeles gelificados, y consecuentemente formando complejos estables sobre el hidrogel (Ye, 2008).

Los complejos electrostáticos pueden ser afectados por pH, fuerza iónica, temperatura y la concentración de la solución (Jones y McClements, 2010).

#### **2.2.3.2.1. Punto isoelectrico (pI).**

El punto isoelectrico es una propiedad de las proteínas, en la cual corresponde al valor del pH donde el número de sus cargas positivas y negativas de la proteína están en equilibrio, dando como resultado una molécula de carga neta neutra. Entonces, en condiciones de pH bajo ( $\text{pH} < \text{pI}$ ) las proteínas se cargan positivamente, mientras que en condiciones de pH alto ( $\text{pH} > \text{pI}$ ) las proteínas adquieren carga negativa (Bremer *et al.*, 2004).

#### **2.2.3.2.2. Constante de disociación ácida (Pka).**

El pKa es el logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil, se refiere a la fuerza que tienen las moléculas al disociarse.

Por lo que, un ácido es más fuerte cuanto menor es su pKa y en una base ocurre lo contrario (Harris, 2001).

Cuando se tiene un valor de pH superior al valor del pKa de un polímero, este se vuelve sin carga, pudiendo liberar sustancialmente agentes terapéuticos o bioactivos (Al-tahami y Singh, 2007). Bae *et al.* (2001) describieron polímeros sensibles al pH que contienen grupos sulfonamida, éstos muestran variaciones en la capacidad de hinchamiento y solubilidad en función del pH. El polímero sensible al pH puede formar un hidrogel.

#### **2.2.3.3. Coacervación compleja.**

La coacervación compleja es un suceso espontáneo que se da lugar a través de la interacción electrostática entre dos polímeros cargados opuestamente solubles en un sistema acuoso, la consecuente neutralización de las cargas conlleva a una separación espontánea de fases (una fase rica en polímeros y una fase pobre en polímeros) (Kruif, Weinbreck y de Vries, 2004; Liu *et al.*, 2015; Schmitt *et al.*, 1998). Este suceso es influenciado por factores que

incluyen el pH, la concentración de los polímeros, la fuerza iónica y la temperatura, las cuales conducen a la formación de coacervados complejos que precipitan (Eghbal y Choudhary, 2017).

Actualmente la coacervación compleja es una de las técnicas de microencapsulación que ha ganado gran interés en la industria debido a su alta capacidad para encapsular nutraceuticos, puesto que funciona a bajas temperaturas, lo que reduce la pérdida por evaporación de compuestos volátiles, y además tiene gran relevancia en el tema liberación controlada de nutraceuticos (Taneja, Amit y Singh, 2012). A su vez, este proceso es apropiado para encapsular sustancias hidrofóbicas, como por ejemplo el aceite de semilla de chía (Timilsena *et al.*, 2016), aceite de palma y  $\beta$ -Caroteno (Rutz *et al.*, 2016), vitamina E (Alencastre, 2006), licopeno (Silva *et al.*, 2012).

### **2.3. Adsorción de proteínas.**

La adsorción de una molécula de proteína comprende su transferencia de una fase en solución a una superficie sólida adyacente, la acumulación de estas moléculas en la interface resultante ocurre debido a fuerzas de interacción entre la molécula de proteína y la superficie del sólido (Khetreddin, Zhang y Akbulut, 2013). A su vez, la adsorción consta de los siguientes cuatro pasos: (a) difusión masiva, (b) adsorción, (c) despliegue de proteínas, y (d) difusión lateral y reordenamientos proteína-proteína (Tripp, Magda y Andrade, 1995).

Parámetros como concentración de proteína, pH, fuerza iónica y temperatura, promueven las interacciones electrostáticas en el proceso de adsorción (Mahdavinia y Etemadi, 2016). Otro aspecto importante es la fuerza motriz, puesto que afectará, la cantidad adsorbida, la estructura de la capa adsorbida y la cinética de adsorción. En comparación, con los homopolímeros más simples (no cargados), la fuerza motriz para la adsorción de proteínas es generalmente más compleja (Zhang y Dalgleish, 2004).

Las repulsiones electrostáticas proteína-proteína disminuyen cuando están en el punto isoeléctrico permitiendo densidades de carga más altas en la superficie. En consecuencia, los rangos de adsorción son altos cuando la proteína y el sustrato soportan cargas opuestas, ya que las atracciones

electrostáticas aceleran la migración. Sin embargo, generalmente se observa una carga máxima total de adsorción en el punto isoeléctrico (Demanèche *et al.*, 2009; Höök *et al.*, 1998).

Cuando la proteína se desdobra expone a otras moléculas sus grupos hidrofóbicos, la formación de enlaces proteína-proteína es frecuente en proteínas de estructura globular (Pugnali *et al.*, 2004). Proteínas de sangre bovina y proteínas de clara de huevo poseen estructura globular, capaces de formar enlaces químicos y físicos con otras moléculas de proteína. Cuando se adsorbe proteína de soluciones conteniendo alta concentración, la interacción proteína-proteína es posible. La posible explicación de la formación de multicapas proteicas, es que la segunda capa se enlaza en el lado superior o por debajo de la capa original. También es posible que la segunda capa proteica se adsorba en espacios vacíos ocasionados por la primera capa proteica sobre superficie o que también es posible de alterar la estructura de la primera capa que fue adsorbida, permitiendo adsorción adicional (Dalglish *et al.*, 1991).

Por otro lado, las superficies de los hidrogeles producidas por gelificación iónica con iones de calcio presentan alta porosidad, y estos podrían no ser capaces de proteger el bioactivo en su totalidad frente a condiciones adversas (Allan-Wojtas *et al.*, 2008; Smidsrod, 1974). Para confrontar este problema, la literatura propone el recubriendo de los hidrogeles como una capa proteica (Wu *et al.*, 2013).

#### **2.4. Solubilidad de proteínas.**

La solubilidad de la proteína se expresa comúnmente como solubilidad del nitrógeno en agua, índice de solubilidad en nitrógeno, proteína soluble en agua o índice de dispersabilidad de proteínas (Wolf y Cowan, 1975). Se refiere a la capacidad de una proteína para disolverse y formar una solución homogénea del soluto en el solvente. La solubilidad se ve muy afectada por los cambios de pH y, por lo general, es la propiedad funcional más afectada debido al procesamiento, lo que repercute en otras funcionalidades (Tybor *et al.*, 1973).

Como el pH varía entre los productos alimenticios, la solubilidad de las proteínas es un prerrequisito e indicador importante para la funcionalidad de la

proteína (Etheridge *et al.*, 1981). Al trazarse la solubilidad de la proteína contra el pH, se obtiene un gráfico en forma de U; donde la menor solubilidad corresponde al punto isoeléctrico (pI).

## **2.5. Hidrogeles recubiertos sometidos a condiciones gastrointestinales simuladas.**

Es deseable de mejorar la estabilidad y la calidad de alimentos funcionales, donde las vías de reacción química y los procesos enzimáticos son consideraciones críticas, utilizando técnicas de microencapsulación. En este sentido, las propiedades fisicoquímicas de los polímeros utilizados como matriz para la encapsulación de compuestos bioactivos expuestos a condiciones gastrointestinales simuladas son de gran interés (Chan, 2011; Wichchukit, *et al.*, 2013).

Los esquemas de digestión *in vitro* son ampliamente utilizados para estudiar cambios estructurales, digestibilidad y liberación de componentes de alimentos expuestos a condiciones gastrointestinales simuladas. Las moléculas biológicas con mayor utilización en modelos de digestión son enzimas digestivas (pancreatina, pepsina, tripsina, quimotripsina, pepsina,  $\alpha$ -amilasa y lipasa), sales biliares y mucina. Teniéndose como temperatura promedio de digestión 37°C. (Hur *et al.*, 2011).

Perez-Moral *et al.* (2013) investigó los cambios de pH, fuerza iónica, actividad enzimática, condiciones de mezclado y temperatura de las micropartículas en condiciones gastrointestinales *in vitro*. Estudios anteriores realizados muestran la resistencia de hidrogeles de alginato a condiciones gástricas, hecho contrario sucede cuando son expuestos a condiciones intestinales. Lo cual, habilita la liberación específica para la liberación controlada de fármacos (Rayment *et al.*, 2009). Y así, entre los diferentes materiales de encapsulación, micropartículas de alginato, han reportado promover la estabilidad del bioactivo contra las condiciones gástricas (Brownlee *et al.*, 2009; Rayment *et al.*, 2009). Por lo que, la liberación de compuestos bioactivos por parte de micropartículas de alginato obedece a procesos de difusión o dilución de ellas, o ambas (Kuang *et al.*, 2010). En el intestino humano agentes quelantes como el lactato, citrato, fosfatos, y otros cationes son importantes para

la desestabilización de los enlaces cruzados que forman el hidrogel de alginato mediante la eliminación de los iones de calcio (Coppi *et al.*, 2001). A su vez, los estudios *in vitro* mostraron que los alginatos retardan las acciones de una gama de enzimas digestivas por limitación de la disponibilidad de la enzima a los sustratos (Brownlee *et al.*, 2009; Andresen *et al.*, 1977).

Cabe mencionar que el tamaño de los poros del hidrogel es un factor importante ante su resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas. Buddington *et al.* (2009) determinaron que aquellos hidrogeles con menor tamaño de poros, permanecen intactos en condiciones intestinales por más tiempo, en comparación a los hidrogeles con poros más grandes. A causa de esto, es importante el recubrimiento proteico sobre estas partículas porosas, de este modo, las partículas serían capaces de llegar en condiciones adecuadas hasta el colon para ser degradadas por la microflora y así puedan liberarse controladamente el bioactivo. Esto es posible debido a que, la microflora del colon se alimenta de varios tipos de sustratos que no fueron digeridos en el intestino delgado (Rubinstein, 1990; Cummings y Englyst, 1987). Con el propósito de realizar dicha fermentación, la microflora produce un gran número de enzimas (Scheline, 1973). Debido a la presencia de estas enzimas biodegradables en el colon, el uso de polímeros biodegradables para la administración controlada de fármacos específicos parece ser la mejor opción. (Basit y Bloor, 2003). Estos polímeros protegen al fármaco del ambiente del estómago y del intestino delgado, y tienen la capacidad de liberar el fármaco en el colon. Al llegar al colon, se someten al aprovechamiento por microorganismos, a la degradación por enzimas o a la descomposición de la parte posterior del polímero, lo que conlleva a una reducción de su peso molecular y, por lo tanto, pérdida de resistencia física (Cummings y Englyst, 1987). De esta manera, ya no pueden contener la sustancia bioactiva por más tiempo, ocasionando su liberación (Kamath y Park, 1993).

# **CAPITULO III**

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

Los análisis y ensayos experimentales fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio de Investigación de Control de Calidad del CIRNA – UNAP, ubicado en el distrito de San Juan, provincia de Maynas, departamento de Loreto.

#### **3.1 Material.**

Los materiales utilizados incluyen pectina cítrica (PC) GENU® de baja masa molar y bajo contenido de metoxilación amidada, lote SK33139, CP Kelco, Limeira, SP, Brasil), alginato de sodio (AS) de alta masa molar y alto contenido de ácido gulurónico (lote GQB0303301, Manugel DMB, FCM Biopolymer, Campinas, SP, Brasil). Para interacción electrostática se utilizó sangre bovina (SB) (camal municipal de Punchana, Iquitos, Perú), clara de huevo (CH) (mercado central, Iquitos, Perú), aceite de sachá inchi como material de relleno, cloruro de calcio anhidro (lote: K47498778, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), ácido clorhídrico (lote: K476888817611, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), ácido sulfúrico (lote: K4746131545, 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), enzima pepsina de mucosa gástrica de cerdos adquirido de Sigma-Aldrich (código: P7000-25G, lote SLBR2349V, actividad declarada >250 unidades/mg sólido, enzima pancreatina de páncreas de cerdos adquirido de Sigma-Aldrich (código: P7545-25G, lote SLBP9482V, actividad 8 x USP especificaciones). El agua destilada y los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

### 3.2 Equipos.

- **Agitador magnético** (VELP CIENTIFICA, MOD. ARE, CODIGO: F20500162, ITALIA).  
Descripción: Construida en aleación de aluminio y revestida con una protección espacial. Velocidad: de 50 hasta 1500 rpm, temperatura: 370 °C, Potencia: 630 W, Voltaje: 115 V o 230 V / 50 -60 Hz, Peso: 2,6 kg.
- **Potenciómetro** (IWAKUCE, MOD. CODIGO: F0042163, USA).  
Descripción: Basada en medidor de pH/temperatura microprocesador con autonomía extendida (-2.00-16.00 pH), compensación automática de temperatura, calibración automática en 2 puntos y  $\pm$  exactitud de 0.02 pH. El medidor se suministra con soluciones de electrodos de pH y de calibración.
- **Homogenizador Ultra Turrax** (IKA-WERKE, MOD. T25 DIGITAL, CODIGO: 03289027, GERMANY).
- **Balanza Analítica** (OHUAS, MOD. AX324, CODIGO: B734566620, USA).  
Condiciones: controles de ajuste para el medio ambiente: tres filtros y seguimiento de cero. Capacidad: 210 g, sensibilidad: 0.1 mg, calibración: Digital externa, peso neto: 4.5 Kg
- **Vortex (Mini Shake)** (IKA, MOD. MSI Mini Shaker CODIGO: 05-011148, GERMANY).
- **Destilador de Nitrógeno** (GESSELLSEHA, MOD. GLF, CODIGO: 11993916, GERMANY)
- **Mufla** (THEME LINE, MOD.FB1510M, CODIGO: 125080905881, USA)
- **Centrifuga** (HETTICH MOD. 320R, CODIGO: 0004500-02, HOLANDA)
- **Microscopio Óptico** (ZEISS, MOD. CARL ZEISS, CODIGO: 3150001630, GERMANY).
- **Estufa** (MM, MOD. LSIS- B2V/CC111, CODIGO: D122341, GERMANY).
- **Baño María** (MARCONI, MOD. MA184, CODIGO: 91510539, ITALY).
- **Congelador** (COLDEX, MOD. CH10P, CODIGO: 01610791102, PERÚ).
- **Refrigeradora (Respirómetro de aluminio)** (Marca MONTERO, MOD. ND, CODIGO: ND).
- **Tamiz** (MOD. TEST SIEVE, CODIGO: 7061974).

