



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA TEMÁTICA EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**ADSORCIÓN DE PROTEÍNA EN HIDROGELES DE
ALGINATO PECTINA**

TESIS

Que presenta:

I.B.Q. KARLA CÓRDOVA AGUILAR

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Asesor: D.I. Ma. Guadalupe Garnica Romo

Morelia, Mich. 2013

Febrero 2013

CONTENIDO

Resumen	X
Abstract	XI
Lista de tablas	VI
Lista de figuras	VII
Nomenclatura	IX
Agradecimientos	XII

Capítulo I. Introducción

1.1	Hipótesis	3
1.2	Objetivos	4
1.2.1	Objetivo General	4
1.2.2	Objetivos Específicos	4

Capítulo II. Marco teórico

2.1	Métodos de encapsulación	5
2.1.1	Gelificación iónica	5
2.1.2	Interacción electrostática	6
2.2	Agente encapsulante	7
2.2.1	Alginato	8

2.2.2	Pectina	10
2.2.3	Ovoalbúmina	11
2.2.4	Proteínas de suero de leche (WPC siglas en inglés)	12
2.3	Métodos de Caracterización	
2.3.1	Potencial Zeta	13
2.3.2	Microscopía óptica	15
2.3.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM siglas en inglés)	15
2.3.4	Distribución de tamaño de partícula por difracción laser	16

Capítulo III. Metodología

3.1	Materiales	17
3.2	Métodos	17
3.2.1	Caracterización de los biopolímeros	17
3.2.2	Carga electrostática en solución	18
3.2.3	Mezcla de soluciones de alginato-pectina y soluciones de proteína para la producción de coacervados	18
3.2.4	Mezcla de la emulsión (alginato-pectina /aceite de girasol) y soluciones proteicas	19
3.2.5	Producción de microcápsulas por gelificación iónica	19
3.2.6	Interacción electrostática entre microcápsulas de gelificación iónica y soluciones de proteína	20
3.2.7	Producción de microcápsulas para determinar la adsorción	20

	de proteína sobre la superficie de las microcápsulas de gelificación iónica	
3.2.8	Caracterización de las microcápsulas obtenidas por gelificación iónica, recubiertas con proteína	
3.2.8.1	Microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido	21
3.2.8.2	Tamaño medio de las microcápsulas	22
3.2.8.3	Composición centesimal	22
3.2.8.4	Capacidad de Hinchamiento	22
3.2.8.5	Evaluación de la solubilidad de la proteína absorbida en las microcápsulas, simulando condiciones gastrointestinales	23
3.2.9	Análisis Estadístico	23

Capítulo IV. Resultados

4.1	Caracterización de los biopolímeros	24
4.2	Carga electrostática en solución	24
4.3	Mezcla de soluciones de alginato-pectina y soluciones de proteína para la producción de coacervados	26
4.3.1	Mezcla de la emulsión (alginato-pectina /aceite de girasol) y soluciones proteicas	29
4.4	Interacción electrostática entre microcápsulas de gelificación iónica y soluciones de proteína	33
4.5	Determinación de la adsorción de proteína sobre la superficie de las microcápsulas de gelificación iónica	35

4.6	Caracterización de las microcápsulas obtenidas por gelificación iónica, recubiertas con proteína	
4.6.1	Microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido	37
4.6.2	Tamaño medio de las microcápsulas	45
4.6.3	Composición centesimal	46
4.6.4	Capacidad de Hinchamiento	46
4.6.5	Evaluación de la solubilidad de la proteína absorbida en las microcápsulas, simulando condiciones gastrointestinales	51
	Capítulo V. Conclusiones	53
	Bibliografía	55
	Anexo I	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 4.1	Contenido de proteína (base seca) de las microcápsulas producidas por gelificación iónica recubiertas con ovoalbúmina y con WPC por interacción electrostática.	35
Tabla 4.2	Tamaño de las microcápsulas producidas por gelificación iónica recubiertas con ovoalbúmina y con WPC por interacción electrostática.	45
Tabla 4.3	Contenido de humedad de las microcápsulas producidas por gelificación iónica recubiertas con ovoalbúmina y con WPC por interacción electrostática.	46
Tabla 4.4	Tamaño en (μm) de las microcápsulas recubiertas al 3% de proteína, liofilizadas y rehidratadas con agua a diferentes valores de pH.	47
Tabla 4.5	Solubilidad media (%) de microcápsulas recubiertas con 3% de proteína en solución, después de 2 horas de simulación gástrica.	51

LISTA DE FIGURAS

Fig. 2.1	Representación esquemática de la gelificación iónica.	6
Fig. 2.2	Unidades monoméricas del ácido algínico.	9
Fig. 2.3	Bloques MM.	9
Fig. 2.4	Bloques GG.	10
Fig. 2.5	Representación esquemática del potencial zeta. (Extraído de “Zeta Potential: An introduction in 30 minutes” Malvern Instruments).	14
Fig. 4.1	Potencial zeta de las soluciones de biopolímeros.	24
Fig. 4.2	Potencial zeta de la emulsión alginato/pectina-aceite de girasol al 0.2%.	26
Fig. 4.3	Proporciones de alginato/pectina (0.2%) – Ovoalbúmina (0.2%) en diferentes valores de pH, con sus valores promedio de potencial zeta.	27
Fig. 4.4	Proporciones de alginato/pectina (0.2%) – WPC (0.2%) medidos en diferentes valores de pH, con sus valores promedio de potencial zeta.	28
Fig. 4.5	Proporciones vs valores de potencial zeta, alginato/pectina (0.2%) – OVO (0.2%) y pH 3.5.	29
Fig. 4.6	Proporciones de solución y de emulsión para OVO pH 3.5, 0.2%. Con sus valores promedio de potencial zeta.	30
Fig. 4.7	Proporciones vs potencial zeta, alginato/pectina (0.2%) – WPC (0.2%) y pH 3.75.	31
Fig. 4.8	Proporciones de solución y de emulsión para WPC pH 3.75, 0.2%. Con sus valores promedio de potencial zeta.	31
Fig. 4.9	Selección de la relación en volumen para producción de microcápsulas recubiertas con ovoalbúmina (en pH 3.5) y con WPC (en pH 3.75).	33
Fig. 4.10	Microscopía óptica de microcápsulas de gelificación	38

	iónica.	
Fig. 4.11	Microscopía óptica de microcápsulas recubiertas con Ovoalbúmina.	39
Fig. 4.12	Microscopía óptica de microcápsulas recubiertas con WPC.	41
Fig. 4.13	Microscopía electrónica de barrido de microcápsulas de GI.	42
Fig. 4.14	Microscopía electrónica de barrido de microcápsulas recubiertas con OVO.	43
Fig. 4.15	Microscopía electrónica de barrido de microcápsulas recubiertas con WPC.	44
Fig. 4.16	Microcápsulas recubiertas con WPC 3%, liofilizadas y rehidratadas.	49
Fig. 4.17	Microcápsulas recubiertas con OVO 3%, liofilizadas y rehidratadas.	50

NOMENCLATURA

G	Ácido α -D-gulurónico
GI	Gelificación Iónica
M	Ácido 1,4- β -D-manurónico
PI	Punto Isoeléctrico
Pka	Constante de disociación
OVO	Ovoalbúmina
WPC	Concentrado proteico de suero de leche (Whey Protein Concentrate)
w/w	Relación peso/peso

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue producir y evaluar microcápsulas de alginato-pectina obtenidas por gelificación iónica y posteriormente recubiertas con dos diferentes proteínas, ovoalbúmina y/o WPC (concentrado proteico de suero de leche). Se midió el potencial zeta de una serie de soluciones de alginato-pectina, proteína y mezclas de polisacáridos con proteínas, a diferentes valores de pH para identificar la mejor relación de microcápsulas de alginato-pectina: solución de proteína, que permitiera una adecuada interacción electrostática entre las microcápsulas y soluciones de proteína. El efecto de diferentes concentraciones de proteína en solución sobre la adsorción de proteína en la superficie de las microcápsulas de alginato-pectina fue evaluado. La morfología de las microcápsulas fue determinada así como el tamaño medio a diferentes valores de pH. La solubilidad proteica de microcápsulas liofilizadas sometidas a condiciones *in vitro* gastrointestinales (pH, temperatura y enzimas) fue evaluada. La carga negativa en la superficie de las microcápsulas de alginato-pectina permitió la adsorción de proteína por interacción electrostática, y la mayor adsorción fue observada en microcápsulas recubiertas con WPC (concentrado proteico de suero de leche) (46.08 % - base seca) comparado con microcápsulas cubiertas con ovoalbúmina (33.12 % - base seca) cuando fue usado el 3% de proteína en solución.

Las proteínas absorbidas en la superficie de las microcápsulas fueron altamente solubilizadas bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal a valores de pH 1.2 y 3 (>40%).

ABSTRACT

The objective of this study was to produce and evaluate pectin-alginate particles obtained by ionic gelation and coated with two different proteins, ovalbumin and WPC (whey protein concentrate of milk). The zeta potential of a series of solutions of alginate-pectin, protein and mixtures of polysaccharides with protein, was evaluated at different pH values to identify the best pectin-alginate particles/protein solution ratio that allows a better electrostatic interaction between particles and protein solutions. The effect of different concentrations of protein in solution on protein adsorption on the surface of particles of alginate-pectin was evaluated. The morphology of the particles was determined as the average size at different pH values. The protein solubility of lyophilized particles subjected to *in vitro* gastrointestinal conditions (pH, temperature and enzyme) was evaluated. The negative charge on the surface of the alginate-pectin particles allowed the protein adsorption by electrostatic interaction, and increased adsorption was observed in coated particles WPC (whey protein concentrate of milk) (46.08% - dry basis) compared with the particle coated with ovalbumin (33.12% - dry basis) was used as 3% of protein in solution.

The proteins absorbed on the surface of the particles were highly solubilized under simulated gastrointestinal tract at a pH of 1.2 and 3 (>40%).

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Carlos y Obdulia por todo su apoyo y amor siempre. A mis hermanos por alentarme a enfrentar nuevos retos y animarme a cada momento. A mis asesores la Dra. María Guadalupe Garnica y el Dr. Héctor Martínez por darme la oportunidad de trabajar con ellos, por su orientación, buenos consejos y amistad. Al Dr. Carlos Grosso por recibirme en su laboratorio en el Departamento de Alimentos y Nutrición la FEA/UNICAMP y permitirme vivir una de las mejores experiencias de mi vida. A Gi, Jo, Talita, por su amistad, buenos momentos y por todo lo que me enseñaron. A Yara y Fernando por su apoyo en el laboratorio. A Norma, minha mãe brasileira por su amistad y excelente sazón. A mis elementales campeoncitos por estar conmigo siempre. A Karasu, por enseñarme que hay que tener miedo sólo del miedo. A Ricks por ser un excelente compañero y amigo. A Ginis por los vales y por estar ahí sin importar la distancia. A Don Dani por alentarme a creer en mí. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo y beca otorgados para la realización de este trabajo. Y a todos aquellos que de alguna manera contribuyeron a conseguir este logro. Dios Proveyó.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La microencapsulación es la tecnología mediante la cual un material o una mezcla de materiales se aísla o protege dentro de otro material. El material protegido se denomina material activo o núcleo, y el material de revestimiento se denomina pared, cargador o encapsulante. La microencapsulación describe diferentes procesos para proteger un componente activo contra condiciones adversas al medio como luz, pH, oxígeno evaporación o lixiviación (Madene *et al.*, 2006).

La habilidad de polímeros, como almidones, maltodextrinas, jarabes de maíz, gomas de acacia, para enlazar es complementada por su diversidad, bajo costo y amplio uso en alimentos y los hace una excelente elección para ser usados como agentes encapsulantes (Dziezak, 1988). Además, estos materiales presentan propiedades de baja viscosidad, alto contenido de sólidos y solubilidad alta, características deseables en un agente de encapsulante. Los hidrocoloides alimenticios son ampliamente usados como microencapsulantes, tales como las proteínas de suero de leche, y proteínas aisladas de soya (Kim y Morr, 1996), éstas poseen excelentes propiedades funcionales como solubilidad, viscosidad y emulsificación, lo que las hace capaces de ser usadas como encapsulantes.

Diversos métodos han sido propuestos para la producción de microcápsulas. En general, estos métodos pueden ser divididos en: 1) Procesos físicos secado por aspersion, extrusión, aspersion por enfriamiento y lecho fluidizado; 2) Procesos químicos coacervación simple o compleja, atrapamiento en liposomas, co-cristalización, polimerización interfacial e inclusión molecular (Yañez, *et al.*, 2002).

La selección del proceso de encapsulación para una aplicación considera el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (Madene *et al.*, 2006).

Una de las técnicas de microencapsulación donde biopolímeros como pectina y alginato son utilizados es la gelificación iónica. Ésta es una técnica simple y suave, donde las

microcápsulas son producidas por goteo de una solución polimérica sobre una solución catiónica, por lo general calcio, en agitación constante (Silva *et al.*, 2006; Schoubben *et al.*, 2010). Una de las características de las microcápsulas de gelificación iónica es la porosidad de la matriz que permite la difusión de compuestos de bajo peso molecular (Ovodov, 2009). La resistencia mecánica y la permeabilidad de las microcápsulas pueden ser mejoradas mediante la adición de otro polielectrolito de carga opuesta sobre la superficie de las mismas (Patil *et al.*, 2010; Humblet-hua *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se produjeron microcápsulas por gelificación iónica, que contengan aceite de girasol, utilizando una mezcla de alginato/pectina y recubrirlas por interacción electrostática con soluciones proteicas ya sea de ovoalbúmina o de proteína de suero de leche (WPC) y se evaluaron los efectos de la interacción entre los biopolímeros en la adsorción de proteína en la superficie de las cápsulas.

1.1 HIPÓTESIS

Al utilizar la mezcla de polisacáridos alginato-pectina para formar matrices que contengan aceite de girasol, se pueden lograr mejores adsorciones de proteína en su superficie, que si se producen matrices hechas de un sólo material, gracias a la interacción sinérgica de ambos polisacáridos. El uso de proteínas globulares como la ovoalbúmina y las proteínas de suero de leche (WPC) para el recubrimiento de las matrices, debido a sus características funcionales, disponibilidad y bajo costo representan opciones viables para ser utilizadas como agentes de recubrimiento en la producción de microcápsulas para proteger activos de interés en la industria de los alimentos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Producir microcápsulas por gelificación iónica utilizando una mezcla de alginato/pectina para emulsificar aceite de girasol, y recubrirlas por interacción electrostática con soluciones proteicas de ovoalbúmina y/o concentrado proteico de suero de leche (WPC) para evaluar los efectos de la interacción entre los biopolímeros en la adsorción de proteína en las matrices de alginato/pectina.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar el comportamiento de la mezcla alginato/pectina por medidas de potencial zeta, a diferentes valores de pH.
2. Caracterizar la ovoalbúmina y las proteínas de suero de leche (WPC) en relación a su punto isoeléctrico con el uso del potencial zeta.
3. Producción de microcápsulas por gelificación iónica.
4. Efectuar el recubrimiento de las microcápsulas producidas por gelificación iónica con diferentes concentraciones de proteína (tanto ovoalbúmina como WPC).
5. Caracterizar las microcápsulas obtenidas por gelificación iónica y posterior interacción electrostática, en cuanto a la distribución de tamaño y morfología.
6. Evaluar la adsorción de proteína (tanto ovoalbúmina como WPC) en la superficie de las microcápsulas obtenidas.
7. Evaluar la solubilidad de la proteína absorbida en las microcápsulas (tanto ovoalbúmina como WPC), simulando condiciones gastrointestinales.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

El desarrollo de productos microencapsulados se inició en 1950 con la investigación de recubrimientos sensibles a la presión para la fabricación de papel carbón (Green y Scheicher, 1955). La tecnología de encapsulación está ahora bien desarrollada y aceptada dentro de la industria farmacéutica, química, alimenticia, cosmética, y de impresión (Augustin *et al.*, 2001). Productos alimenticios, grasas, aceites, compuestos aromáticos, oleorresinas, vitaminas, minerales, colorantes, y enzimas han sido encapsulados (Dziezak, 1988). El proceso de encapsulación de componentes sensibles consiste en dos pasos: el primero es a menudo la emulsificación del material activo con una solución densa de un material pared como un polisacárido o una proteína. El segundo paso es el secado o enfriamiento de las emulsiones.

2.1 Métodos de encapsulación

2.1.1 Gelificación iónica

La gelificación iónica es una técnica en la que microcápsulas son producidas por goteo de una solución polimérica en una solución catiónica, normalmente calcio, sobre agitación constante (Schoubben *et al.*, 2010). La solución polimérica que contiene el activo es goteada sobre una solución iónica en concentraciones adecuadas pudiéndose obtener cápsulas de diferentes formas y tamaños. La técnica se basa en la habilidad de varios hidrocoloides de formar geles en presencia de iones, normalmente cationes divalentes. La interacción de iones como el calcio, con los grupos carboxilos de las cadenas poliméricas de los polisacáridos resulta en la formación de geles insolubles. Por lo tanto a la adición gota a gota de una dispersión de polisacárido conteniendo el material a ser encapsulado sobre una solución de iones, lleva a la formación de microcápsulas, (Figura 2.1). Las gotas al entrar en contacto con los iones forman instantáneamente estructuras de gel conteniendo el material a ser encapsulado disperso por toda la matriz de polisacárido (Smrdel *et al.*, 2008).

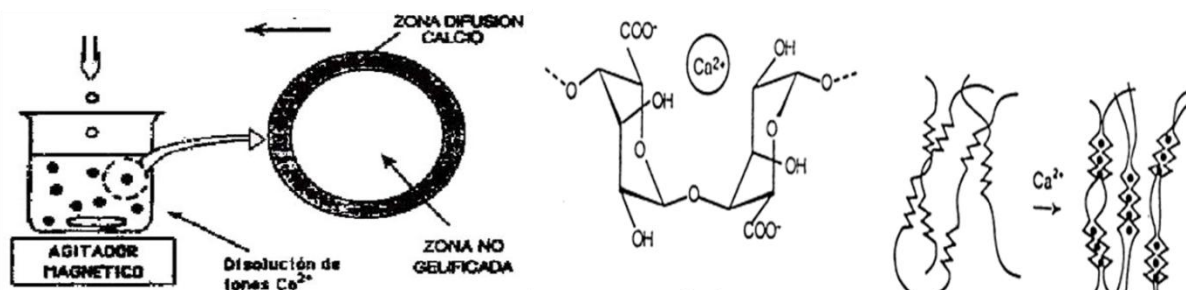


Figura 2.1 Representación esquemática de la gelificación iónica. (Zambon *et al.*, 2002)

2.1.2 Interacción electrostática

Una alternativa para mejorar la protección de las microcápsulas y aumentar su estabilidad es el recubrimiento de microcápsulas de gelificación iónica con biopolímeros a través de interacciones electrostáticas. Las interacciones electrostáticas ocurren entre biopolímeros de cargas opuestas que interactúan entre sí. La carga eléctrica de un catión (quitosana o proteínas suero de leche) o un anión (alginato, carragenina o pectina) depende del pH de la solución en relación a los valores de pKa (constante de disociación) o pI (punto isoeléctrico) de los grupos ionizables (Jones y McClements, 2010).

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos desempeñan un papel importante para la estructura y la estabilidad de los alimentos. El control y la manipulación de estas interacciones macromoleculares son esenciales para el desarrollo de nuevos productos y procesos en la industria alimentaria (Ye, 2008).

Las proteínas tienen carga neta negativa por encima del punto isoeléctrico (pI) y carga neta positiva por debajo de su pI. Los polisacáridos aniónicos tienen carga negativa máxima a valores de pH muy por encima del pKa, pero pierden progresivamente esa carga a medida que el pH se reduce (Jones *et al.*, 2010).

La aplicación de una capa protectora exterior sobre microcápsulas para actuar como una barrera protectora más allá de la barrera física ha sido estudiada durante algunos años (Teoh *et al.*, 2011). Diversos materiales se pueden ser utilizados para el recubrimiento de

microcápsulas y tanto las características de la matriz como las de la partícula a revestir deben ser estudiadas. La quitosana, proteínas de suero de leche (especialmente β -lactoglobulina), poli-L-lisina, la caseína y lactoferrina son algunos de los materiales utilizados en el recubrimiento de microcápsulas (Gbassi *et al.*, 2009; Bengoechea *et al.*, 2011). Microcápsulas de alginato y pectina han sido recubiertas por policonexiones (como quitosana y proteínas de suero de leche), que forman una membrana en la superficie de las microcápsulas y retardan la liberación del activo (Humblet-Hua *et al.*, 2011).

La adsorción de proteínas depende de las características físico-químicas de las superficies y puede variar en cantidad, densidad, configuración y orientación. El tiempo y la concentración, son también factores que pueden afectar a la adsorción (Roach *et al.*, 2005). La interacción electrostática en microcápsulas puede ser controlada por la variación de las cargas superficiales y puede ser determinada por el potencial zeta de las microcápsulas. Factores tales como el pH y concentración de electrolitos en solución tiene un fuerte impacto en la fuerza y el tipo de cargas electrostáticas sobre la adsorción en superficie (Patil *et al.*, 2007).