### **3.3 Métodos.**

#### **3.3.1. Caracterización de los biopolímeros.**

Los biopolímeros como sangre bovina (SB), clara de huevo (CH), pectina (PC), alginato (AS), para la producción de hidrogeles fueron caracterizados previo a su utilización.

##### **3.3.1.1. Determinación de humedad.**

La humedad de los materiales fue determinada de acuerdo a la metodología de la AOAC (2012), según el método 952.08. Se pesó alrededor de 5 g de muestra en placas Petri y se llevó a la estufa a 105 °C por seis horas. Posteriormente, se retiraron las placas Petri de la estufa y se enfriaron en desecador antes de anotar el peso final. Se reportó la pérdida de peso como humedad.

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{Peso placa+muestra húmeda} - \text{Peso placa+muestra seca}}{\text{Peso muestra húmeda}} \times 100$$

##### **3.3.1.2. Determinación de proteína.**

El contenido de proteína de los biopolímeros fue determinado según la metodología Kjeldahl 955.04 (AOAC, 2012), utilizando 6.25 y 6.68 para sangre bovina y clara de huevo respectivamente, como factor de conversión de nitrógeno para proteína.

##### **3.3.1.3. Determinación de lípidos.**

El contenido de lípidos fue determinado de acuerdo con la metodología de Bligh y Dyer (1959).

##### **3.3.1.4. Determinación de ceniza.**

La determinación de la ceniza se realizó según la metodología 938.08 de la AOAC (2012). Fueron pesados 5 g de muestra y depositados en crisoles de porcelana previamente tarados para posterior incineración en mufla a temperatura de 550°C durante seis (6) horas. Pasado el periodo de tiempo, los crisoles fueron transferidos a la campana de desecación para enfriamiento, y luego ser pesados para realización de los cálculos.

Los resultados fueron expresados de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ceniza} = \frac{\text{Peso crisol con residuo (g)} - \text{Peso crisol vacío (g)}}{\text{Peso muestra húmeda (g)}} \times 100$$

### **3.3.2. Producción de hidrogeles.**

Los hidrogeles fueron producidos por gelificación iónica, previamente las emulsiones fueron preparadas con soluciones de alginato (2.0% m/m) y pectina (2.5% m/m), conteniendo aceite de sachá inchi (1.5% m/m, 1.75% m/m, para alginato y pectina, respectivamente), a temperatura ambiente utilizando homogeneizador Ultra Turrax a 18000 rpm durante 5 minutos (IKA-WERKE, T 25 DIGITAL). La emulsión fue atomizada sobre una solución de cloruro de calcio (2.0% m/m y 2.5% m/m para alginato y pectina, respectivamente) con pH ajustado para 4.0 utilizando un atomizador de doble fluido con orificio de 1.0 mm de diámetro, variando la altura de 12 cm entre el atomizador y la solución de cloruro de calcio, presión de aire de 0.250 kgf/cm<sup>2</sup> y velocidad de atomización de 555 mL/hora. Después la atomización, los hidrogeles permanecieron en agitación constante por 30 minutos a temperatura ambiente. Para el endurecimiento y lavados en tamiz de malla de acero ( $\Phi$  75 $\mu$ m) con agua destilada con pH modificado a 4.0. Finalmente, fueron realizadas tres producciones independientes de hidrogeles por tratamiento.

### **3.3.3. Caracterización de los hidrogeles producidos por gelificación iónica.**

Los hidrogeles fueron caracterizados por triplicado con relación al contenido de humedad, ceniza, lípidos de acuerdo con la metodología de la AOAC (2012). A su vez, también fue determinada la eficiencia de encapsulación, y evaluada la morfología de los hidrogeles sin recubrimiento proteico.

#### **3.3.3.1. Análisis de humedad**

Ídem ítem 3.3.1.1.

#### **3.3.3.2. Análisis de cenizas**

Ídem ítem 3.3.1.4.

#### **3.3.3.3. Lípidos**

Ídem Ítem 3.3.1.3.

#### **3.3.3.4. Eficiencia de encapsulación**

Para la determinación del aceite total contenido en los hidrogeles fue realizado de acuerdo con la siguiente metodología: Se añadió una solución acuosa de citrato de sodio en la concentración de 3% (m / m) a 5 g de hidrogeles húmedos, para la liberar el aceite. Después de esa etapa, la

cuantificación del aceite fue hecha según la metodología de Bligh y Dyer (1959). La eficiencia de encapsulación fue determinada por la siguiente relación:

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

#### **3.3.3.5. Morfología y determinación de tamaño medio.**

La observación de la morfología y determinación del tamaño medio de los hidrogeles húmedos 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 300 hidrogeles de cada muestra fueron medidas y procesadas con auxilio del programa Microcal Origin pro 9.1 (Microcal Software, Inc., MA, USA).

#### **3.3.4. Recubrimiento de los hidrogeles con proteínas de sangre bovina y clara de huevo.**

El recubrimiento de los hidrogeles húmedos obtenidos en el ítem 3.3.2, fueron realizados adicionándose 40 g de hidrogeles húmedos en 200 mL de solución acuosa de proteína (sangre bovina o clara de huevo) ajustado a pH 4.0. Fueron utilizadas concentraciones de 2, 4, 8 y 10% (m/m) para las soluciones proteicas. Los hidrogeles se mantuvieron en soluciones proteicas durante 30 minutos, bajo agitación constante (400 rpm) a temperatura ambiente. Los hidrogeles recubiertos fueron lavados en tamices de mallas de acero ( $\Phi$  75  $\mu$ m) con agua destilada (pH 4.0) para remover la proteína que no fue adsorbida. Fueron realizadas tres producciones independientes para cada tipo de hidrogeles. Los hidrogeles fueron analizados en triplicado en relación a su contenido de humedad, ceniza, proteína, lípidos.

#### **3.3.5. Caracterización de los hidrogeles recubiertos con proteínas de sangre bovina y clara de huevo.**

Los hidrogeles fueron caracterizados por triplicado en relación al contenido de proteína total, humedad y ceniza de acuerdo a la metodología de la (AOAC., 2012) y lípidos según (Bligh y Dyer, 1959).

### 3.3.5.1. Determinación de adsorción de proteínas.

El contenido de proteína adsorbida en hidrogeles recubiertos con sangre bovina y clara de huevo fue determinado según la metodología Kjeldahl (AOAC, 2012), utilizando 6.25 y 6.68 para sangre bovina y clara de huevo respectivamente, como factor de conversión de nitrógeno para proteína.

Para el proceso de digestión fueron pesados 0.25 g de muestra y colocados en balón de digestión, para luego adicionar 7 mL de ácido sulfúrico concentrado, 0.125g de sulfato de cobre y 2.5g de sulfato de sodio. Seguidamente, el balón fue colocado en el digestor hasta que el color de la mezcla en el balón adquiriera una coloración azul verdosa transparente. Posteriormente, el balón se dejó enfriar a temperatura ambiente, donde luego fue añadido 70 mL de agua destilada e hidróxido de sodio al 33% para alcalinizar. En seguida, el balón fue colocado en el destilador para liberación del amoníaco, el cual fue recogido en un matraz conteniendo 7 mL de ácido bórico y gotas de azul de metileno como indicador. Después de haber destilado 50 mL de líquido, fue titulado con solución de ácido sulfúrico 0.025 N. La cantidad de proteína fue calculada utilizando factor de conversión del nitrógeno, en el cual el porcentaje de nitrógeno será calculado con la siguiente fórmula:

$$\% N_2 = \frac{V \times N \times \text{Factor} N_2}{PM} \times 100$$

Donde:

- V = Gasto de titulación ácido sulfúrico.
- N = Normalidad del ácido sulfúrico.
- PM = peso de la muestra
- Factor  $N_2 = 0.014$

El porcentaje de proteína se obtendrá de la siguiente manera:

$$\% \text{ Proteína} = \% N_2 \times \text{Factor de proteína}$$

### 3.3.5.2. Análisis de humedad.

Ídem ítem 3.3.1.1.

### 3.3.5.3. Análisis de cenizas.

Ídem ítem 3.3.1.4.

#### **3.3.5.4. Análisis de lípidos.**

Ídem ítem 3.3.1.3.

#### **3.3.5.5. Morfología y determinación del tamaño medio.**

Ídem ítem 3.3.3.5.

#### **3.3.6. Simulación del sistema gastrointestinal *in vitro*.**

Los hidrogeles de alginato y pectina recubiertos con la mayor concentración de proteína en solución (10%) 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 los hidrogeles.

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 los hidrogeles, 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.

### **3.3.7. Análisis de los datos.**

Los datos obtenidos en la producción de hidrogeles con recubrimiento proteico fueron analizados por el diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial de  $2 \times 2 \times 3$  donde las variables de estudio fueron: tipo de polisacárido, tipo de proteína, y concentración de proteína. Cada uno de ellos con tres repeticiones, por lo que, fueron realizados un total de 36 tratamientos. Teniendo como variables respuestas, la adsorción de proteína, contenido de humedad, tamaño medio, contenido de cenizas. Para la simulación gastrointestinal fueron analizados por el diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial de  $2 \times 2$ , donde las variables de estudio fueron tipo de polisacárido y tipo de proteína. Cada uno de con seis repeticiones, haciendo un total de 24 repeticiones. Teniendo como variable respuesta a la solubilidad proteica y resistencia física de los hidrogeles ante condiciones gastrointestinales simuladas.



# **CAPÍTULO IV**

## **RESULTADOS Y**

### **DISCUSIÓN**

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización de los biopolímeros.

Los resultados de la caracterización de los biopolímeros utilizados en este estudio son mostrados en la Tabla 4.1. Destacamos principalmente el alto contenido proteico de la sangre bovina (17.80%) y la clara de huevo (10.80%) en estado natural. De modo similiar, Lynch *et al.* (2017), reportaron cantidades proximas de proteínas presentes en sangre bovina, estas proteínas tienen gran potencial para ser utilizadas como fuente proteica de alta calidad para el consumo tanto humano como animal. En la investigación de Tarte (2011), indicó que las propiedades técnicas y funcionales de la sangre bovina pueden ser debido al efecto combinado de tres tipos de proteínas: albúmina sérica, globulinas y fibrinógeno. A su vez, menciona que la sangre entera y sus proteínas celulares están limitadas para su uso como ingredientes alimenticios debido al sabor intenso y el color que transmiten al producto final. No obstante, Walter *et al.* (1993), reportaron que la sangre bovina es una fuente de hierro de alta disponibilidad, por lo cual es necesario que se desarrollen nuevas aplicaciones, para que su consumo tenga alta aceptabilidad.

Tabla 4.1. Caracterización de biopolímeros

Biopolímeros	Composición centesimal (%)				
	Humedad	Proteína	Lípidos	Carbohidratos (*)	Cenizas
PC	13.72 ± 0.17	1.08 ± 0.07	-----	-----	2.96 ± 0.04
AS	12.25 ± 0.13	-----	-----	-----	4.92 ± 0.28
CH	87.63 ± 0.99	10.80 ± 0.17	0.18 ± 0.02	0.78 ± 0.11	0.61 ± 0.02
SB	80.69 ± 1.02	17.80 ± 0.44	0.38 ± 0.03	0.11 ± 0.01	1.02 ± 0.10

Promedio ± desvío estadístico (n=3). (\*) Por diferencia. PC= Pectina cítrica; AS= Alginato de sodio; SB= Sangre Bovina; CH= Clara de Huevo. Las líneas indican que no se determinaron los valores.

De la misma manera, la clara de huevo constituye una fuente de proteínas funcionalmente importantes y en la actualidad, es usada como fuente proteica por la industria de alimentos. Powrie y Nakai (1986), mencionan las propiedades de la clara de huevo que incluyen formación de espuma, estabilizante, emulsificante, gelificante, fijación del calor y facilitan la adhesión de enlaces. Debido a tales propiedades, estas proteínas son ingredientes idóneos de muchos

alimentos, como productos de panadería, merengues, productos cárnicos y galletas. Diferentes investigaciones sobre las características fisicoquímicas de estas proteínas han contribuido al entendimiento entre la relación de su estructura con sus propiedades funcionales para el beneficio de la industria alimenticia. Se ha reportado anteriormente que, la ovoalbúmina (principal proteína de la clara de huevo) también puede ser usada como un material encapsulante en la liberación de fármacos, debido a su accesibilidad y bajo precio cuando comparado con otras fuentes proteicas (Wongsasulak *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que, el contenido de cenizas para sangre bovina y clara de huevo fue de 1.02% y 0.61%, respectivamente, resultado que evidencia altos contenidos de materia inorgánica que están íntimamente relacionados al hierro (SB) (Lynch *et al.*, 2017) y potasio (CH) (Sayar, 1988). Diferentes estudios indicaron que la sangre bovina es una fuente suplementaria de hierro principalmente debido a su alta biodisponibilidad (Walter *et al.*, 1993; Viteri *et al.*, 1995; Hurrell *et al.*, 1991).

El contenido de nitrógeno no proteico de la pectina fue considerado en la caracterización de las micropartículas, siendo descontado en el cálculo de la cantidad de proteína presente en la micropartícula producida.

#### **4.2. Producción de hidrogeles por gelificación iónica.**

Los hidrogeles de pectina fueron obtenidos por gelificación iónica, preliminarmente fueron consideradas estequiometrías de pectina (1.75%, 2.0% m/m) como material encapsulante y cloruro de calcio (2.0% m/v) como agente reticulante. Nuestros primeros resultados produjeron hidrogeles con estructura visiblemente frágil, éstos al ser observados por microscopía óptica mostraron formas irregulares. Por lo que, para confrontar este problema fue necesario utilizar mayor concentración (2.5% m/m) produciendo hidrogeles más resistentes. A su vez, se incrementó la concentración del material de relleno (aceite) de 1.5% a 1.75% (m/m) con el objetivo de no alterar la proporcionalidad de la emulsión. Una vez establecida la concentración de pectina y la cantidad material de relleno, fue variada la concentración de cloruro de calcio con el fin de seguir optimizando la estructura de los hidrogeles de pectina, para ello se realizó las siguientes pruebas: Prueba 1 (Pectina al 2.5% m/m con CaCl<sub>2</sub> al 2% m/m) y Prueba 2 (Pectina al 2.5% m/m con CaCl<sub>2</sub> al 2.5% m/m). La prueba con

los mejores resultados (prueba 2) mostró mejor apariencia, con estructuras más estables y visualmente con mejor aspecto, el cual fue optado como concentración para el desarrollo del estudio.

Por otro lado, los hidrogeles de alginato fueron obtenidos siguiendo la estequiometría reportada por Tello *et al.* (2015), utilizando solución de alginato al 2% m/m de concentración. Los resultados mostraron estructuras firmes y compactas, no viéndose en necesidad de modificar ninguna de las concentraciones propuestas. La diferencia entre las concentraciones usadas en pectina y alginato puede ser debido, a la débil interacción entre las cargas negativas de la pectina con los cationes de la solución de cloruro de calcio (Grant, 1973).

Los polisacáridos aniónicos que incluyen alginato (Leong *et al.*, 2016) y pectina (Abouelatta *et al.*, 2015), utilizados en este estudio fueron adecuados para producir hidrogeles por gelificación iónica conteniendo aceite de sacha inchi.

#### 4.3. Caracterización de los hidrogeles.

Fue realizado la caracterización de hidrogeles producidos por gelificación iónica, con el objetivo de obtener la composición centesimal de los hidrogeles antes del recubrimiento proteico. Los resultados son mostrados en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 - Caracterización de hidrogeles producidos por gelificación iónica

Hidrogel	Humedad (%)	Ceniza (%)	Lípidos (%)	Tamaño (µm)	EE (%)
H <sub>PEC</sub>	94.73 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>b</sup>	36.35 ± 0.68 <sup>a</sup>	202.75 ± 7.41 <sup>a</sup>	88.27 ± 1.66 <sup>a</sup>
H <sub>ALG</sub>	93.63 ± 0.79 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.03 <sup>a</sup>	32.02 ± 1.58 <sup>b</sup>	175.44 ± 9.97 <sup>b</sup>	73.60 ± 3.62 <sup>b</sup>

Promedio ± desvío estadístico (n=3); EE= Eficiencia de encapsulación. Nota: Letras diferentes en la misma columna representan diferencia significativa (p>0.05) entre las medias determinadas utilizando el Test de Tukey.

Fue observado alto contenido de humedad en los hidrogeles producidos, estas variaciones no fueron significativas (p>0.05). Estos valores encontrados son característicos de los hidrogeles producidos por gelificación iónica, debido a que tienen la propiedad de retener alta cantidad de agua en la matriz gelificada (Liu, Fishman y Hicks, 2007). Debido a esto, la estructura interna de los hidrogeles se aproxima a una estructura tridimensional porosa tipo “caja de

*huevo*" (Thorne, Vine y Snowden, 2011). Esto explicaría los altos valores de humedad contenido en el hidrogel encontrados en el presente estudio.

También, fue determinado el contenido de cenizas con el objetivo de determinar la materia inorgánica presente en los hidrogeles. Los resultados muestran mayor cantidad de cenizas en H<sub>ALG</sub> cuando comparado con la cantidad de cenizas en H<sub>PEC</sub>, con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ), a pesar de haber utilizado mayor concentración de cloruro de calcio para producir H<sub>PEC</sub>. Estos resultados pueden ser debidos a la menor de interacción de los grupos carboxílicos de la pectina con los iones calcio.

El tamaño medio de hidrogeles para ambos polisacáridos fue determinado, con la finalidad de tener una medida control, previo a la adsorción de proteína. Los resultados obtenidos muestran mayor tamaño en hidrogeles de pectina. Resultados similares, fueron observados en estudio reciente por Tello *et al.*, (2015) donde las partículas de pectina presentaron mayor tamaño cuando comparado con las partículas de alginato, en la que formaron estructuras de enlaces cruzados. Esto puede ser debido, al potencial de la pectina para unirse con un número mayor de moléculas de agua. Cabe destacar que, el tamaño del hidrogel depende de varios factores que incluyen, la concentración y estructura de los biopolímeros, el diámetro de la aguja del atomizador, la distancia entre la superficie inferior del atomizador y la superficie de la solución de cloruro de calcio, y la velocidad de flujo de la emulsión (Strasdat y Bunjes, 2013). Por lo que, probablemente se sustentaría las diferencias de tamaños entre los hidrogeles del presente estudio.

Por otro lado, para producir hidrogeles de alginato la cantidad inicial de lípidos fue de 42.85% de sólidos totales (2.0g de polisacárido + 1.50g de aceite sacha inchi, para 100mL de emulsión), y para hidrogeles de pectina la cantidad inicial de lípidos, fue 41.17% en sólidos totales (2.5g de polisacárido + 1.75g de aceite sacha inchi, para 100mL de emulsión). Sin embargo, al determinar el contenido de lípidos en H<sub>PEC</sub> (36.35%) y H<sub>ALG</sub> (32.02%) fue encontrado diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores anteriores fueron utilizados para calcular la eficiencia de encapsulación de los hidrogeles, obteniendo  $73.60\% \pm 3.62$  y  $88.27\% \pm 3.62$  de eficiencia de encapsulación, para H<sub>ALG</sub> y H<sub>PEC</sub> respectivamente. La literatura indica que, la eficiencia de la

encapsulación depende del grado de reticulación en la superficie polimérica de las gotas de emulsión (Chang y Dobashi, 2003; Drusch y Berg, 2008). De igual modo, Soliman *et al.* (2013) evaluaron los efectos de la concentración del polisacárido (alginato), concentración de la solución catiónica ( $\text{CaCl}_2$ ) y tiempo de reticulación sobre la eficiencia de encapsulación. Los autores indican que la eficiencia de encapsulación aumenta al incrementar la concentración de solución catiónica. En cambio, Badarinath *et al.* (2010) encontraron que la EE% incrementa a medida que aumenta la concentración de polisacárido (alginato). Estos datos podrían explicar los mayores porcentajes de eficiencia de encapsulación en  $H_{\text{PEC}}$ , debido a que, tanto la concentración de polisacárido como de solución catiónica en hidrogeles de pectina fue 0.5% mayor que las concentraciones usadas para los hidrogeles de alginato. Por su parte, Chan *et al.* (2000), al evaluar la viabilidad de encapsular aceite de germen de trigo y aceite de onagra obtuvieron una eficiencia de encapsulación máxima de 88%. Benavides *et al.* (2016), cuando utilizaron alginato de sodio para encapsular aceite esencial de aceite de tornillo, obtuvieron un valor de 85% de eficiencia de encapsulación. Los altos resultados de eficiencia de encapsulación en las investigaciones anteriores son próximos a lo encontrado en el presente estudio, lo cual demuestra la eficacia de la técnica de gelificación iónica para encapsular sustancias hidrofóbicas.

La Figura 4.1. muestra la morfología de los hidrogeles húmedos producidos por gelificación iónica. La morfología de hidrogeles de pectina presenta forma esférica e irregular, con pared aparentemente frágil, al mismo tiempo, las gotas de aceite se encuentran distribuidas en toda la matriz. En contraste, hidrogeles de alginato muestran paredes con mayor definición.

---

## Hidrogeles húmedos por gelificación iónica

---

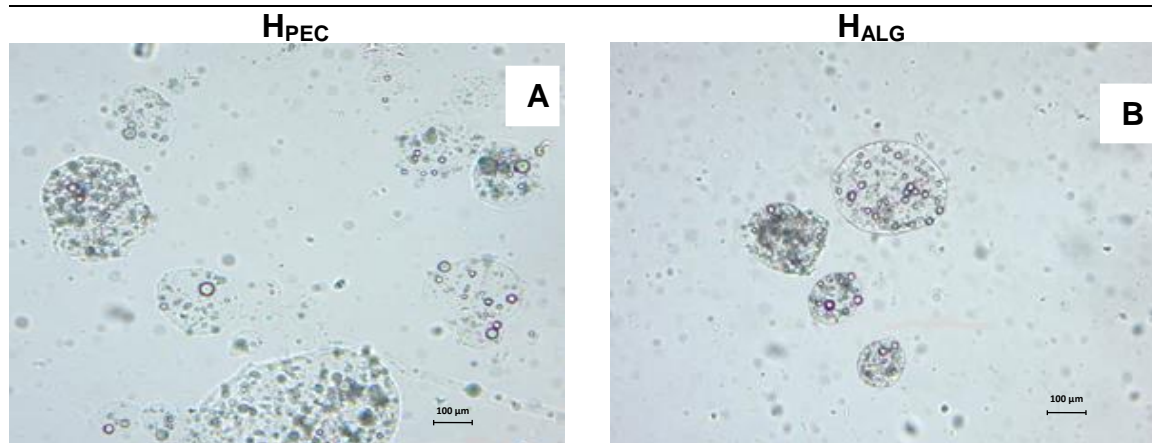


Figura 4.1. Imágenes obtenidas por MO. A = Hidrogel húmedo de pectina. B = Hidrogel húmedo de alginato. Barra MO = 100 μm. Objetivo: 10x

Datos similares fue reportado por Tello *et al.* (2015), donde indicaron que la morfología de partículas de pectina presenta superficies irregulares y rugosas, en contraste a lo hallado con micropartículas de alginato. Y así, queda evidenciado la fragilidad de las partículas al utilizar pectina.

#### **4.4. Recubrimiento de hidrogeles de alginato y pectina con proteínas de clara de huevo y sangre bovina en estado natural por interacción electrostática**

El recubrimiento de H<sub>PEC</sub> y H<sub>ALG</sub> húmedos con proteínas de SB y CH en estado natural fue realizado con la finalidad de obtener parámetros que sean útiles en relación a la adsorción de proteínas en estado natural, debido a la escasa literatura disponible. Ambas fuentes proteicas presentan estructura globular, cuyas superficies son heterogéneas, flexibles y altamente irregulares con cargas dependientes del pH. Debido a las limitaciones para determinar potencial Z (electronegatividad) de los biopolímeros utilizados en este estudio, fueron asumidos valores reportados en estudios anteriores. Tello *et al.* (2015) reportaron valores de electronegatividad a pH 4.0 de  $-0.68 \pm 0.08\text{mV}$  y  $-3.8 \pm 1.7\text{mV}$  para hidrogeles de pectina y alginato, respectivamente. Esto puede ser debido a que la pectina tiene pKa de 2.9 (Ralet *et al.*, 2001) y el alginato un pka entre 3.20 – 3.38 (Martinsen *et al.*, 1992). Así mismo, los valores del punto isoeléctrico (pI) de sangre bovina y clara de huevo fueron de 6.7 y 4.8, respectivamente. Por lo cual, estos valores fueron utilizados como referencia en la elección del valor de pH 4.0

para promover mayor interacción electrostática entre hidrogeles húmedos de pectina y alginato cargados negativamente con soluciones de proteínas de SB y CH en estado natural con carga positiva.