Además de las interacciones electrostáticas otros enlaces también están involucrados en el proceso de adsorción de proteínas en la superficie de microcápsulas, tales como puentes de hidrógeno, interacciones de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Asker *et al.*, 2011; Thorne, *et al.*, 2011).

2.2 Agente encapsulante

La eficiencia de encapsulación es particularmente dependiente de los resultados del agente encapsulante, el cual debe tener las siguientes funciones: proteger a los componentes activo o núcleo de la oxidación, la luz, la humedad y el contacto con sustancias en el almacenamiento, prolongar la vida de almacenamiento; evitar la pérdida de componentes volátiles, obtener un producto final fácil de manejar (King *et al.*, 1976). Pueden cumplir con estas funciones agentes encapsulantes que tienen propiedades emulsionantes, que facilitan la formación de la película de interés, que poseen una viscosidad baja a altas concentraciones de sólidos, tienen una baja higroscopicidad, son económicos, de sabor agradable y fáciles de obtener. A veces el material de encapsulación por sí solo no incluye

todas estas propiedades, por lo que en la práctica, existe el uso de combinaciones de materiales encapsulantes y/o modificadores.

Por lo general se utilizan hidrocoloides como agentes encapsulantes, como la gelatina, gomas vegetales, almidones modificados y proteínas (Shahidi y Han, 1993). En un intento por obtener un buen material pared, los investigadores recurren a las mezclas o composiciones de diversos materiales para tratar de obtener el material "ideal". Rosenberg *et al.* (1985) observaron que para lograr la protección de los ingredientes microencapsulados es necesario tomar la decisión correcta de material pared y técnica de encapsulado para un determinado material a cubrir, además de la comprensión de cómo el material está organizado y como protege las microesferas, también es importante entender los efectos de las condiciones ambientales sobre la estructura y el comportamiento del sistema microencapsulado.

2.2.1 Alginato

Los alginatos se han convertido en una familia de polisacáridos extremadamente importante debido a su utilidad en la preparación de hidrogeles a pH y temperatura moderados aptos para biomoléculas sensibles como proteínas y ácidos nucleicos, e incluso para las células vivas (Pawar y Edgar, 2012).

El alginato es un polisacárido no-tóxico, biodegradable, de origen natural obtenido a partir de algas pardas marinas y ciertas especies de bacterias. El alginato de sodio es una sal sódica del ácido algínico un polisacárido natural y un polímero lineal compuesto de residuos de ácido 1,4- β -D-manurónico (M) y ácido α -D-gulurónico (G) en arreglos y proporciones variadas. Es soluble en agua y forma una estructura reticulada que puede ser ligada con cationes divalentes o polivalentes para formar una malla insoluble. Cationes de calcio y zinc han sido reportados por ligar los grupos ácidos del alginato. Su característica única para la formación de geles insolubles a través de la gelificación inotrópica con iones de calcio es una condición simple que ha hecho posible encapsular agentes bioactivos macromoleculares como células, enzimas, proteínas y vacunas. (Patil *et al.* 2010)

El alginato es un polielectrolito cargado negativamente por arriba del pH correspondiente al pKa (pH = 3.38 a 3.65) y pH bajo disociación de grupos carboxilo se suprime (Simsek- Ege *et al.*, 2003).

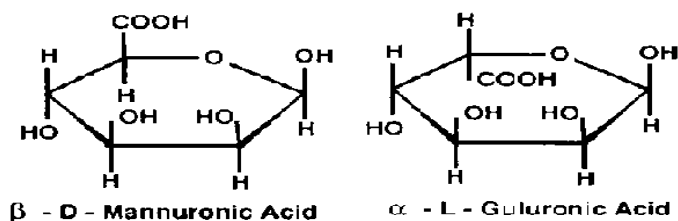


Figura 2.2 Unidades monoméricas del ácido alginico

La gran variedad de aplicaciones de estos productos se basa en su propiedad hidrocoloide y en su reactividad frente al calcio, ambas como consecuencia de su geometría molecular: Ha sido demostrado que la cadena polimérica que constituye el ácido alginico y sus sales se compone de tres tipos de regiones o bloques: Los bloques G contienen solo unidades derivadas del ácido L-gulurónico; los M se basan enteramente en ácido D-manurónico (Figura 2.2); y las regiones MG, que consisten en unidades alternadas de ambos ácidos.

En las figuras 2.3 y 2.4 se muestran las configuraciones espaciales que adoptan los bloques M y G debido a los diferentes enlaces glucosídicos entre los carbonos C-1 y C-4 de las unidades monoméricas. Las regiones de bloques M corresponden a cadenas lineales, mientras que los bloques G presentan una estructura en forma de bucle.

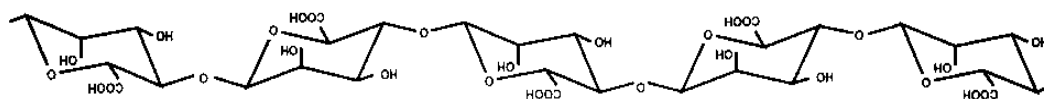


Figura 2.3 Bloques MM

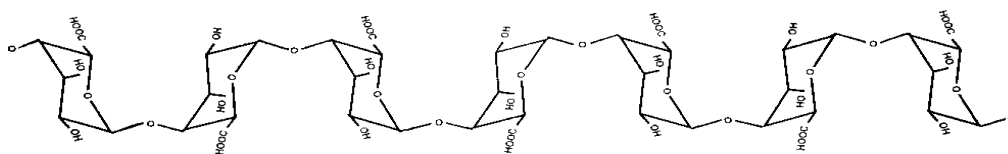


Figura 2.4 Bloques GG

Cuando dos cadenas de bloques G se alinean lado a lado resulta una zona en forma de diamante, la cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ión calcio, formándose una red. Este modelo fue propuesto por Grant en 1973 ("egg-box") para explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas. Lo importante es destacar que, según los porcentajes de regiones de bloques G y M, que varían en las distintas especies de algas, serán las características de los geles de alginatos.

2.2.2 Pectina

La pectina es un ingrediente de alto valor alimenticio funcional ampliamente utilizada como agente gelificante y estabilizante. Es también un abundante, componente ubicuo y multifuncional de las paredes celulares de todas las plantas terrestres (Willats *et al.*, 2006).

Los principales hidrocoloides gelificantes son alginato, pectina, carragenina, gelatina y agar (Saha y Bhattacharya, 2010). De entre ellos destaca la pectina, extraída principalmente de cáscara de cítricos y pulpa de manzana (Srivastava y Malviya, 2011).

Sus propiedades gelificantes varían en dependencia de los materiales y los factores ambientales (Lopes da Silva y Rao, 2006). Entre los parámetros del material, el número de grupos carboxilo metoxilados (grado de metoxilación DM) y su distribución en el esqueleto del ácido poligalacturónico (DB) son muy importantes (Fraeye *et al.*, 2010). Los materiales con DM mayores al 50% se conocen como pectinas de alto metoxilo (HMP) y aquellos con DM menores al 50% como pectinas de bajo metoxilo (LMP). El típico DM para uso comercial es de aproximadamente 60-77 % de HMP y 25-40% de LMP. En los procesos de

gelificación pectica, los factores ambientales más importantes son el pH, Ca^{+2} y sólidos solubles (azúcar por ejemplo). Las pectinas de alto metoxilo (HMP) forman geles en presencia de más de 55% de sólidos solubles (principalmente alrededor del 65% de azúcar) y a pH inferior a 3.5. Su mecanismo de gelificación se explica como una combinación de interacciones hidrofóbicas, favorecida por temperaturas más altas, y puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo no disociados. Las pectinas poco metoxiladas (LMP) gelifican en presencia de Ca^{+2} , formando zonas de unión intermolecular iónicas entre las regiones próximas de las cadenas (Kastner *et al.*, 2012).

Hay una creciente demanda de estabilizantes con nuevas características para productos alimenticios. Las mezclas sinérgicas de geles son de particular interés, desde que el sinergismo puede conducir a una microestructura totalmente diferente a la de un gel de un material puro y así afectar la textura que podría mejorar la calidad del producto. Las mezclas sinérgicas de geles también pueden ser un beneficio económico desde que han mostrado una mejora en las propiedades reológicas, lo que se traduce en una reducción de costos durante la manufactura y las hace más deseables en la industria. Es adscrita una asociación heterogénea de los bloques poligurónicos del alginato y las regiones metil éster de la pectina aglomerándose juntas en bandas rígidas. Además de la naturaleza del alginato y la pectina, la fuerza del gel es influenciada por otros factores como la concentración, la proporción de hidrocoloides, iones presentes y pH. La comparación de la microestructura del gel de pectina pura mostró que la red de pectina está compuesta de hilos más finos y poros más pequeños que la red de la mezcla con alginato (Walkenstrom *et al.*, 2003).

2.2.3 Ovoalbúmina

La ovoalbúmina es la proteína principal en la clara de huevo y fue una de las primeras proteínas aislada en forma pura, ésta presenta estructura globular y es ampliamente usada en la industria de los alimentos por su habilidad espumante, su capacidad de retención de agua, capacidad emulsificante y formación de geles por calentamiento (Huntington y Stein, 2001).

Esta molécula es una fosfoglicoproteína monomérica con un peso molecular de aproximadamente 45 kDa. La secuencia completa de aminoácidos de la ovoalbúmina de gallina comprende 385 residuos, de acuerdo con Nisbet *et al.*, (1981). Cada molécula tiene un puente disulfuro interno y cuatro grupos sulfhidrilos libres, su punto isoeléctrico (pI) es 4.8 (Oakenfull *et al.*, 1997).

La ovoalbúmina es una proteína alimentaria altamente funcional frecuentemente usada en diseños de matrices alimentarias. Ha sido elegida como acarreador para la liberación de fármacos debido a su disponibilidad y bajo costo, comparada con otras proteínas. Sin embargo la ovoalbúmina exhibe muchas funcionalidades como su habilidad para formar redes de gel y estabilización de emulsiones y espumas. Debido a su pH y a sus propiedades sensitivas a la temperatura, tiene un alto potencial para su uso como acarreador para la liberación controlada (Ahmad *et al.*, 2011).

2.2.4 Proteínas de suero de leche (WPC)

El suero, es un subproducto de la fabricación de queso y manufactura de caseína en la industria láctea, representa alrededor del 20% (w/w) de la proteína total de la leche. El suero es una mezcla compleja de moléculas de proteínas globulares que comprende β -lactoglobulina (~50% peso/peso), α -lactoalbúmina (~20% peso/peso), inmunoglobulinas (~10% peso/peso), y otras proteínas menores o componentes peptídicos incluyendo lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima y factores de crecimiento. La proteína de suero de leche es un polvo comercial con un alto contenido proteico (mayor al 90% peso/peso) generalmente fabricado por cromatografía de intercambio iónico o microfiltración, seguido por secado por pulverización, un método industrial bien establecido para la conversión de materiales de líquidos a polvo seco (Onwulata y Qi, 2011).