La Tabla 4.3, muestra las cantidades de proteínas adsorbidas en los sistemas estudiados. En general, el incremento de la proteína en solución resultó en incremento de proteína adsorbida independiente del tipo de proteína o del tipo de hidrogel utilizado.

Tabla 4.3 – Cantidad de proteína adsorbida en hidrogeles de pectina y alginato

Hidrogel	Fuente proteica	Concentración de proteína (%)			
		2	4	8	10
H <sub>PEC</sub>	SB	55.39 ± 2.19 <sup>aA(b)</sup>	58.49 ± 0.78 <sup>aA(b)</sup>	64.12 ± 0.57 <sup>aA(a)</sup>	65.47 ± 1.38 <sup>aA(a)</sup>
	CH	49.43 ± 1.03 <sup>aB(b)</sup>	52.34 ± 1.20 <sup>aB(b)</sup>	58.85 ± 1.45 <sup>aB(a)</sup>	61.14 ± 2.73 <sup>aB(a)</sup>
H <sub>ALG</sub>	SB	14.35 ± 0.58 <sup>bB(d)</sup>	18.63 ± 1.07 <sup>bA(c)</sup>	26.71 ± 1.84 <sup>bA(b)</sup>	43.12 ± 2.02 <sup>bB(a)</sup>
	CH	21.28 ± 1.17 <sup>bA(d)</sup>	25.04 ± 1.31 <sup>bB(c)</sup>	29.77 ± 1.33 <sup>bB(b)</sup>	36.18 ± 2.10 <sup>bA(a)</sup>

Promedio ± desvío estadístico (n=3). Promedios seguidos de letras diferentes en minúscula en la misma columna presentan diferencias significativas entre tipo de hidrogel en combinación con el mismo tipo de proteína por cada concentración (P<0,05) por el Test de Tukey. Promedios seguidos de letras diferentes en mayúscula en la misma columna presentan diferencias significativas entre tipo de proteína por cada tipo de hidrogel en cada concentración (P<0,05) por el Test de Tukey. Promedios seguidos de letras diferentes en minúscula dentro de cada paréntesis en la misma fila presentan diferencias significativas entre las concentraciones por tipo de proteína por tipo de hidrogel (P<0,05) por el Test de Tukey.

En el presente estudio, la cantidad de proteína adsorbida fue significativamente mayor en hidrogeles de pectina (p<0.05) cuando comparado con las cantidades adsorbidas en hidrogeles de alginato, independientemente del tipo y concentración de proteína utilizada para promover interacción. Por otro lado, se observó que la adsorción de proteínas de sangre bovina fue mayor en hidrogeles de pectina, y por el contrario la adsorción de proteínas de clara de huevo no tuvo preferencia por tipo de hidrogel. De igual manera, se comprobó mayores cantidades de proteínas adsorbidas en concentraciones de 8 y 10% para hidrogeles de pectina, y 10% para hidrogeles de alginato.

Tello *et al.*, (2015), describió comportamientos similares cuando fue utilizado micropartículas de alginato y pectina para evaluar adsorción de proteínas, los resultados mostraron mayor adsorción en micropartículas de pectina (62.08% ± 0.69, para ovoalbúmina y 60.08% ± 2.51 para proteínas del suero de leche), en contraste con micropartículas de alginato (47.37% ± 1.15;



46.92%  $\pm$  2.22, para ovoalbúmina y proteínas de suero de leche, respectivamente.

En otro estudio, realizado por Córdova *et al.* (2015), los autores recubrieron micropartículas de alginato con proteínas de suero de leche y proteínas de clara de huevo; altas cantidades de proteína fueron adsorbidas cuando fue utilizado solución de proteínas de suero de leche comparado con la solución de proteínas de clara de huevo. A su vez, describieron la masa molecular de las principales proteínas contenidas en las soluciones proteicas anteriormente mencionadas, y así atribuyeron la diferencia de adsorciones a la alta masa molar de la ovoalbúmina de 45 kDa contra la  $\beta$ -lactoglobulina con masa molar de 18.5 kDa, lo que quiere decir que mientras mayor sea la masa molar de la proteína, menor es la adsorción. Esta teoría difiere con los resultados encontrados en el presente estudio, puesto que esta vez fue la sangre bovina que mejor se adsorbió a pesar de que su principal proteína la hemoglobina tiene una masa molar de 64 kDa contra la masa molecular de 45 kDa de la ovoalbúmina (CH).

Por otro lado, Ramsden (1995), observó crecientes cantidades de proteínas adsorbidas cuando se incrementaron la concentración de proteína en solución. De igual manera, Tello *et al.* (2015), indicaron que al aumentar la concentración de proteína de la solución dio como resultado aumentos en la cantidad de proteína adsorbida para todos los sistemas estudiados.

#### **4.5. Caracterización de hidrogeles recubiertos**

##### **4.5.1. Humedad de hidrogeles recubiertos con proteínas**

Se determinó el porcentaje de humedad en hidrogeles recubiertos con proteínas de sangre bovina y clara de huevo, teniendo como objetivo analizar el efecto del recubrimiento proteico. Los resultados se muestran en la Tabla 4.4.

Alto contenido de humedad fue observado en hidrogeles de pectina recubiertos con proteínas cuando comparado con hidrogeles de alginato. La humedad inicial de hidrogeles de pectina fue 94.73%  $\pm$  0.28, y para alginato 93.33 % $\pm$  0.789.

Tabla 4.4. Contenido de humedad de hidrogeles recubiertos a diferentes concentraciones de proteína.

Hidrogel	Fuente proteica	Concentración de proteína (%)			
		2	4	8	10
H <sub>PEC</sub>	SB	89.88 ± 0.33 <sup>aA(a)</sup>	85.94 ± 0.17 <sup>bA(b)</sup>	75.98 ± 0.65 <sup>bA(c)</sup>	74.60 ± 0.86 <sup>bB(c)</sup>
	CH	89.86 ± 0.14 <sup>aA(a)</sup>	87.16 ± 0.21 <sup>aA(b)</sup>	80.48 ± 1.88 <sup>bB(c)</sup>	77.62 ± 3.53 <sup>bA(d)</sup>
H <sub>ALG</sub>	SB	91.61 ± 0.14 <sup>aA(a)</sup>	90.00 ± 0.57 <sup>aA(a)</sup>	89.55 ± 0.12 <sup>aA(a)</sup>	89.55 ± 0.12 <sup>aA(b)</sup>
	CH	88.01 ± 0.48 <sup>aB(a)</sup>	86.76 ± 0.02 <sup>aB(ab)</sup>	84.81 ± 0.55 <sup>aA(bc)</sup>	83.36 ± 7.23 <sup>aB(a)</sup>

Promedio ± desvío estadístico (n=3). Promedios seguidos de letras diferentes en minúscula en la misma columna presentan diferencias significativas entre tipo de hidrogel en combinación con el mismo tipo de proteína por cada concentración (P<0,05) por el Test de Tukey. Promedios seguidos de letras diferentes en mayúscula en la misma columna presentan diferencias significativas entre tipo de proteína por cada tipo de hidrogel en cada concentración (P<0,05) por el Test de Tukey. Promedios seguidos de letras diferentes en minúscula dentro de cada paréntesis en la misma fila presentan diferencias significativas entre las concentraciones por tipo de proteína por tipo de hidrogel (P<0,05) por el Test de Tukey.

El contenido de humedad según el tipo de polisacárido no tuvo diferencias significativas (p>0.05) cuando se utilizaron las concentraciones 2 para 4%, sin embargo, si fue encontrado diferencias significativas (p<0.05) al variar las concentraciones a 8 y 10%. Así mismo, al analizar SB y CH individualmente, la humedad en hidrogeles recubiertos con SB no hubo variaciones sustanciales por el tipo de hidrogel, cuando se utilizaron las concentraciones 2, 4 y 8% no se encontró diferencias significativas (p>0.05). Por el contrario, cuando se utilizó 10% de concentración de proteínas, el contenido de humedad fue mayor en hidrogel de alginato. En cuanto a hidrogeles recubiertos con CH, al utilizarse las concentraciones 2, 4, y 10% el contenido de humedad fue mayor en hidrogeles de alginato, en cambio al usar concentraciones de 8% se encontraron diferencias significativas (p<0.05), donde la humedad fue mayor en hidrogeles de pectina.

Por otro lado, al evaluar las concentraciones utilizadas para el recubrimiento, fue observado que el porcentaje de humedad fue decreciendo al incrementar la concentración de proteína en solución, independientemente del tipo de hidrogel.

#### 4.5.2. Ceniza

Los resultados de la caracterización de ceniza en hidrogeles de pectina y alginato recubiertos con 10% de proteínas en solución son mostrados en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Caracterización de ceniza en hidrogeles recubiertos con proteína al 10%

Hidrogel	Fuente Proteica	Proteína en solución (10%)
H <sub>PEC</sub>	SB	1.85 ± 0.06 <sup>aA</sup>
	CH	0.79 ± 0.09 <sup>aB</sup>
H <sub>ALG</sub>	SB	1.11 ± 0.04 <sup>bA</sup>
	CH	0.59 ± 0.14 <sup>bB</sup>

Promedio ± desviación estandar (n=3).

Los resultados muestran mayor contenido de ceniza en hidrogeles de pectina, cuando comparado con hidrogeles de alginato. Lo cual puede ser debido a la mayor capacidad de hidrogeles para adsorber proteínas. A su vez, fue observado mayor contenido de cenizas en hidrogeles recubiertos con sangre bovina, que probablemente sea a causa del alto contenido de materia inorgánica presente en sangre bovina en contraste con la clara de huevo.

#### 4.5.3. Morfología y determinación de tamaño medio

El tamaño medio de los hidrogeles de alginato y pectina recubiertos fue determinado por microscopía óptica para evaluar la influencia del recubrimiento proteico sobre los hidrogeles. Los resultados se muestran en la Tabla 4.7.

Tabla 4.6. Tamaño medio (µm) de hidrogeles recubiertos con proteína de sangre bovina y clara de huevo.

Hidrogel	Fuente proteica	Hidrogeles recubiertos - concentración de proteína (%)			
		2	4	8	10
H <sub>PEC</sub>	SB	173.65 ± 16.58 <sup>aA</sup>	170.94 ± 11.61 <sup>aAB</sup>	160.12 ± 10.84 <sup>bAB</sup>	156.73 ± 10.54 <sup>bB</sup>
	CH	187.40 ± 7.41 <sup>Aa</sup>	175.07 ± 16.88 <sup>aAB</sup>	167.46 ± 12.49 <sup>bAB</sup>	160.63 ± 10.73 <sup>bB</sup>
H <sub>ALG</sub>	SB	174.70 ± 7.96 <sup>Aa</sup>	182.05 ± 17.75 <sup>aA</sup>	180.79 ± 9.79 <sup>aA</sup>	185.07 ± 9.52 <sup>aA</sup>
	CH	176.10 ± 8.95 <sup>Aa</sup>	180.46 ± 11.38 <sup>aA</sup>	177.07 ± 7.60 <sup>aA</sup>	176.30 ± 7.23 <sup>aA</sup>

Promedio ± desvío padrón (n=3). Promedios seguidos de letras diferentes en minúscula en la misma columna presentan diferencias significativas entre tipo de hidrogel en combinación con el mismo tipo de proteína por cada concentración (P<0,05) por el Test de Tukey. Promedios seguidos de letras diferentes en mayúscula en la misma columna presentan diferencias significativas entre tipo de proteína por cada tipo de hidrogel en cada concentración (P<0,05) por el Test de Tukey.

Fue encontrado que el ( $p > 0.05$ ) para el tipo de proteína empleado no fue significativo, es decir que no fue un factor influyente en el tamaño de los hidrogeles. No obstante, en concentraciones de proteínas de 8 y 10 % fue encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tipo de hidrogel, donde hidrogeles de alginato presentaron mayor tamaño. Asimismo, el aumento de tamaño del hidrogel de alginato al variar las concentraciones no fue significativo ( $p > 0.05$ ), mientras que la disminución de tamaño del hidrogel de pectina decrecía al aumentar las concentraciones sí tuvo diferencias significativas.

Resultados similares fueron reportados por Tello *et al.* (2015), donde encontraron que después de la adsorción proteica, micropartículas de pectina disminuyeron de tamaño en contraste a micropartículas de alginato que aumentaron de tamaño.

Becker *et al.* (2012), indicaron que la adsorción de proteínas sobre hidrogeles cargados y la constante liberación de contra-iones produce reducción de la presión osmótica y consecuentemente el encogimiento del hidrogel cargado. Lo anterior explica la teoría de que la proteína adsorbida ejerció presión sobre la superficie frágil del hidrogel de pectina, ocasionando que el agua contenida en el hidrogel sea expulsada, hecho que produjo una reducción de tamaño.