En relación con su conformación química las proteínas de suero de leche presentan una estructura globular con grupos hidrofóbicos localizados en el interior de la estructura, conteniendo algunos enlaces disulfuro (Zhou *et al.*, 2008). Proteínas del suero de leche como la β -lactoglobulina tienen un pI de aproximadamente 4.6 (Fox y Kelly, 2003).

Las proteínas del suero manifiestan propiedades funcionales deseadas en un material pared. En el mercado internacional, las proteínas del suero están disponibles como

aislados de proteína e suero (95-96% de proteína) o concentrados de proteína (WPC) en polvo. Las proteínas del suero en combinación con carbohidratos se han utilizado como acarreadores en encapsulación de componentes volátiles. En tales sistemas, las proteínas del suero funcionaron como emulsionante y como agente formador de película, mientras que los carbohidratos actuaron como formadores de matriz. La β -lactoglobulina es la más importante proteína de suero y posee interesantes propiedades emulsionantes y espumantes, es ampliamente utilizada en el industria de los alimentos (Madene *et al.*, 2006).

2.3 Métodos de Caracterización

2.3.1 Potencial Zeta

El potencial zeta es una medida de la interacción electrostática o bien la repulsión o atracción entre las partículas y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe afectan la estabilidad. Su medida aporta una visión detallada de las causas de la dispersión, la agregación o floculación, y se puede aplicar para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones.

El potencial zeta es uno de los parámetros fundamentales que controla la interacción de partículas en suspensión. Cuando las partículas con carga se aproximan entre ellas, el que se repelan depende del equilibrio entre las fuerzas de atracción experimentadas en todos los cuerpos, y de las fuerzas de repulsión determinadas por la magnitud del potencial en la capa de deslizamiento. Este es el potencial a una corta distancia de la superficie en donde las moléculas del dispersante se mueven con respecto a las moléculas en el límite de la superficie (Malvern Instruments, 2012).

Cuando una superficie sólida está en contacto con una solución acuosa, la formación de una carga interfacial causa el rearrreglo de los iones libres locales en la solución para producir una región muy delgada de densidad de carga neta diferente de cero que está cercana a la interfase. El arreglo de cargas en la interfase sólido-líquido y el balance de los iones de carga contraria a la superficie sólida es lo que se refiere a la doble capa eléctrica. Existe una capa delgada de iones libres de carga contraria inmediatamente al lado de la partícula con carga superficial, llamada capa compacta (véase figura 2.5). Los iones en la capa compacta están inmóviles debido a las atracciones electrostáticas tan fuertes. Los

iones que están afuera de la capa compacta pueden moverse. Esta parte de la doble capa eléctrica se llama capa difusa. El potencial zeta (ζ) es el potencial electrostático que divide dicha doble capa y la capa difusa. El factor más importante que afecta el potencial zeta es el pH. Suponiendo que una partícula en suspensión tienen una carga negativa, si se agrega más álcali a la suspensión, entonces la molécula tenderá a adquirir una carga más negativa. En cambio, si se añade ácido a la solución entonces se alcanzará un punto en el que la carga se neutralizará (punto isoelectrico) y si se sigue agregando el ácido entonces la carga será positiva. Cabe mencionar que es en el punto isoelectrico en el que los sistemas coloidales son menos estables. Este parámetro es importante para varias aplicaciones, que incluye la estabilidad de emulsiones, caracterización de biopolímeros, transporte electrocinético de partículas, células sanguíneas, eficiencia de membranas, entre otras (Sze *et al.*, 2003).

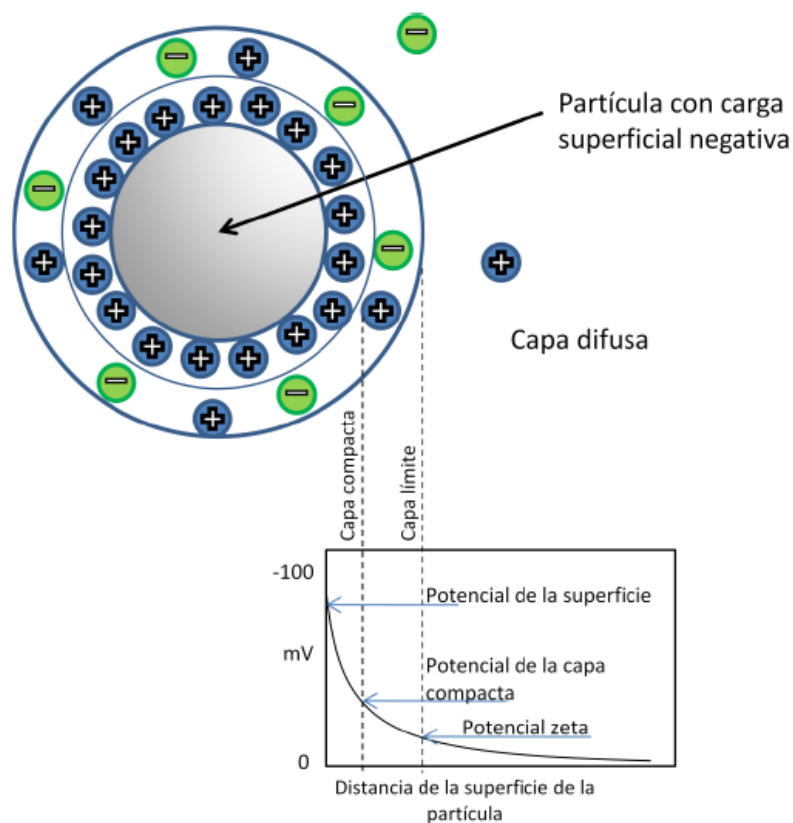


Figura 2.5 Representación esquemática del potencial zeta. (Extraído de “Zeta Potential: An introduction in 30 minutes” Malvern Instruments).

2.3.2 Microscopía óptica

Un microscopio óptico es un microscopio basado en lentes ópticos. También se le conoce como microscopio de luz, (que utiliza luz o "fotones") o microscopio de campo claro. El desarrollo de este aparato suele asociarse con los trabajos de Anton van Leeuwenhoek. Los microscopios de Leeuwenhoek constaban de una única lente pequeña y convexa, montada sobre una plancha, con un mecanismo para sujetar el material que se iba a examinar (la muestra o espécimen). Este uso de una única lente convexa se conoce como microscopio simple, en el que se incluye la lupa, entre otros aparatos ópticos. Las partes esenciales de cualquier sistema de iluminación son la fuente de luz y el sistema condensador. El condensador es necesario para recoger la luz que diverge desde la fuente y dirigirla hacia un área pequeña del objeto que va a ser examinado. Esto sirve para hacer el objeto más brillante de forma que se pueda ver más fácilmente (aumento del contraste), y también hace posible controlar el ángulo con el cual la luz llega al objeto (Albella *et al.*, 1993).

El microscopio es un instrumento óptico que amplifica la imagen de un objeto pequeño. Mediante un sistema de lentes y fuentes de iluminación se puede hacer visible un objeto microscópico. Los microscopios pueden aumentar de 100 a cientos de miles de veces el tamaño original. Existen dos tipos de microscopios: el óptico, en cual el aumento del objeto se consigue usando un sistema de lentes que manipula el paso de los rayos de luz entre el objeto y los ojos; el electrónico, utiliza un rayo de electrones controlado por un campo magnético (Ayala, 2009).

2.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM siglas en inglés)

El microscopio electrónico de barrido emplea un haz de electrones para iluminar la muestra, lentes condensadoras y un sistema de vacío para producir imágenes para estudiar la superficie de la muestra (Albella *et al.*, 1993). Es técnica constituye una de las más

empleadas para el análisis de superficies, gracias a que proporciona una imagen visual tridimensional, el análisis cualitativo es relativamente directo (Sperling, 2006).

Para obtener la imagen por microscopía electrónica, la superficie de una muestra sólida es barrida según un modelo raster con un haz de electrones muy fino. Un raster es un modelo de barrido similar al utilizado en un tubo de rayos catódicos en el que un haz de electrones barre la superficie en línea recta, vuelve a la posición inicial y después es desplazado hacia abajo a una distancia establecida. Este proceso se repite hasta que el área deseada de la superficie ha sido barrida. Al barrer la superficie con una pistola de electrones de energía elevada se producen diversos tipos de señales. Estas señales incluyen electrones retrodispersados y secundarios, además fluorescencia de rayos X y otros fotones de diversas energías. El microscopio electrónico de barrido forma la imagen con los electrones secundarios que se generan en la interacción de la radiación electrónica con una capa superficial y fina de la muestra mediante un proceso de rastreo y los electrones reflejados son atraídos por un detector que proporciona las imágenes topográficas (Skoog, 1995).

2.3.4 Distribución de tamaño de partícula por difracción laser

La técnica de difracción de láser se basa en el principio de que las microcápsulas que pasan a través de un rayo láser dispersarán la luz en un ángulo que está directamente relacionado con su tamaño: las microcápsulas grandes dispersarán en ángulos pequeños, mientras que las microcápsulas pequeñas dispersarán la luz en ángulos grandes.

Con la suposición de que la morfología de la partícula es esférica. Los rangos de tamaño medible van de 50 nm a 1000 μm . En la práctica, se coloca la muestra a analizar en una suspensión acuosa, ésta se mueve continuamente a través de un circuito cerrado que dispone de una ventana transparente en el punto de intersección con el haz láser. Se hace incidir la luz láser sobre la muestra y en un detector multicanal, se observa el patrón intensidad originado por la interacción luz-muestra y que serán función del tamaño de la partícula que lo produjo (Malvern Instruments, 2012).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Materiales

Los materiales utilizados fueron, alginato de sodio tipo Manugel DMB (alto contenido de grupos gulurónicos) lote: G3512301, donado por FCM Biopolymer; Pectina GENU de bajo metoxilo amidada (CP Kelco, Limeira-SP, Brasil); Concentrado proteico de suero de leche (Lacprodan - Arla Foods Ingredientes, Argentina, lote: 80 4A12701; Clara de huevo pasteurizada y deshidratada (ovoalbúmina) donado por Salto's Alimentos Ltda (Distrito Industrial Parque do Lago - SP, Brasil); cloruro de calcio anhidro (Dinamarca, Diadema – SP, Brasil, PM 110,99, lote 36308); ácido clorhídrico fumigante al 37% (Merck, Alemania); hidróxido de sodio al 50% (Nuclear, PM: 40, Diadema – SP- Brasil); ácido sulfúrico (Synth, PM: 98,08, Diadema-SP, Brasil); aceite de girasol comercial comestible, agua destilada y desionizada fue utilizada para la preparación de las soluciones, los demás reactivos fueron de grado analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterización de los biopolímeros

El concentrado proteico de suero de leche (WPC) y la ovoalbúmina fueron caracterizadas en relación al grado de proteína y humedad de acuerdo con la metodología de la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC, 2005). Se utilizó la metodología de Kjeldahl para la determinación de nitrógeno total adoptando un valor de 6.38 como factor de conversión de nitrógeno para el caso de WPC y 6.68 para el caso de la ovoalbúmina. Fue determinado el contenido de nitrógeno en la mezcla de alginato-pectina para que este pudiera ser descontado durante el cálculo del contenido de proteína adsorbida en las microcápsulas.