La Figura 4.2 muestra las imágenes obtenidos por microscopía óptica de los hidrogeles recubiertos con proteínas utilizando la mayor concentración de los sistemas estudiados (10%). Fue observado que el recubrimiento proteico no afectó la forma de las estructuras de los hidrogeles. Sin embargo, se puede apreciar claramente la proteína que fue adsorbida en la superficie de los hidrogeles, los hidrogeles recubiertos con solución de SB muestran una aparente superficie rugosa en comparación con la superficie lisa de hidrogeles que adsorbieron proteínas de clara de huevo. Así mismo, se observó que los hidrogeles recubiertos con sangre bovina adquirieron una coloración marrón intensa.

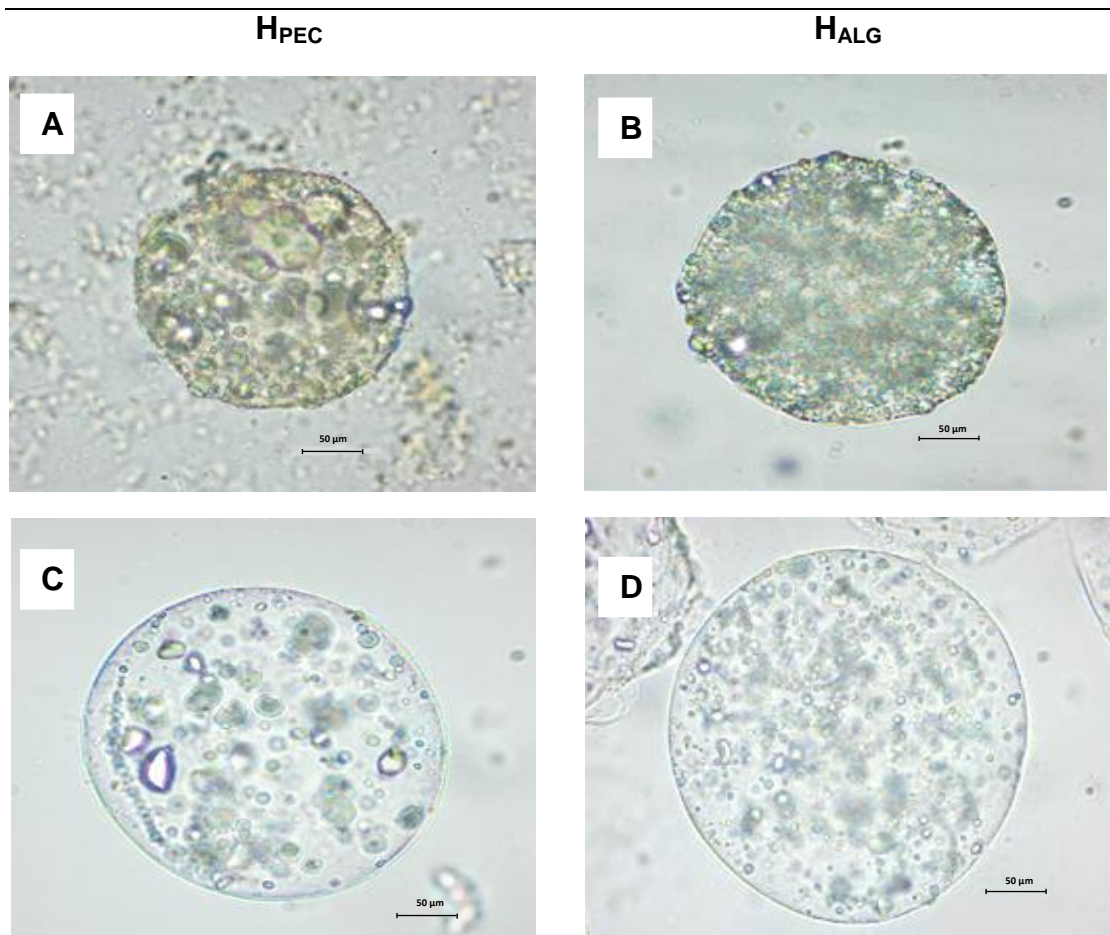


Figura 4.2. – Imágenes obtenidas por MO. SB= Sangre bovina, CH= Clara de Huevo. Fila 1: Hidrogeles recubiertos con sangre bovina (A-pectina, B- alginato). Fila 2: Hidrogeles recubiertos con sangre bovina (C-pectina, D- alginato). Barra MO = 50 µm. Objetivo= 40x

#### 4.6. Resistencia de hidrogeles de pectina y alginato con y sin recubrimiento de proteínas de sangre bovina y clara de huevo, sometidas a condiciones gastrointestinales.

$H_{PEC}$  e  $H_{ALG}$  recubiertos con proteínas fueron expuestos a condiciones gastrointestinales *in vitro*, con el objetivo de evaluar su resistencia física y solubilidad de las proteínas adsorbidas en los hidrogeles (ítem 4.7)

La Figura 4.3., muestra imágenes de  $H_{PEC}$  e  $H_{ALG}$  sin recubrimiento proteico sometidas condiciones gastrointestinales. La morfología de los hidrogeles en el tiempo cero, fue descrita anteriormente (ítem 4.3). Luego, al ser expuestos a condiciones gástricas durante 2 horas,  $H_{ALG}$  demostraron mayor resistencia a la acción de la pepsina en comparación a  $H_{PEC}$ , que visiblemente se hincharon. Acto seguido, al ser trasladados a condiciones intestinales, después de 5 horas,  $H_{PEC}$  fueron destruidos completamente, pudiéndose

observar gotas dispersas de aceite en el campo óptico, mientras que H<sub>ALG</sub>, presentan resistencia a la acción enzimática conservando aún su forma esférica, aunque con apariencia de sufrir hinchamiento hasta el doble de su tamaño inicial.

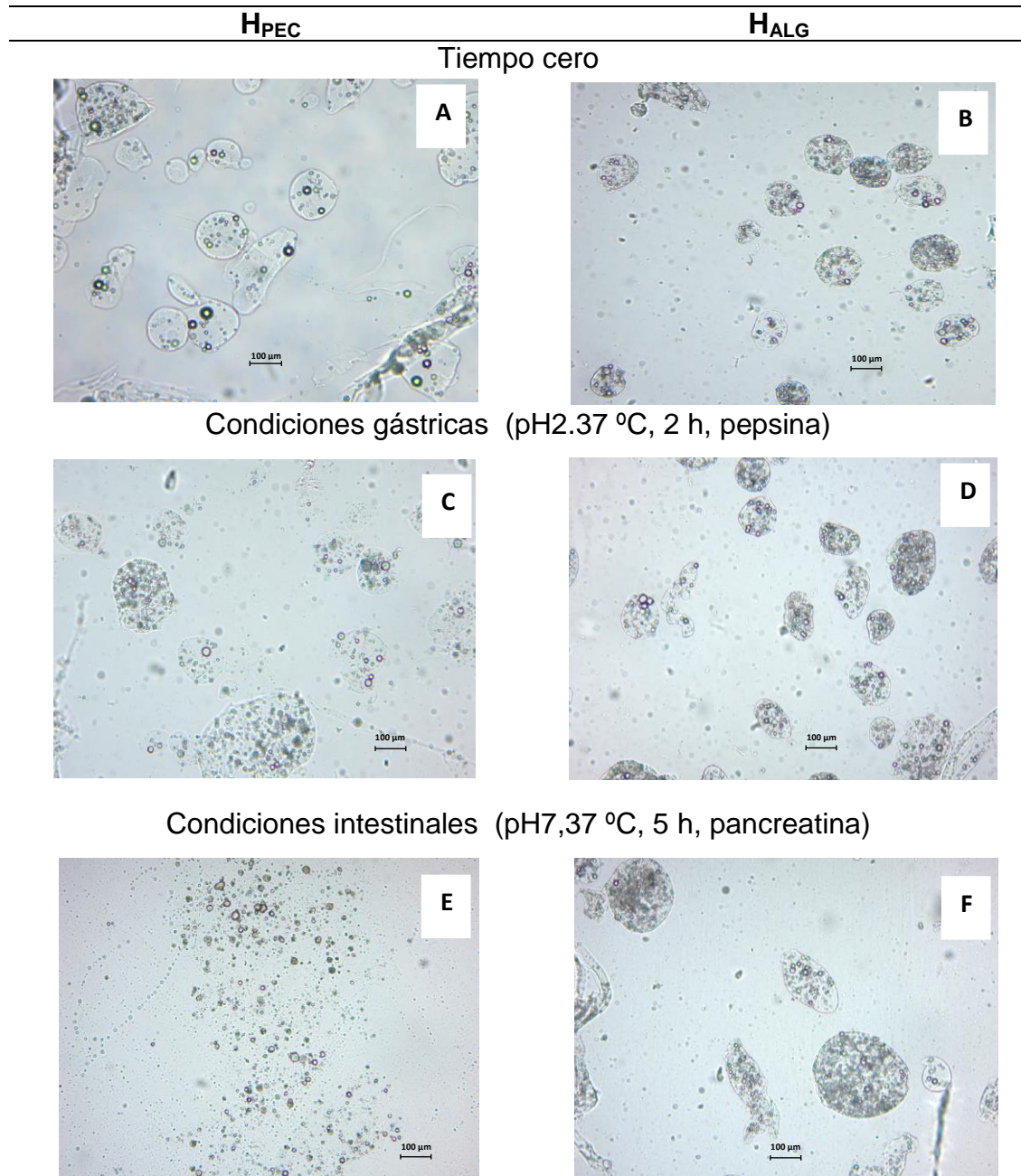


Figura 4.3. **A y B:** Imágenes obtenidas por MO de hidrogeles de alginato y pectina sin tratamiento (tiempo 0). **C y D,** hidrogeles sometidas a simulación secuencial de jugo gástrico artificial (JGA). **E y F,** hidrogeles sometidas a simulación del jugo intestinal artificial (JIA). Barra MO = 100 μm. Objetivo= 10x

El mantenimiento de la integridad de las estructuras de H<sub>ALG</sub> puede estar relacionado con la interacción entre los grupos carboxílicos del alginato con los iones de calcio durante el proceso de gelificación (Braccini y Pérez, 2001). Así mismo, la desintegración de H<sub>PEC</sub> en condiciones intestinales es debida a la presencia de sales, que promueven repulsión electrostática entre grupos carboxílicos e iones (Lin *et al.*, 2005).

Estos resultados evidenciarían que los hidrogeles de alginato, sometidos a condiciones gastrointestinales podrían desintegrarse a la altura del intestino grueso por acción de la microflora con liberación total del activo. Ésto puede deberse al hecho de que el alginato es más estable en soluciones a pH bajo, aunque se hinchan en condiciones débilmente básicas (Annan, Borza y Hansen, 2008). La degradación de materiales de pared encapsulantes de fármacos ha sido previamente investigada en sistemas que simulan condiciones de pH, temperatura y tiempo en diferentes sitios del tracto gastrointestinal (Philip y Philip, 2010).

Imágenes contenidas en la Figura 4.4, muestran H<sub>PEC</sub> con recubrimiento proteico de SB y CH (10%), sometidos a condiciones gastrointestinales. En el tiempo cero los hidrogeles no fueron sometidos a simulación, siendo esto para efectos de comparación. Posteriormente, en condiciones gástricas, estos hidrogeles mostraron resistencia a la acción de la pepsina. Por el contrario, en condiciones gástricas, éstos se destruyeron completamente independientes del tipo de proteína utilizada en el recubrimiento.