3.2.2 Carga electrostática en solución

Se determinó inicialmente la carga electrostática en solución a través del potencial zeta de una solución de alginato-pectina al 0.2% en un rango de pH de 3 a 7 utilizando ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) 0.2 N para el ajuste de pH. Se realizó lo mismo para soluciones de proteína, tanto ovoalbúmina como WPC al 0.2% (w/w).

Posteriormente se evaluó el potencial zeta de la emulsión de alginato-pectina con aceite vegetal comestible en una concentración del 50 % respecto a los sólidos totales; utilizando un agitador Turrax a 14 000 rpm/3min (IKA, RJ., Brasil). Todas las determinaciones del potencial zeta se realizaron en un modelo Zetasizer nano-Z (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, U.K.). Todos los análisis se realizaron por triplicado con tres lecturas independientes para cada muestra.

3.2.3 Mezcla de soluciones de alginato-pectina y soluciones de proteína para la producción de coacervados

Fueron preparadas mezclas entre soluciones de alginato-pectina y soluciones de proteína (ovoalbúmina y WPC de manera independiente), variando la cantidad de proteína en relación a la de polisacáridos.

Se eligieron tres diferentes valores de pH (3.2, 3.5 y 4) para examinar la interacción entre la mezcla de polisacáridos (alginato-pectina) y una solución de proteína ovoalbúmina al 0.2% (w/w) en diferentes proporciones volumétricas (mezcla-proteína). De la misma forma se eligieron los valores de pH (3.5, 3.75 y 4) para examinar la interacción entre la mezcla de polisacáridos y una solución de WPC al 0.2% (w/w) en diferentes proporciones en volumen (mezcla-proteína) para encontrar aquel pH y aquella proporción, donde existiera una separación clara de fases, una carga en el sistema próxima de cero y una mayor cantidad de coacervados formados. Las mezclas permanecieron en reposo durante 12 horas para la posterior determinación de la interacción electrostática mediante el potencial zeta y, tamaño utilizando un equipo Malvern Mastersizer 2000/2000E Reino Unido. Las series fueron preparadas por triplicado realizando tres lecturas consecutivas de cada muestra.

3.2.4 Mezcla de la emulsión (alginato-pectina /aceite de girasol) y soluciones proteicas

Se determinó la interacción electrostática y tamaño de los coacervados resultantes de la mezcla de emulsión y solución de Ovoalbúmina al 0.2% (w/w) en las siguientes proporciones; 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:19 y 1:20 a un pH de 3.5. Se realizaron los mismos análisis para los coacervados de la mezcla de emulsión y solución de WPC al 0.2% (w/w) en las siguientes proporciones; 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:19 y 1:20 a un pH de 3.75. Las series fueron preparadas por triplicado realizando tres lecturas consecutivas de cada muestra.

3.2.5 Producción de microcápsulas por gelificación iónica

Fueron preparadas soluciones acuosas de alginato-pectina al 2% (w/w), donde fue incorporado aceite vegetal comestible (50 % w/w respecto a los sólidos totales), para preparar una emulsión en un agitador Turrax a 14000 rpm / 3 min (IKA, RJ., Brasil). La emulsión fue atomizada en una solución de cloruro de calcio 2% (w/w) con un pH ajustado a 3.5 para aquellas microcápsulas que se recubrieron con ovoalbúmina y pH 3.75 para aquellas recubiertas con WPC, en agitación constante.

Para esto, fue utilizado un atomizador de doble fluido de 1mm de diámetro a una altura de 12 centímetros entre el pico del atomizador y la solución de cloruro de calcio, a una presión de aire de 0.125 kgf/cm², siendo la emulsión alimentada a una velocidad de 555ml /hora a través de una bomba peristáltica, de acuerdo con (Mukai-Correa *et. al.*, 2004).

Después de la atomización, las microcápsulas fueron mantenidas durante 30 minutos en la solución de cloruro de calcio. Posteriormente, fueron escurridas en tamices de acero inoxidable, de diámetro de 125 µm, y se mantuvieron durante 5 minutos en agua desionizada a pH ajustado (3.5 o 3.75) para posteriormente ser tamizadas y lavadas con agua a pH ajustado.

3.2.6 Interacción electrostática entre microcápsulas de gelificación iónica y soluciones de proteína

Fueron producidas microcápsulas de gelificación iónica conforme a lo descrito en el punto 3.2.4. Las microcápsulas fueron suspendidas en agua a pH (3.5 o 3.75 según fuera el caso) para obtener una concentración de 0.2% (w/w). Se prepararon soluciones de WPC y ovoalbúmina a una concentración de 0.2% (w/w). Las soluciones de proteína permanecieron 12 horas en agitación constante a temperatura ambiente hasta su total disolución, mientras que las microcápsulas de gelificación iónica fueron suspendidas en agua a pH ajustado en el momento de preparación de las mezclas. Fueron realizadas mezclas volumétricas entre la solución de microcápsulas de gelificación iónica y soluciones de proteína, utilizando las mismas relaciones entre los biopolímeros conforme a lo descrito en el punto 3.2.4. Los sistemas fueron mantenidos en agitación durante una hora en un homogenizador rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) después de este tiempo las mezclas permanecieron en reposo 12 horas para analizar su tamaño; la tendencia a sedimentar de los sistemas impidió la determinación de la carga electrostática mediante el potencial zeta en las mezclas. Las series fueron preparadas por triplicado con tres lecturas independientes para cada muestra. Las muestras fueron agitadas manualmente antes de cada determinación.

3.2.7 Producción de microcápsulas para determinar la adsorción de proteína sobre la superficie de las microcápsulas de gelificación iónica

Las microcápsulas de gelificación iónica (GI) fueron caracterizadas de acuerdo su contenido de humedad tanto a las hechas en pH 3.5 como en 3.75. Así como el contenido de lípidos por el método de Bligh-Dyer (1959). Conociendo el porcentaje de lípidos y humedad en 100 gramos de microcápsulas. Se calculó la proporción en masa (w/w) a partir de la proporción escogida en volumen, para las microcápsulas de GI producidas en ambos valores de pH. Y de esta manera a partir de dichas proporciones en masa, se produjeron microcápsulas de gelificación iónica por el método descrito en el punto 3.2.4 que fueron transferidas a soluciones de proteína, tanto de ovoalbúmina como de WPC, en diferentes

concentraciones (1.7%, 3% y 4%) con pH ajustado a 3.5 para las soluciones de ovoalbúmina y pH 3.75 para el caso de WPC en agitación constante durante 30 minutos. Después de la coacervación, las microcápsulas fueron tamizadas y lavadas con agua desionizada hasta que toda la proteína que no fuese adsorbida fue removida. Los contenidos de humedad y proteína adsorbida en las microcápsulas fueron determinados por triplicado.

3.2.8 Caracterización de las microcápsulas obtenidas por gelificación iónica, recubiertas con proteína

3.2.8.1 Microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido

La morfología de las microcápsulas húmedas fue observada en un microscopio óptico JENVAL, la captación de las imágenes fue realizada con la utilización del software EDN-2- Microscopy Image Processing System.

Las microcápsulas fueron secadas en un liofilizador Pirani Edwards 50, bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de secado: -40°C , la temperatura final: 25°C / 2 horas, el tiempo total del ciclo de secado: 48 horas y de presión: 0,1 mm Hg. condiciones establecidas por Mukai-Correa, 2003.

Dichas microcápsulas fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido (MEB). Las muestras fueron fijadas en “stubs” con cinta metálica de cobre doble cara y recubiertas con una fina capa de oro (180 segundos a una corriente de 40 mA) por medio de un evaporizador Baltzer (Baltec SCD50, Austria). Fue utilizado un microscopio electrónico de barrido modelo JMS-T300 Jeol, con una aceleración de voltaje de 20kV.

3.2.8.2 Tamaño medio de las microcápsulas

Se determinó el diámetro medio volumétrico de las microcápsulas húmedas utilizando un equipo Mastersizer 2000 (Malvern, Alemania). El equipo determina el tamaño de las microcápsulas por difracción de luz láser, el material dispersante usado para hacer las lecturas fue agua destilada y desionizada con pH ajustado a 3.5 o 3.75 según fuera el caso.

3.2.8.3 Composición centesimal

Las microcápsulas recubiertas con proteína en las distintas concentraciones fueron caracterizadas en relación al contenido de proteína y humedad, de acuerdo con la metodología descrita por la AOAC – Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 2005).

La humedad de las microcápsulas fue determinada gravimétricamente secando en estufa a temperatura de 105 °C, por 15 horas. El contenido de proteína presente en las microcápsulas fue determinado por el método Kjeldahl, con un factor de conversión de nitrógeno de 6.38 para WPC y 6.68 para la ovoalbúmina. El contenido de nitrógeno presente en la mezcla alginato-pectina utilizada en la producción de las microcápsulas fue determinado y descontado del nitrógeno total presente en las microcápsulas recubiertas.

3.2.8.4 Capacidad de Hinchamiento

Las microcápsulas recubiertas con 3% de proteína tanto de ovoalbúmina como de WPC, fueron liofilizadas bajo las condiciones ya mencionadas en el punto 3.2.6.1 y rehidratadas con agua a diferentes valores de pH (1.2, 7 y en aquel en el que fueron hechas 3.5 o 3.75). Aproximadamente 0.5 gramos de microcápsulas liofilizadas fueron hidratados con 12 mililitros de agua desionizada con pH ajustado. Las muestras fueron agitadas durante 2 minutos y posteriormente transferidas a un homogeneizador de soluciones rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil), donde permanecieron dos horas,

posteriormente el tamaño de las microcápsulas fue determinado en un equipo Mastersizer 2000 (Malvern, Alemania).

3.2.8.5 Evaluación de la solubilidad de la proteína absorbida en las microcápsulas, simulando condiciones gastrointestinales

Las microcápsulas recubiertas con 3% de proteína (ovoalbúmina y WPC de manera independiente) liofilizadas fueron utilizadas en la simulación de condiciones gastrointestinales. Los valores de pH gástrico utilizados fueron 1.2 y 3. En el caso de las microcápsulas recubiertas con ovoalbúmina se pesaron 0.82g y para las recubiertas con WPC 0.94g y 20 mL de jugo artificial gástrico con pH ajustado, fueron incubados a 37 °C en agitación durante 2 horas. Subsecuentemente, el pH fue ajustado a un valor de 7 con una solución NaHCO_3 (20% (w/w)), pancreatina fue agregada en una concentración de 1.95 g/L y nuevamente incubado por 5 horas. El jugo gástrico artificial fue una mezcla de 1.12 g/L de KCl, 2 g/L de NaCl, 0.11g/L de CaCl_2 , 0.4 g/L de KH_2PO_4 , 3.5 g/L de mucina y 0.26 g/L de pepsina, y HCl fue utilizado para ajustar el pH. Los valores de pH gástrico fue seleccionado en base a la literatura (Gbassi *et al.*, 2009). Después de 2 horas de incubación en un baño con jugo artificial gástrico, los tubos fueron transferidos a un baño con hielo e inmersos durante 15 minutos para inactivar las enzimas. Los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos, el método de Kjeldahl fue utilizado para cuantificar el contenido total de nitrógeno en el sobrenadante y un blanco conteniendo sólo jugo gástrico artificial para descontar el nitrógeno proveniente de las enzimas. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.2.9 Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre las medias para los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA y la prueba de Tukey con el programa SAS, con un nivel del 5% de significancia.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de los biopolímeros

El contenido de proteína encontrado en el concentrado proteico de suero de leche (WPC) fue de $73.3\% \pm 0.9$ y $6\% \pm 0.0$ de humedad. Los valores encontrados están dentro de los recomendados para concentrados de proteína (Barros y Tessaro, 2011). Los valores determinados para la ovoalbúmina fueron de $85.71\% \pm 1.6$ de proteína y $6.32\% \pm 0.5$ de humedad. En la mezcla de alginato-pectina se determinó un porcentaje de proteína del 0.35%.

4.2 Carga electrostática en solución

Se midió la carga electrostática en solución con el uso del potencial zeta de la solución de alginato-pectina al 0.2% en un rango de pH de 3 a 7 (ver Figura 4.1), así como para soluciones de proteína, tanto de ovoalbúmina como de WPC al 0.2% (w/w).

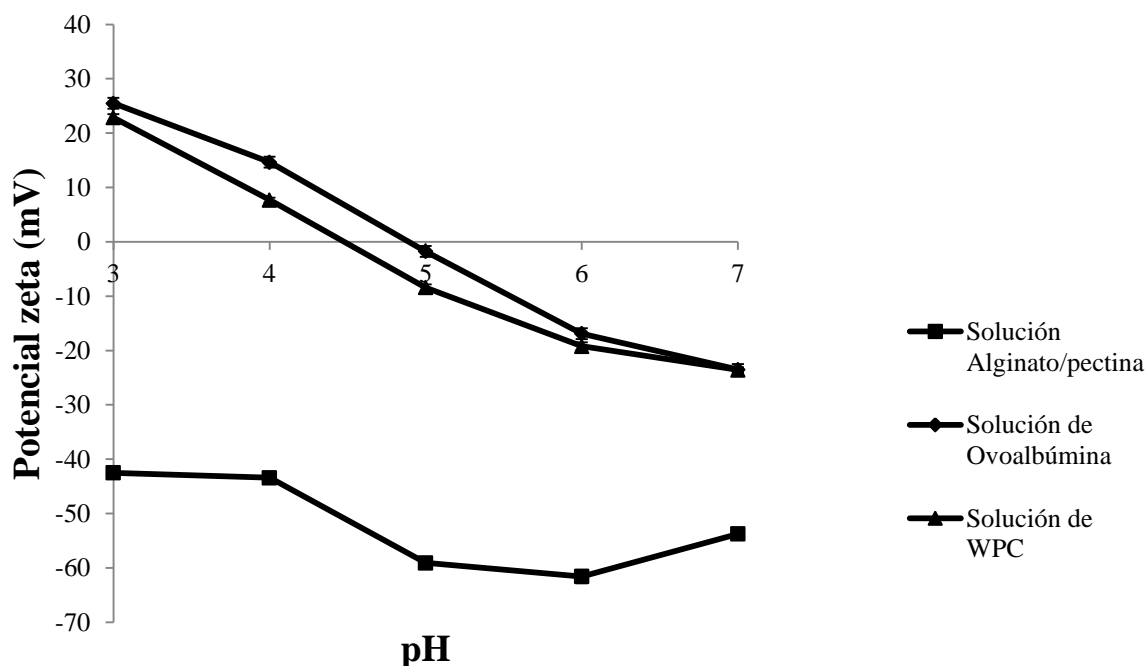


Figura 4.1. Potencial zeta de las soluciones de biopolímeros.

La solución conteniendo la mezcla de los polisacáridos alginato y pectina, presentó valores de potencial zeta negativos en todo el rango de pH estudiado, su electronegatividad aumentó conforme lo hizo el pH, desde -42.5 ± 0.99 mV (pH 3) a -61.59 mV (pH 6). Un estudio realizado por Opanasopit *et al.*, (2008) utilizando soluciones de pectina de bajo metoxilo amidada al 0.1%, reportaron valores de potencial zeta que variaban desde -4 hasta -54 mV, cuando el pH se cambió de 2 a 5.5, rango en el cual se encontró la mayor electronegatividad. Es posible que en nuestro estudio, debido al sinergismo con el alginato, se alcanzaran valores más electronegativos para el rango de pH analizado.

Las soluciones de proteína presentaron de manera general un comportamiento similar con ligeras variaciones. La solución de ovoalbúmina presentó valores de potencial zeta positivos en valores de pH de 3 y 4, volviéndose negativos a valores de pH superiores de 4.8 (su punto isoeléctrico) que concuerda con los valores reportados en la literatura (Oakenfull *et al.*, 1997). La solución de WPC presentó valores positivos de potencial zeta en pH de 3 y 4, y un punto isoeléctrico de 4.5. En un estudio realizado a una de las proteínas del suero de leche, la β -lactoglobulina, fue encontrado un valor de ≈ 4.6 para el punto isoeléctrico (Jones *et al.*, 2010), valor muy cercano al encontrado en este trabajo.

Las proteínas están cargadas positivamente en valores de pH por debajo de su punto isoeléctrico y negativamente por encima de dicho valor (Cooper *et al.*, 2005). El potencial zeta de las soluciones permite observar que para los biopolímeros utilizados es posible que ocurra una interacción electrostática entre la mezcla de polisacáridos y las proteínas consideradas a valores de pH por debajo de los puntos isoeléctricos de las mismas.

En la Figura 4.2 se observan los valores obtenidos a través del potencial zeta de la emulsión de alginato-pectina con aceite vegetal comestible en una concentración del 50 % respecto a los sólidos totales. Encontrándose valores negativos en todo el rango de pH estudiado, desde -39.89 ± 7.04 mV (pH 3) a -58.57 ± 3.28 mV (pH 7). El hecho de incorporar el aceite de girasol al sistema no altero la electronegatividad en todo el rango de pH estudiado.

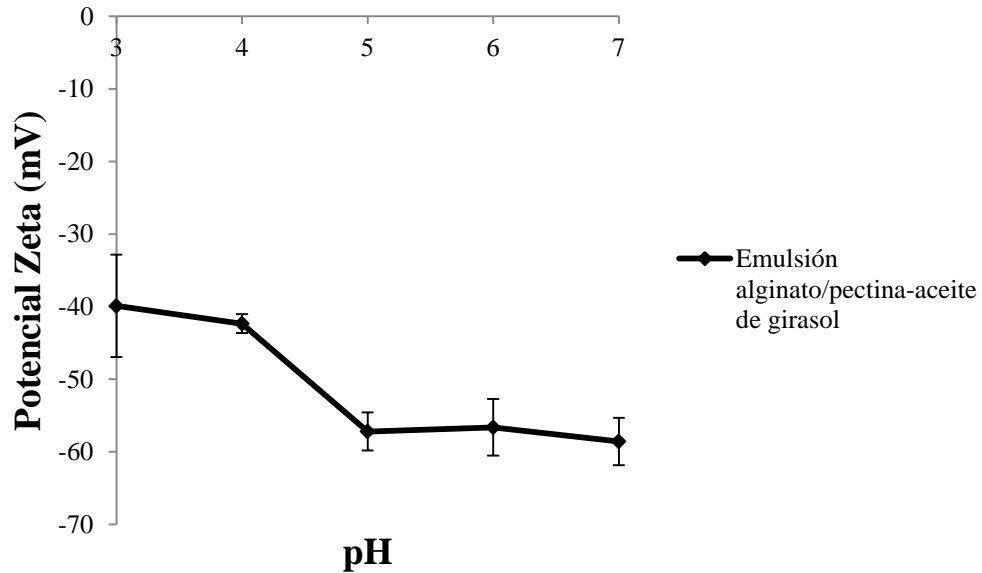


Figura 4.2. Potencial zeta de la emulsión alginato/pectina-aceite de girasol al 0.2%.

4.3 Mezcla de soluciones de alginato-pectina y soluciones de proteína para la producción de coacervados

En función de los resultados obtenidos fueron analizados tres diferentes valores de pH (3.2, 3.5 y 4), inferiores y próximos al pI de la ovoalbúmina, para examinar la interacción entre la mezcla de polisacáridos (alginato-pectina) y una solución de proteína ovoalbúmina al 0.2% w en diferentes proporciones volumétricas (mezcla-proteína). Fue posible observar la separación de fases de las mezclas conforme variaron las proporciones volumétricas. En la parte superior de la Figura 4.3 se tienen los valores de potencial zeta expresados en milivolts (mV) y en la parte inferior las relaciones volumétricas utilizadas (mezcla-ovoalbúmina).