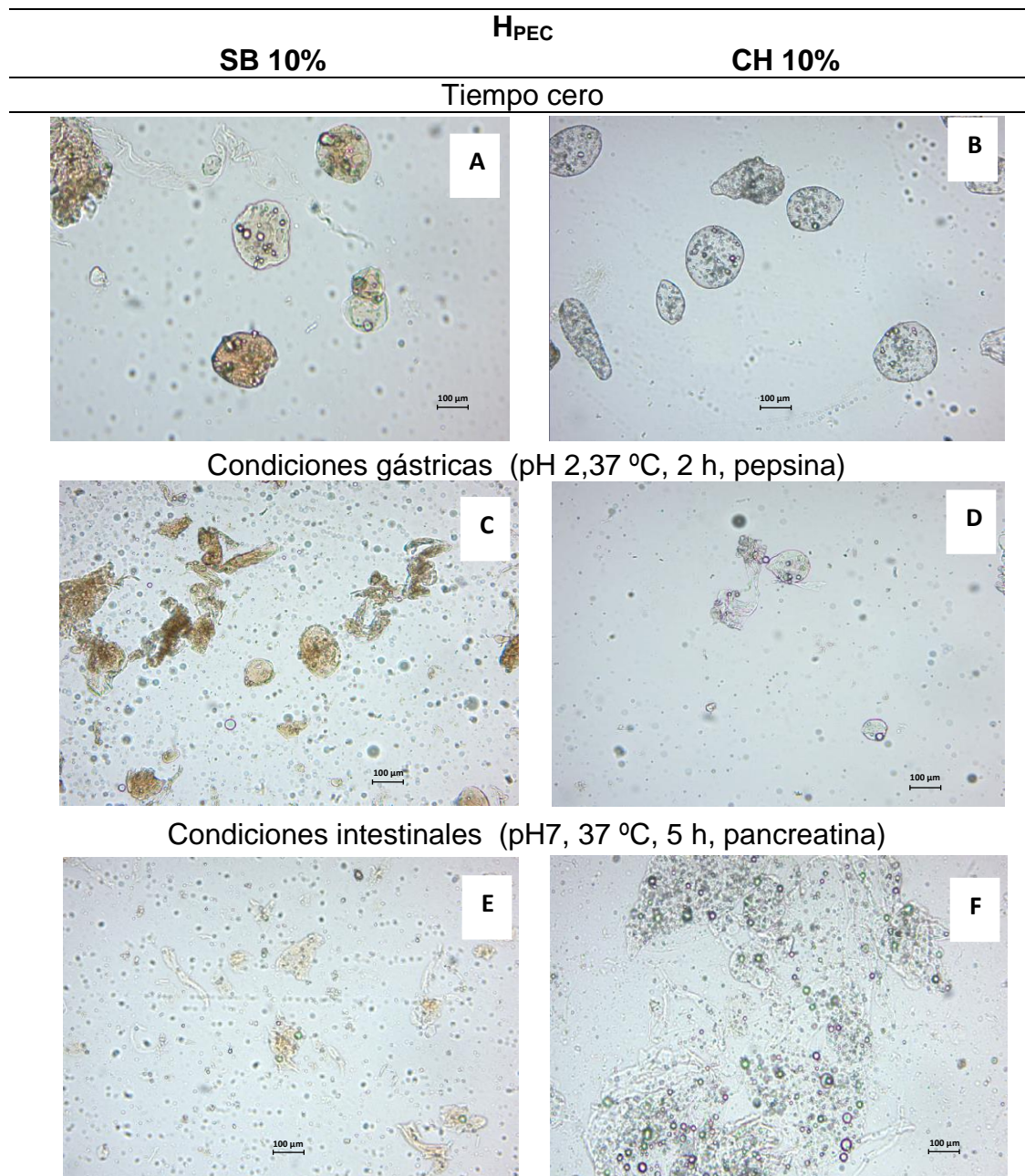


Figura 4.4. – **A y B**: Imágenes obtenidas por MO de hidrogeles de pectina recubiertos con sangre bovina y clara de huevo. **C y E**, hidrogeles de pectina recubiertas con sangre bovina y huevo sometidas a simulación secuencial de jugo gástrico artificial (JGA). **D y F**, Hidrogeles de pectina recubiertas con sangre bovina y clara de huevo sometidas a simulación del jugo intestinal artificial (JIA). Barra MO = 100 µm. Objetivo= 10x

La Figura 4.5. muestra imágenes de hidrogeles de alginato recubiertos con sangre bovina y clara de huevo (10%), sometidos a condiciones gastrointestinales. En las cuales, observamos que mantuvieron su aspecto físico y su forma esférica posterior a las 7 horas de la simulación gastrointestinal; sin embargo, éstos mostraron un marcado proceso gradual de hinchamiento, durante el tránsito simulado. Asimismo, se observa que en la transición entre las condiciones gástricas a las intestinales hay un cambio de coloración. Lo cual,



probablemente es debido a que las proteínas adheridas a la superficie del hidrogel (responsables de la coloración marrón oscura) cedieron al proceso enzimático.

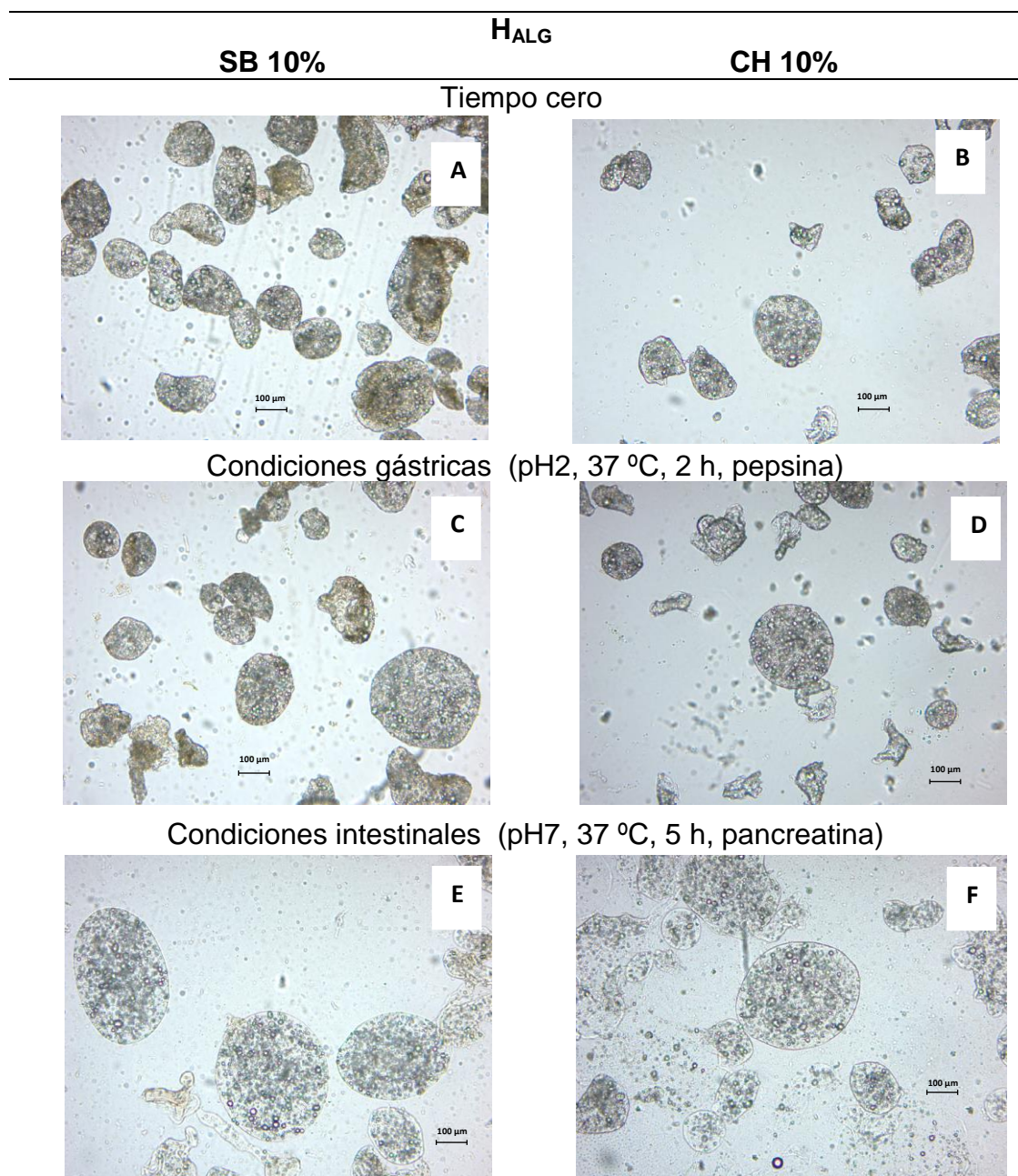


Figura 4.5. – A y B: Imágenes obtenidas por MO de hidrogeles de alginato recubiertas con sangre bovina y clara de huevo. C y E, hidrogeles de alginato recubiertas con sangre bovina y huevo sometidas a simulación secuencial de jugo gástrico artificial (JGA). D y F, hidrogeles de alginato recubiertas con sangre bovina y clara de huevo sometidas a simulación del jugo intestinal artificial (JIA). Barra MO = 100  $\mu$ m.

Resultados encontrados en  $H_{PEC}$ , constatan que el recubrimiento proteico con SB y CH brindó protección adicional en condiciones gástricas, dado que los  $H_{PEC}$  sin recubrir mostraron un comportamiento marcado de hinchamiento cuando se les sometió a las mismas condiciones. Sin embargo, al ser

trasladados a condiciones intestinales, el recubrimiento proteico no fue de mucha ayuda puesto que, se destruyeron completamente como sus pares sin recubrir. Hecho similar, observó Gebara *et al.* (2013), donde constataron que partículas de pectina se mostraron intactas a la simulación del jugo gástrico pH (1.2 y 3.0) durante 2 h. Sin embargo, al ser expuestos al jugo intestinal a un pH de 7.0 durante 5 h, se destruyeron.

Con respecto a H<sub>ALG</sub> recubiertos, encontramos que el recubrimiento proteico ofreció protección frente a la acción enzimática y cambios bruscos de pH tanto en condiciones gástricas como en intestinales. De la misma manera, Corstens *et al.* (2017) estudiaron la apariencia de geles de alginato obtenidos por gelificación sometidos condiciones gastrointestinales *in vitro*. En condiciones gástricas, éstos no fueron afectados sustancialmente; sin embargo, fue encontrado que durante la incubación intestinal, la microestructura general de los geles cambió, mostrando debilidad e hinchamiento, el factor que predispuso estos cambios fue su tamaño. Después de 15 minutos de incubación intestinal la microestructura del gel mostró debilitamiento, así como se menciona en la literatura (Rayment *et al.*, 2009).

Los rangos de pH del estómago en estado de ayunas varían entre 1 y 2; sin embargo, este valor aumenta después de ingerir alimentos (Rubinstein, 1995). El pH del intestino delgado proximal es de 6.5, y alrededor de 5.5 en el intestino delgado proximal (Evans *et al.*, 1988). Desde el íleon al colon, el valor de pH disminuye significativamente. A su vez, el valor de pH en el ciego es de 6.4. No obstante, valores de pH bajos como 5.7 han sido determinados en el colon ascendente de voluntarios saludables (Bussemer *et al.*, 2001). El valor de pH del colon transversal es de 6.6 y aproximadamente 7.0 en el colon descendente. El uso de hidrogeles sensibles al pH se basa en las diferencias de estos valores de pH (Ashord *et al.*, 1993).

La protección adicional del recubrimiento proteico también fue descrito por Tello *et al.* (2015), donde de igual manera evaluaron si el recubrimiento con proteínas globulares sobre micropartículas de pectina y alginato producidos por gelificación iónica, podría mejorar la estabilidad del bioactivo encapsulado y encontraron que ambas partículas recubiertas ofrecieron mayor protección al bioactivo cuando comparado con partículas no recubiertas.

#### 4.7. Solubilidad de proteínas adsorbidas en hidrogeles sometidas a condiciones gastrointestinales

Hidrogeles de pectina y alginato producidos por gelificación iónica conteniendo aceite de sacha inchi fueron recubiertos con soluciones de proteínas de SB y CH a mayor concentración (10%). Y posteriormente, fueron sometidos a condiciones gastrointestinales, con el fin de determinar la solubilidad de proteína adsorbida.

La Tabla 4.7 presenta la solubilidad de proteínas adsorbidas en H<sub>PEC</sub> e H<sub>ALG</sub> sometidos a condiciones gastrointestinales después de siete horas de exposición. Los resultados mostraron que en condiciones gástricas la interacción entre el tipo de hidrogel y fuente proteica no fue significativa ( $p > 0.05$ ). A pesar de que, fue evidenciado diferencias entre los factores individualmente, obteniéndose mayores porcentajes de solubilidad al utilizar H<sub>PEC</sub> recubiertos de con SB. Consecutivamente, en condiciones intestinales tanto la interacción entre factores como el tipo de fuente proteica no fueron significativos ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, dependiendo del tipo de hidrogel las solubilidades fueron diferentes, resaltando nuevamente a H<sub>PEC</sub> con los valores más significativos.

Tabla 4.7. Solubilidad de proteínas adsorbidas en hidrogeles de pectina y alginato sometido a condiciones gastrointestinales.

Hidrogel	Fuente proteica	Simulación Gastrointestinal	
		Condiciones gástricas (pH 2,37 °C, 2h)	Condiciones intestinales (pH 7,37 °C, 5h)
H <sub>PEC</sub>	SB	35.80 ± 1.34 <sup>Aa</sup>	95.16 ± 3.14 <sup>aA</sup>
	CH	32.50 ± 2.14 <sup>Ab</sup>	94.45 ± 1.98 <sup>aA</sup>
H <sub>ALG</sub>	SB	15.71 ± 1.03 <sup>Ba</sup>	85.24 ± 2.60 <sup>bA</sup>
	CH	10.02 ± 0.58 <sup>Bb</sup>	87.35 ± 0.95 <sup>bA</sup>

Promedio ± desviación estandar (n=3). SB= Sangre Bovina; CH= Clara de huevo. Promedios seguidos de letras diferentes en minúscula en la misma columna presentan diferencias significativas entre tipo de hidrogel ( $P < 0,05$ ) por el Test de Tukey. Promedios seguidos de letras diferentes en mayúscula en la misma columna presentan diferencias significativas entre tipo de fuente proteica ( $P < 0,05$ ) por el Test de Tukey.