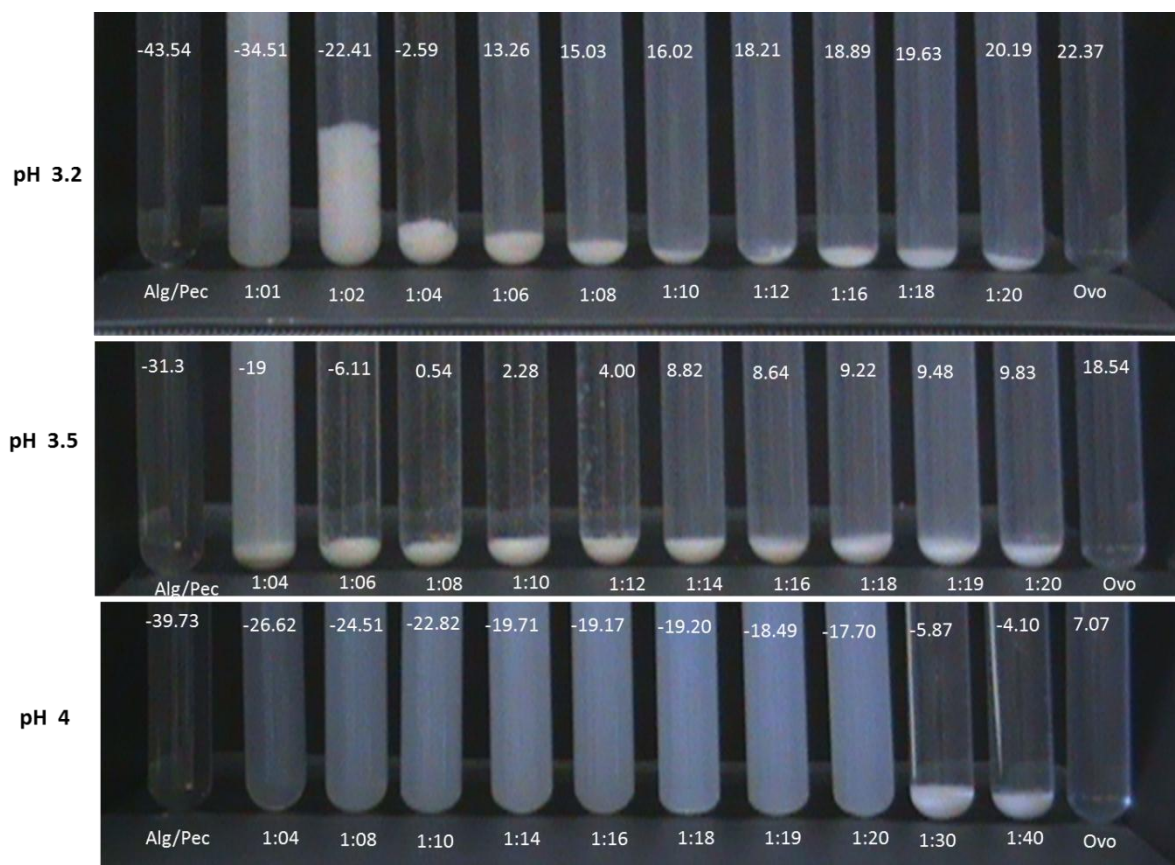


Figura 4.3. Proporciones de alginato/pectina (0.2%) – Ovoalbúmina (0.2%) en diferentes valores de pH, con sus valores promedio de potencial zeta.

Es posible observar en las imágenes que los sistemas presentan cambios físicos y eléctricos a medida que la cantidad de proteína aumenta frente a la cantidad de polisacáridos. En un pH de 3.2 la mezcla de polisacáridos (alginato-pectina) presentó un potencial zeta de -43.54 ± 2.75 mV, en cuanto a la solución de ovoalbúmina presentó un valor de 22.37 ± 0.79 mV. Estos valores son diferentes cuando se cambia el pH para 3.5 y 4. Con un pH de 3.2 las mejores condiciones se alcanzan en una relación 1:4 que es donde existe una evidente separación de fases, en pH 3.5 es la proporción 1:8 y en pH 4 se observa que se requieren mayores cantidades de proteína para alcanzar una condición

apropiada; 1:30 es una proporción no adecuada y sigue sin estar próxima a la neutralidad. A medida que la proporción entre la mezcla de los polisacáridos y la solución de proteína alcanza un equilibrio de cargas, próximo a la neutralidad, fueron formados y precipitados coacervados insolubles en el fondo del tubo de ensayo. De acuerdo con Sperber *et al.*, (2009) la separación de fases ocurre cuando la carga de los complejos formados entre proteína-polisacárido alcanza la neutralidad. La falta de repulsión electrostática entre los polímeros, permite la agregación, resultando en una separación de fases macroscópica.

Bajo el mismo principio que el caso anterior se eligieron los valores de pH (3.5, 3.75 y 4) para examinar la interacción entre la mezcla de polisacáridos y una solución de WPC al 0.2% (w/w) en diferentes proporciones en volumen (mezcla-proteína). En la parte superior de la Figura 4.4 se tienen los valores de potencial zeta expresados en mV y en la parte inferior las relaciones volumétricas utilizadas (mezcla-WPC).

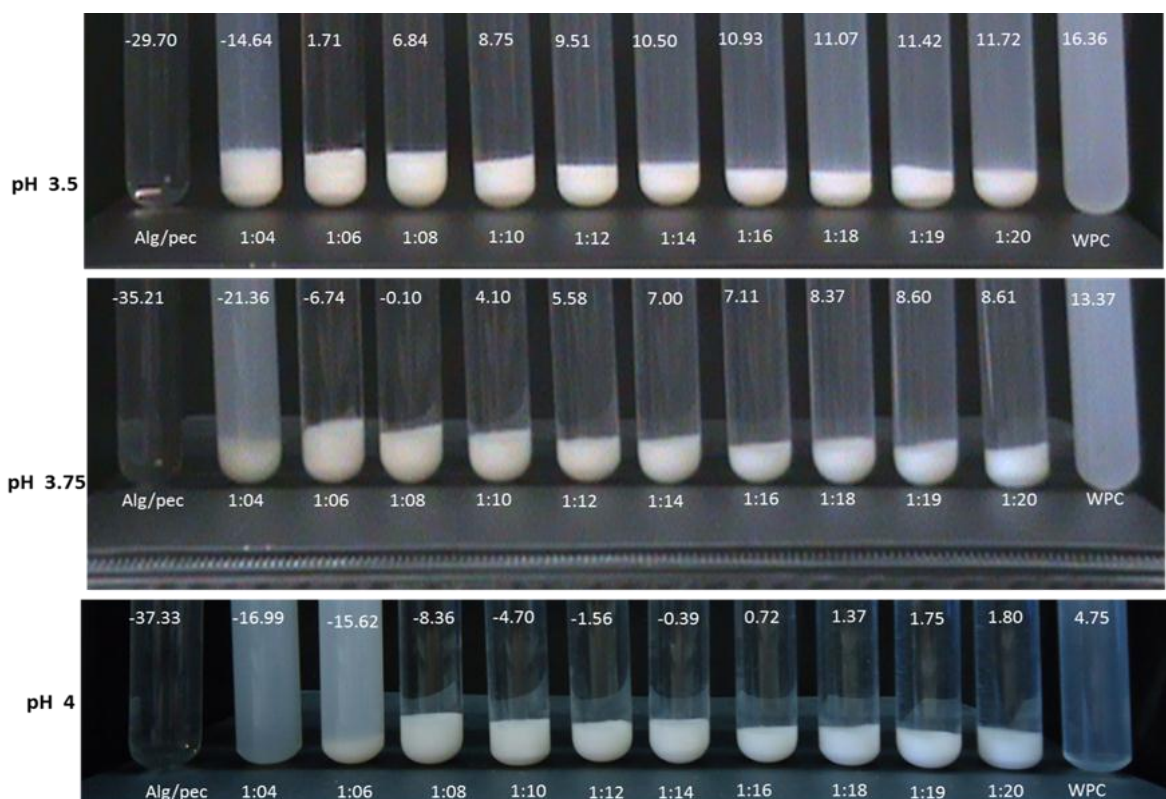


Figura 4.4. Proporciones de alginato/pectina (0.2%) – WPC (0.2%) medidos en diferentes valores de pH, con sus valores promedio de potencial zeta.

Las mejores condiciones en pH de 3.5 se dan en la proporción 1:6 con un potencial zeta de 1.71 ± 0.33 mV y una clara separación de fases. En pH 3.75 en la proporción 1:8 se observan las mejores condiciones de todo el sistema con una carga electrostática -0.10 ± 0.69 mV. En pH 4 se requieren mayores cantidades de solución proteica para lograr un sistema próximo a la neutralidad, en 1:14 con una carga electrostática de -0.39 ± 0.32 mV. Para proteínas y polisacáridos que exhiben cargas opuestas, como en este caso, pueden ocurrir interacciones electrostáticas, coacervación compleja o separación de fases asociativa dando origen a complejos de proteína-polisacárido. En este caso, las mezclas exhiben dos fases distintas, una proteína/polisacárido y otra rica en solvente, en este caso el agua (Cooper *et al.*, 2005).

Los tamaños de los coacervados de solución se muestran en el anexo 1.

4.3.1 Mezcla de la emulsión (alginato-pectina /aceite de girasol) y soluciones proteicas

Se escogió un pH de 3.5 para trabajar con Ovoalbúmina, porque ahí se observaron las mejores condiciones de interacción polisacárido-proteína. Se midió el potencial zeta de las proporciones de solución y de emulsión en el pH escogido.

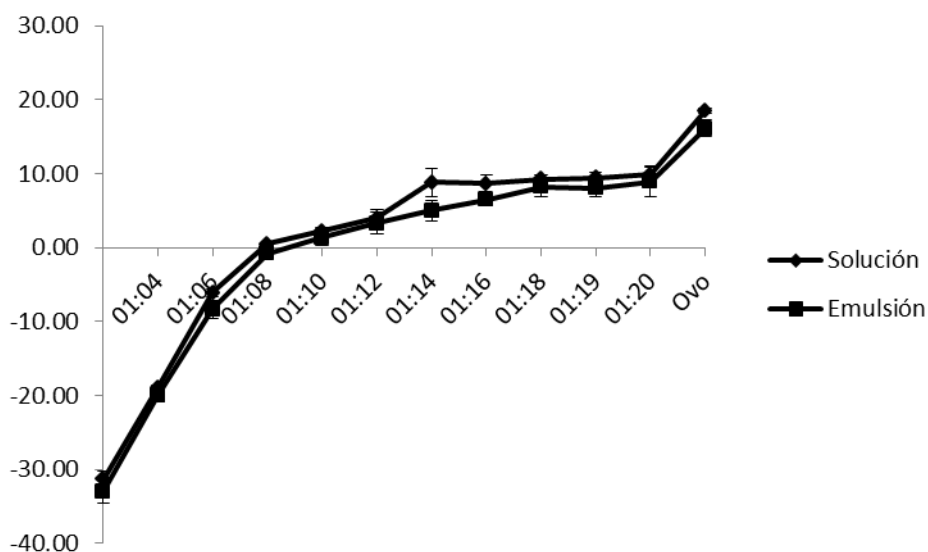
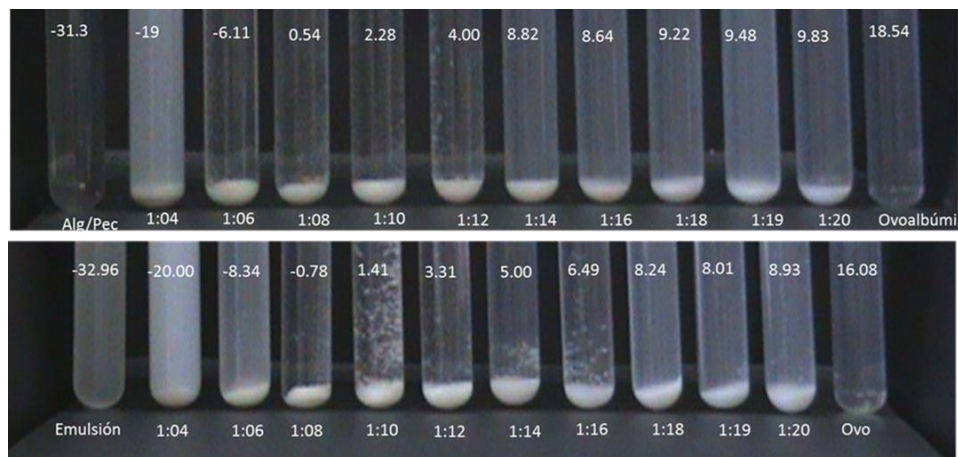


Figura 4.5. Proporciones vs valores de potencial zeta, alginato/pectina (0.2%) – OVO (0.2%) y pH 3.5.