En estudios relacionados con solubilidad, Córdova *et al.* (2015), evaluaron la solubilidad de micropartículas de pectina recubiertas con proteínas del suero de la leche (una parte de ellas fueron tratadas térmicamente)

sometidas condiciones gástricas (pH 1.2 y 3.0) e intestinales (pH7.0). Donde fue encontrada una solubilidad de proteína superior al 40% para el tratamiento inicial a pH 1.2, indicando que dichas micropartículas son frágiles a pH ácido en presencia de pepsina, sin embargo, cuando el pH fue menos drástico (3.0) la solubilidad fue menor después de las dos horas. A su vez, la solubilidad de las micropartículas recubiertas con proteína con tratamiento térmico fue significativamente mayor que las de sin tratamiento térmico. En nuestro estudio, hidrogeles de pectina fueron quienes mostraron mayor solubilidad a estas condiciones con un valor máximo de  $35.80 \pm 1.34$ , lo cual no es resultado deseable, puesto que al desprenderse esa cantidad de proteína se desprotege al hidrogel poroso conteniendo aceite de sacha inchi, exponiendo el aceite a la oxidación lipídica, lo que haría que pierda sus propiedades funcionales. En cambio, en H<sub>ALG</sub>, el máximo valor solubilidad en condiciones gástricas fue de  $15.71 \pm 1.03$ , resultado que evidenciaría mayor protección al hidrogel poroso en estas condiciones.

En cuanto a los resultados de solubilidad en condiciones intestinales, altos valores en el lugar de mayor adsorción de nutrientes en el cuerpo, son deseables para la aplicación de proteínas en numerosas formulaciones de alimentos (Etheridge *et al.*, 1981). Asimismo, los biopolímeros sensibles al pH para la liberación específica de fármacos en el colon son insolubles a pH bajo, pero su solubilidad aumenta al aumentar el pH (Ashord *et al.*, 1993).

**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSIONES Y**  
**RECOMENDACIONES**

## **V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1. Conclusiones.**

Hidrogeles de pectina y alginato son producidos por gelificación iónica utilizando aceite de sachá inchi como material de relleno. Altas eficiencias de encapsulación se observan al emplear la técnica de gelificación iónica y al utilizar aceite de sachá inchi como material de relleno.

Proteínas de sangre bovina y proteínas de clara de huevo en su estado natural poseen características adecuadas para su uso como material de recubrimiento sobre superficies húmedas de hidrogeles.

El tamaño medio de los hidrogeles de pectina es mayor cuando comparado con el tamaño medio de los hidrogeles de alginato.

Altos valores de adsorción de proteína presentan los hidrogeles de pectina. Así mismo, el aumento de proteína en solución incrementó la cantidad de proteína adsorbida independientemente del tipo de hidrogel. El incremento de proteína adsorbida disminuye el porcentaje de humedad en hidrogeles de pectina y aumenta el contenido de materia seca.

La cantidad de proteína solubilizada en el ambiente gástrico desde hidrogeles recubiertos, hace que los hidrogeles de pectina sean adecuados para vehículos de liberación a nivel intestinal. Por lo que, todos los sistemas estudiados, independiente del tipo de hidrogel o de la fuente proteica, mostraron alta solubilidad al término de la simulación intestinal.

La microscopia óptica evidencia la resistencia física de los hidrogeles de pectina y alginato recubiertos frente a condiciones gástricas, por consiguiente cuando estos son trasladados a condiciones gástricas los hidrogeles de pectina se desintegran completamente, sin embargo los hidrogeles de alginato se muestran aparentemente íntegros.

Ambas matrices son vehículos de transporte de activos para aplicaciones alimenticias y farmacológicas. El sitio de liberación de estos activos dependerá del tipo de polisacárido empleado para producir hidrogeles, siendo hidrogeles de pectina adecuados para liberación en el ambiente del intestino delgado, en cambio los hidrogeles de alginato para liberación en el ambiente del intestino grueso.

## **5.2. Recomendaciones.**

En trabajos futuros utilizar otros métodos de encapsulación adecuados para materiales hidrofílicos así como, vitamina C extraído de matrices amazónicas.

Desarrollar investigaciones utilizando la técnica de gelificación iónica para recuperar nutrientes de alto valor biológico como las proteínas del suero de la leche.

Conocer el lugar de adsorción del bioactivo a encapsular, puesto que tal característica determinará el tipo de matriz que será utilizada para la producción de hidrogeles.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., Ahn, D. U. (2013). Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents—A review. *Poultry Science*, 92(12), 3292-3299.
- Abouelatta, S. M., Aboelwafa, A. A., Khalil, R. M., El-Gazayerly, O. N. (2015). Utilization of ionotropic gelation technique for bioavailability enhancement of cinnarizine: In-vitro optimization and in-vivo performance in human. *Drug Delivery*, 1–11.
- Agüero Luztonó, L. (2016). Hidrogeles sensibles al pH como alternativa al mejoramiento del tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(3), 284-293.
- Alencastre, J. B., Bentley, M. V. L. B., Garcia, F. S., Moragas, M. D., Viladot, J. L., Marchetti, J. M. (2006). A study of the characteristics and in vitro permeation properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(1), 69-76.
- Allan-Wojtas, P., Truelstrup Hansen, L., Paulson, A. T. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *LWT - Food Science and Technology*, 41 (1), 101-108.
- Al-Tahami, K., Singh, J. (2007). Smart polymer based delivery systems for peptides and proteins. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 1(1), 65-71.
- Andresen, I. L., Skipnes, O., Smidsrød, O., Ostgaard, K., Hemmer, P. C. (1977). Some biological functions of matrix components in benthic algae in relation to their chemistry and the composition of seawater.
- Annan, N. T., Borza, A. D., Hansen, L. T. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, 41(2), 184-193.

- AOAC. (2012). Association of Official analytical Chemists. Official Methods of Analytical Chemists of Association Chemistry.
- Ashford, M., Fell, J., Attwood, D., Sharma, H., Woodhead, P. (1993). An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to the colon. *Journal of Controlled Release*, 26(3), 213-220.
- Badarinath, A. V., Reddy, J. R. K., Rao, K. M., Alagusundaram, M., Gnanaprakash, K., & Chetty, C. M. S. (2010). Formulation and characterization of alginate microbeads of flurbiprofen by ionotropic gelation technique. *International Journal of ChemTech Research*, 2(1), 361-367.
- Bae, T. Y., Park, K. Y., Kim, D. H., Suh, K. D. (2001). Poly (ethylene terephthalate)/polypropylene reactive blends through isocyanate functional group. *Journal of applied polymer science*, 81(5), 1056-1062.
- Basit, A., Bloor, J. (2003). Perspectives on colonic drug delivery, *Business briefing. Pharmaceutical Technology*, 185-190.
- Becker, A. L., Henzler, K., Welsch, N., Ballauff, M., Borisov, O. (2012). Proteins and polyelectrolytes: A charged relationship. *Current opinion in colloid & interface science*, 17(2), 90-96.
- Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry*, 204, 77-83.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical and Physiology*, 37(8), p. 911-917.
- Braccini, I., Pérez, S. (2001). Molecular basis of Ca<sup>2+</sup>-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2(4), 1089-1096.
- Brazel, C. S. (1999). Microencapsulation: Offering solutions of the food industry. *Cereal Foods World*, 44(6): 388-393.
- Bremer, M. G., Duval, J., Norde, W., Lyklema, J. (2004). Electrostatic interactions between immunoglobulin (IgG) molecules and a charged

- sorbent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 250(1), 29-42.
- Brownlee, I. A., Seal, C. J., Wilcox, M., Dettmar, P. W., Pearson, J. P. (2009). Applications of alginates in food. In *Alginates: Biology and applications* (pp. 211-228). Springer Berlin Heidelberg.
- Buddington, R. (2009). Using probiotics and prebiotics to manage the gastrointestinal tract ecosystem. In D. Charalampopoulos, R. A. Rastall (Eds.), *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* (pp. 1–31). New York: Springer Science+Business Media.
- Bürger, A., Magdans, U., Gies, H. (2013). Adsorption of amino acids on the magnetite-(111)-surface: a force field study. *Journal of molecular modeling*, 19(2), 851-857.
- Bussemer, T., Otto, I., Bodmeier, R. (2001). Pulsatile drug-delivery systems. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 18(5).
- Campos, E., Branquinho, J., Carreira, A. S., Carvalho, A., Coimbra, P., Ferreira, P., y Gil, M. H. (2013). Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *European Polymer Journal*, 49(8), 2005-2021.
- Carbajal Azcona, A. (2006). Calidad nutricional de los huevos y relación con la salud. *Revista de Nutrición práctica*, (10), 73-76.
- Chan, E. S. (2011). Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers*, 84, 1267–1275.
- Chan, L. W., Lim, L. T., Heng, P. W. S. (2000). Microencapsulation of oils using sodium alginate. *Journal of microencapsulation*, 17(6), 757-766.
- Chang, C. P., Dobashi, T. (2003). Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32(3), 257-262.
- Coppi, G., Iannuccelli, V., Leo, E., Bernabei, M. T., Cameroni, R. (2001). Chitosanalginate microparticles as a protein carrier. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(5), 393e400.

- Cordova, K. A., Tello, F., Bierhalz, A. C., Romo, M. G. G., Flores, H. E. M., Grosso, C. R. (2015). Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. *Journal of Food Engineering*, 154, 17-24.
- Corstens, M. N., Berton-Carabin, C. C., De Vries, R., Troost, F. J., Masclee, A. A., Schroën, K. (2017). Food-grade micro-encapsulation systems that may induce satiety via delayed lipolysis: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(10), 2218-2244.
- Cottrell, I. W., Kovacs, P. (1980). Alginates. In: *Handbook of water-soluble gums and resins*. H. B. Crawford and J. Williams (Eds.), Mc Graw-Hill, Auckland, 21-43.
- Cummings, J. H., Englyst, H. N. (1987). Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 45(5), 1243-1255.
- Dagleish, D. G., Euston, S. E., Hunt, J. A., Dickinson, E. (1991). Competitive adsorption of  $\beta$ -lactoglobulin in mixed protein emulsions, In: *Food polymers, gels and colloids*. E. Dickinson (Ed.). Dorset Press, Dorchester, 485 – 489.
- Demanèche, S., Chapel, J. P., Monrozier, L. J., Quiquampoix, H. (2009). Dissimilar pH-dependent adsorption features of bovine serum albumin and  $\alpha$ -chymotrypsin on mica probed by AFM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 70(2), 226-231.
- Dragan, E. S. (2014). Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chemical Engineering Journal*, 243, 572-590.
- Draget, K. I., Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 251-256.
- Drusch, S., Berg, S. (2008). Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chemistry*, 109(1), 17-24.

- Duarte, R. T, Carvalho Simoes, M. C, Sgarbieri, V. C. (1999). Bovine blood components: fractionation, composition, and nutritive value. *J agric Food Chem* 47(1): 236-6.
- Dziezak, J. D. (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, 42, 136-159.
- Eghbal, N., Choudhary, R. (2017). Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *LWT-Food Science and Technology*.
- Espin, J. C., García-Conesa, M. T., Tomas-Barberan, F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2986-3008.
- Evans, D. F., Pye, G., Bramley, R., Clark, A. G., Dyson, T. J., Hardcastle, J. D. (1988). Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut*, 29(8), 1035-1041.
- Gebara, C., Chaves, K. S., Ribeiro, M. C. E., Souza, F. N., Grosso, C. R. F., Gigante, M. L. (2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 51(2), 872-878.
- George, M., Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan d a review. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 1 – 14.
- Gibbs, B. F.; Kermasha, S.; Alli, I.; Muligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213-224.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Ress, D. A., Smith, P. J. C., Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letter*, 32(1), 195-198.
- Guilherme, M. R., Reis, A. V., Paulino, A. T., Moia, T. A., Mattoso, L. H., Tambourgi, E. B. (2010). Pectin-based polymer hydrogel as a carrier for release of agricultural nutrients and removal of heavy metals from wastewater. *Journal of applied polymer science*, 117(6), 3146-3154.
- Harris, D. C. (2001). Análisis químico cuantitativo. Capítulo 6. Pags. 133-134.

- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae a review. *Food Chemistry*, 98(1), 136-148.
- Hoare, T. R., Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. *Polymer*, 49(8), 1993-2007.
- Höök, F., Rodahl, M., Brzezinski, P., Kasemo, B. (1998). Energy dissipation kinetics for protein and antibody- antigen adsorption under shear oscillation on a quartz crystal microbalance. *Langmuir*, 14(4), 729-734.
- Hsieh, Y. H. P., Ofori, J. A. (2011). Blood-derived products for human consumption. *Revelation and Science*, 1(01).
- Huang, Q. R., Yu, H. L., Ru, Q.M. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of food Science*, 75(1), R50-R57.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12.
- Hurrell, R.; Reddy, M. B.; Dassenko, A.; Cook, J. D.; Shepherd, D. (1991). Ferrous fumarate fortification of chocolate drink powder. *Br. J. Nutr.*, 65, 271-283.
- Jackson, L. S.; Lee, K. (1991). Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel Wissenschaft. Technologic Food Science & Technology*, 24, 289-297.
- Jones, O. G.; McClements, D.J. (2010). Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9, 374- 397.
- Kamath, K. R., Park, K. (1993). Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11(1-2), 59-84.
- Kheireddin, B., Zhang, M., Akbulut, M. (2013). Adhesion, friction and lubrication of polymeric nanoparticles and their application. In: *Polymer adhesion friction and lubrication*. H. Zeng (Ed.). John Wiley & Sons Inc., New York, 617-657.

- King, A. (1988). Flavor encapsulation with alginates. In: Flavor encapsulation (ed. por S. Risch and G. Reyneccius), 122-125. ACS Symposium Series 370, American Chemical Society, Washington D.C.
- Kovacs-Nolan, J., Phillips, M., Mine, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(22), 8421-8431
- Kruif, C. G., Weinbreck, F. Y., Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 340-349.
- Kuang, S. S., Oliveira, J. C., & Crean, A. M. (2010). Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(10).
- Lee, K. Y., Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126.
- Lee, S. C., Kwon, I. K., Park, K. (2013). Hydrogels for delivery of bioactive agents: a historical perspective. *Advanced drug delivery reviews*, 65(1), 17-20.
- Lei, J., Kim, J. H., Jeon, Y. S. (2008). Preparation and properties of alginate/polyaspartate composite hydrogels. *Macromolecular research*, 16(1), 45-50.
- Leong, J.-Y., Lam, W.-H., Ho, K.-W., Voo, W.-P., Lee, M. F.-X., Lim, H.-P., Chan, E.-S. (2016). Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology*, 24, 44–60.
- Lin, Y. H., Liang, H. F., Chung, C. K., Chen, M. C., Sung, H. W. (2005). Physically crosslinked alginate/N, O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials*, 26(14), 2105-2113.
- Liu, J., Shim, Y. Y., Wang, Y., Reaney, M. J. T. (2015). Intermolecular interaction and complex coacervation between bovine serum albumin

- and gum from whole flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Hydrocolloids*, 49, 95–103.
- Liu, L., Fishman, M. L., Hicks, K. B. (2007). Pectin in controlled drug delivery—a review. *Cellulose*, 14(1), 15-24.
- Liu, X. Q., Yonekura, M., Tsutsumi, M. Y., Yoh Sano, Y. (1996). Physicochemical Properties of Aggregates of Globin Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (10), 295
- Lynch, S. A., Mullen, A. M., O'Neill, E. E., García, C. Á. (2017). Harnessing the Potential of Blood Proteins as Functional Ingredients: A Review of the State of the Art in Blood Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 330-344.
- Madene, A., J. Scher, and S. Desobry. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology* 4(1):1-21, 2006.
- Mahdavinia, G. R., Etemadi, H. (2016). Surface modification of iron oxide nanoparticles with j-arrageenan/carboxymethyl chitosan for effective adsorption of bovine serum albumin. *Arabian Journal of Chemistry*. In Press, Corrected Proof.
- Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O. (1989). Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(1), 79-89.
- Martinsen, A., Storrø, I., Skjåk-Bræk, G. (1992). Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(2), 186-194.
- McClements D. J. (2017). Recent progress in hydrogel delivery systems for improving. *Food Hydrocolloids*, 68, 238 – 245.
- McClements D. J., Decker, E. A., Park, Y., Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in food Science and Nutrition*, 49(6), 577-606.



- McClements, D. J., Xiao, H., Demokritou, P. (2017). Physicochemical and colloidal aspects of food matrix effects on gastrointestinal fate of ingested inorganic nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 246, 165-180.
- Mestdagh, M. M.; Axelos, M. S. V. (1998). Physico-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes. *Biopolymer Science: Food and Non-food Applications*, Montpellier, 303-314.
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 225-232.
- Mine, Y., Shahidi, F. (2006). *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*. Y. Mine and F. Shahidi (Ed.). CRC Press, Boca Raton, 688
- Montes, E. J., De Paula, C. D., Ortega, F. A. (2007). Artículos Científicos Determinación De Las Condiciones Óptimas De Encapsulamiento Por Cocrystalización De Jugo De Maracuyá (*Passiflora edulis*). *Temas Agrarios*, 12(1).
- Mozzi, F., Gerbino, E., Font De Valdez, G., Torino, M. I. (2009). Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an in vitro gastric system. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 56-64.
- Nogueira, N. N.; Colli, C., Cozzolino, S. M. F. (1992). Iron Deficiency Anemia Control in Pre-School Children by Food Fortification with Bovine Hemoglobin (Preliminary Study). *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro.
- Patil, J.S.; Kamalapur, M.V.; Marapur, S.D.; Kadam, D.V. (2010) Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(1), 241 – 248.
- Paulo, F., Santos, L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering*, C 77, 1327–1340.

- Pérez, S., Mazeau, K., du Penhoat, C. H. (2000). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signalling. *Plant Physiol Biochem*, 38(1/2), 37-55.
- Pérez-Moral, N., González, M. C., & Parker, R. (2013). Preparation of iron-loaded alginate gel beads and their release characteristics under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 31(1), 114-120.
- Philip, A. K., Philip, B. (2010). Colon targeted drug delivery systems: a review on primary and novel approaches. *Oman medical journal*, 25(2), 79.
- Powrie, W. D., Nakai, S. (1986). The Chemistry of Eggs and Egg Products- Chapter 6. In *Egg science and technology* (pp. 97-139). AVI Publishing Company, Inc. properties of blood globin prepared by a new method. *J Food Sci*, 49(3), 859–62.
- Pszczola, D. E. (1998). Encapsulated ingredients: providing the right fit. *Food Technology*, 52(12), 70 - 77.
- Pugnaloni, L. A., Dickinson, E., Ettelaie, R., Mackie, A. R., Wilde, P. J. (2004). Competitive adsorption of proteins and low molecular-weight surfactants: computer simulation and microscopic imaging, *Advances in Colloid and Interface Science*, 107(1), 27- 49.
- Rahman, Z., Kohli, K., Khar, R. K., Ali, M., Charoo, N. A., Shamsheer, A. A. (2006). Characterization of 5-fluorouracil microspheres for colonic delivery. *AAPS Pharm Sci Tech*, 7, 47-58.
- Ralet, M. C., Dronnet, V., Buchholt, H. C., Thibault, J. F. (2001). Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research*, 336(2), 117-125.
- Ramsden, J. J. (1995). Puzzles and paradoxes in protein adsorption. *Chemical Society Reviews*, 24, 73 - 78.
- Rayment, P., Wright, P., Hoad, C., Ciampi, E., Haydock, D., Gowland, P., Butler, M. F. (2009). Investigation of alginate beads for gastro-intestinal

- functionality, Part 1: In vitro characterisation. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 816-822.
- Ré. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16(6), 1195 - 1236.
- Ribeiro, R.; Fica, P.; Santos, S.; Ferreira De Lima, S. (2006). Biscoito enriquecido com proteína e ferro, subproduto da CPBC. Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Rubinstein, A. (1990). Microbially controlled drug delivery to the colon. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 11(6), 465-475.
- Rubinstein, A. (1995). Approaches and opportunities in colon-specific drug delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 12(2-3).
- Rutz, J. K., Borges, C. D., Zambiasi, R. C., da Rosa, C. G., & da Silva, M. M. (2016). Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. *Food chemistry*, 202, 324-333.
- Scheline, R. R. (1973). Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacological reviews*, 25(4), 451-523.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(8), 689-753.
- Sezer, A. D.; Akbuga, J. (1999). Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. *Journal of Microencapsulation*, 16(2), 195-203.
- Shahidi, F.; Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical reviews in food science and nutrition*, 33(6), 501-547.
- Silva, D. F., Favaro-Trindade, C. S., Rocha, G. A., Thomazini, M. (2012). Microencapsulation of lycopene by gelatin–pectin complex coacervation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(2), 185-190.
- Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). Development of microencapsulation delivery

system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. BioMed Research International, 2013.

- Soliman, E.A., El-Moghazy, A.Y., El-Din, M.S., Massoud, M.A. (2013). Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and in vitro evaluation of antifungal activity. *J. Enc. Adsorption Sci.* 3, 48–55.
- Stadelman, W. J., and O. J. Cotterill. (2001). *Egg Science and Technology*. 4th ed. Avi Publ. Co., Westport, CT.
- Strasdat, B., Bunjes, H. (2013). Incorporation of lipid nanoparticles into calcium alginate beads and characterization of the encapsulated particles by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 567-575.
- Ström, A., Boers, H. M., Koppert, R., Melnikov, S. M., Wiseman, S., Peters, H. P. F. (2009). Physico-chemical properties of hydrocolloids determine their appetite effects. In: *Gums and stabilizers for the food industry*. P. A. Williams and G. O. Phillips (Eds.), 15, 341-355.
- Sultana, K., Golward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Pieris, P., 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*, 62(1), 447–55.
- Taneja, A., Singh, H. (2012). Challenges for the delivery of long-chain n-3 fatty acids in functional foods. *Annual review of food science and technology*, 3, 105-123.
- Tarte, R. (2011). Meat protein ingredients In: Phillips GO, Williams PA, editors. *Handbook of food proteins*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. p 56–91.
- Tello, F., Falfan-Cortés, R. N., Martínez-Bustos, F., da Silva, V. M., Hubinger, M. D., Grosso, C. (2015). Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. *Food Hydrocolloids*, 43, 670-678.

- Thies, C. (1996). A survey of Microencapsulation processes. In: Microencapsulation. (Ed. por S. Benita), pp. 1-20. Marcel Dekker, Inc. N.Y., EUA.
- Thorne, J. B., Vine, G. J., Snowden, M. J. (2011). Microgel applications and commercial considerations. *Colloid and Polymer Science*, 289(5-6), 625.
- Thu, B.; Smidsrod, P.; G.; Skjak-Braek, G. (1996). Alginate gels - Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. *Immobilized Cells: Basics and Applications*.
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., Adhikari, B. (2016). Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *International journal of biological macromolecules*, 91, 347-357.
- Tripp, B. C., Magda, J. J., Andrade, J. D. (1995). Adsorption of globular proteins at the air/water interface as measured via dynamic surface tension: concentration dependence, mass-transfer considerations, and adsorption kinetics *J. Colloid Interface Sci.* 173 16–27)
- Tybor, P. T., Dill, C. W., Landmann, W. A. (1973). Effect of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spraydried blood protein concentrates. *Journal of Food Science*, 38(1), 4-6.
- Valenta, C. (2005). The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 57(11), 1692-1712.
- Velikov, K. P., Pelan, E. (2008). Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter*, 4(10), 1964-1980.
- Viteri, F. E., Álvarez, E., Batres, R., Torun, B., Pineda, O., Mejía, L. A., & Sylvi, J. (1995). Fortification of sugar with iron sodium ethylenediaminetetraacetate (FeNaEDTA) improves iron status in semirural Guatemalan populations. *The American journal of clinical nutrition*, 61(5), 1153-1163.
- Walter, T., Hertrampf, E., Pizarro, F., Olivares, M., Llaguno, S., Letelier, A., et al., (1993). Effect of bovine-hemoglobinfortified cookies on iron status of

- schoolchildren: a nationwide program in Chile. *Am J Clin Nutr*, 2(57), 190-194.
- Wichchukit, M. H., Oztop, M. H., McCarthy, M. J., McCarthy, K. L. (2013). Whey protein/alginate beads as carries of a bioactive component. *Food Hydrocolloids*, 33, 66–73.
- Wildman, R. E. C., Kelley. M. (2007). Nutraceuticals and functional foods. In R.E.C Wildman (Ed.), *Handbook of nutraceuticals and functional foods*, 2nd edition (1-22). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Willats, W. G., Knox, J. P., Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97-104.
- Wongsasulak, S., Patapeejumruswong, M., WeisS, J., Supaphol, P., Yoovidhya, T. (2010). Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 370-376.
- Wu, J., Li, X., Yan, Y., Hu, Y., Zhang, Y., Tang, Y. (2013). Protein adsorption onto nanozeolite: Effect of micropore openings. *Journal of Colloid and Interface Science*, 406, 130–138.
- Yañez, J., J. Salazar, L. Chaires, J. Jimenez, M. Marquez y E. Ramos. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Revista Avance y Perspectiva* 21: 313-319.
- Ye, A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(3), 406-415.
- Young, S., X. Sarda and M. Rosenberg (1992). Microencapsulating properties of whey proteins with carbohydrates. *Journal Dairy Science* 76(10): 2878-2885.
- Zhang, Z., Dalgleish, D. G., Goff, H. D. (2004). Effect of pH and ionic strength on competitive protein adsorption to air/water interfaces in aqueous foams made with mixed milk proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34(2), 113-121.