En la Figura 4.5 se observa un comportamiento muy similar tanto de la solución como de la emulsión, siendo la proporción 1:8 donde se presentaron los valores más próximos a la neutralidad, en la solución 0.54 ± 0.25 mV y en la emulsión -0.78 ± 0.22 mV. En la Figura 4.6 se aprecia la formación de los coacervados tanto de solución como de emulsión, mostrando en la parte superior sus respectivos valores de potencial zeta.



**Figura 4.6 Proporciones de solución y de emulsión para OVO pH 3.5, 0.2%.
Con sus valores promedio de potencial zeta.**

Las interacciones entre polímeros en general, inducen la formación entre complejos interpoliméricos solubles que interactúan para formar complejos insolubles que son electrostáticamente neutros. Entonces, los complejos insolubles se agregan y precipitan, formando una fase dispersa de coacervados complejos. Dichos coacervados, con el tiempo y la sedimentación, forman agregados y se precipitan para formar la fase coacervada (Mekhloufi *et al.*, 2005).

En base a los mismos lineamientos que el caso anterior, se escogió un pH de 3.75 para trabajar con WPC. Se midió el potencial zeta de las relaciones de solución y de emulsión en el pH escogido (Figura 4.7).

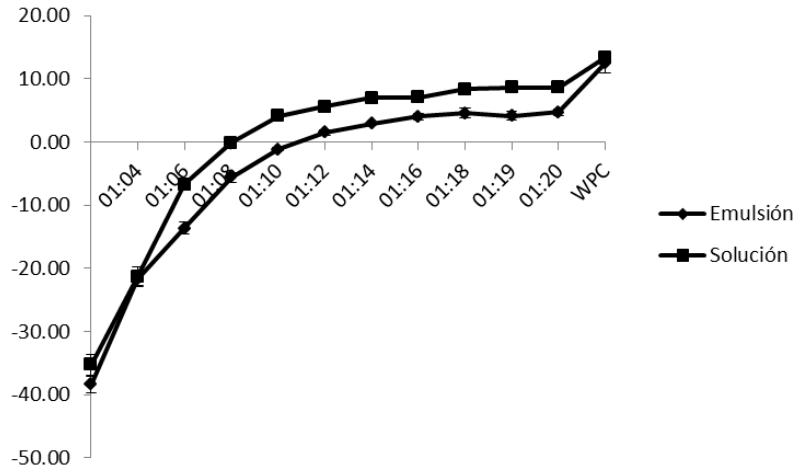


Figura 4.7. Proporciones vs potencial zeta, alginato/pectina (0.2%)– WPC (0.2%) y pH 3.75.

En el gráfico anterior se observa una tendencia similar tanto en las relaciones de solución como de emulsión, siendo las proporciones 1:8 en solución y 1:10 en emulsión donde se presentaron los valores más próximos a la neutralidad, en solución, se tiene un valor de -0.10 ± 0.69 mV mientras que en la emulsión -1.20 ± 0.26 mV. En la Figura 4.8 se aprecia la formación de los coacervados de solución y de emulsión, mostrando en la parte superior sus respectivos valores de potencial zeta.

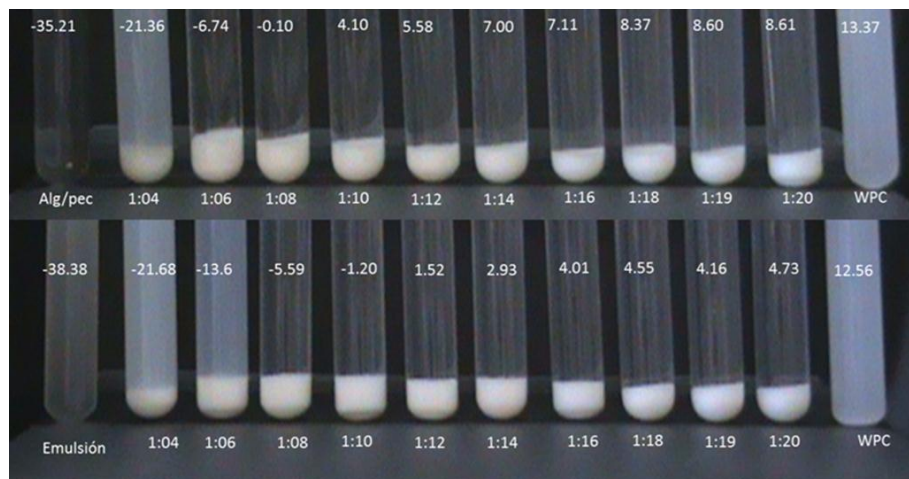


Figura 4.8. Proporciones de solución y de emulsión para WPC pH 3.75, 0.2%. Con sus valores promedio de potencial zeta.

En la actualidad, el conocimiento de la coacervación compleja se centra en las mezclas binarias de biopolímeros en una fase acuosa. El fenómeno de coacervación compleja se puede considerar en aplicaciones prácticas potenciales. La más común debido a su importancia industrial es la formación de microcápsulas para la protección y liberación controlada de compuestos de alto valor agregado, debido a la gran capacidad para recubrir y a las propiedades viscoelásticas de los biopolímeros utilizados (Weinbreck y Wientjies, 2004). La primera aplicación de coacervados fue el sistema de goma arábica-gelatina para papel autocopia y la combinación de polianiones con gelatina se ha utilizado ampliamente.

El tamaño de los coacervados de emulsión se muestra en el anexo 1.

4.4 Interacción electrostática entre microcápsulas de gelificación iónica y soluciones de proteína

La realización de este ensayo fue necesaria, una vez que durante el proceso de gelificación iónica, los grupos carboxílicos de la mezcla de biopolímeros reaccionaron con los iones de calcio lo que pudo llevar a una reducción de la carga libre total disponible de la mezcla para interactuar con la proteína (sea Ovoalbúmina o WPC).

Se eligió una relación en volumen de 1:4 (Figura 4.9) para producir microcápsulas por gelificación iónica (GI) y después recubrirlas con proteína tomando como referencia dicha relación. Trabajando con un pH de 3.5 para las microcápsulas recubiertas con ovoalbúmina y un pH de 3.75 para las microcápsulas recubiertas con WPC.

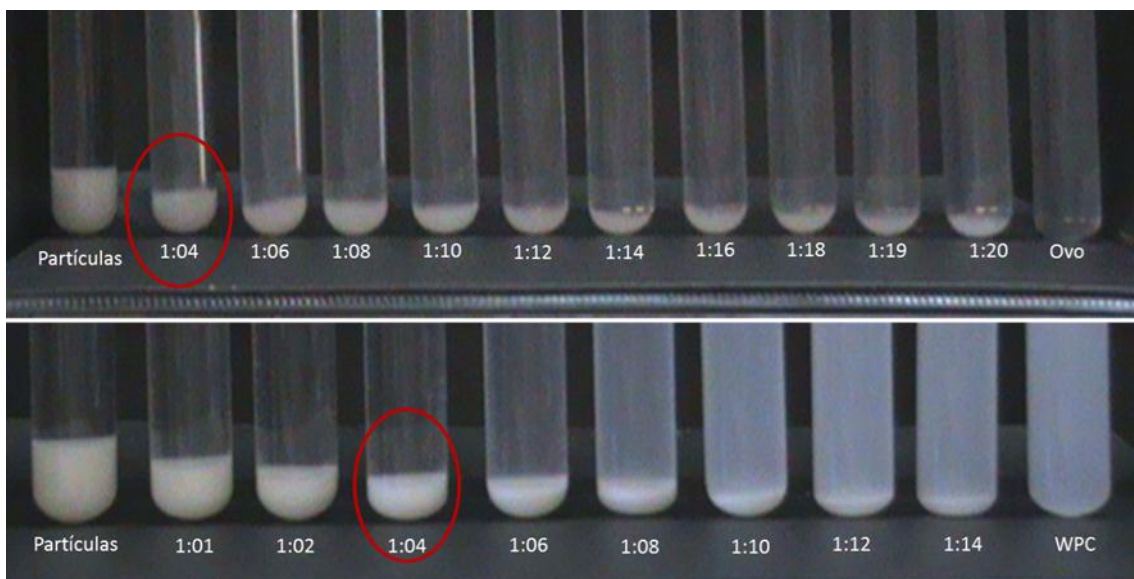


Figura 4.9. Selección de la relación en volumen para producción de microcápsulas recubiertas con ovoalbúmina (en pH 3.5) y con WPC (en pH 3.75).

Durante el proceso de gelificación iónica, los grupos COO^- de la pectina interactúan con los iones Ca^{2+} del cloruro de calcio reduciendo el total de las cargas negativas libre presentes en el sistema tal como lo han reportado Smrdel *et al.*, (2008). Debido a esto fue necesaria una menor cantidad de proteína en el sistema para la neutralización de las cargas y precipitación de las microcápsulas coacervadas.

El tamaño de los coacervados de microcápsulas se muestra en el anexo 1.

Se determinó la humedad en las microcápsulas producidas por GI obteniéndose un valor de 96.15 ± 0.27 % para las microcápsulas hechas en pH 3.5 y 95.93 ± 0.50 % para las producidas en pH 3.75. Estos elevados valores en el contenido de humedad de las microcápsulas de gelificación iónica coinciden con las microcápsulas obtenidas por el mismo método por Mukai-Correa *et al.*, (2005), que presentan valores superiores al 90%. Esos valores elevados son característicos de microcápsulas producidas con polisacáridos formadores de geles debido a su elevada capacidad de retener agua.

El contenido de lípidos fue determinado en las microcápsulas obtenidas por GI obteniéndose un contenido de 28.89 ± 2.16 % en las microcápsulas producidas en pH 3.5, mientras que se obtuvo un 29.88 ± 2.56 % en aquellas que se produjeron en pH 3.75, sin diferencia estadística entre las medias ($p > 0.05$). Conociendo estos valores fue posible calcular la eficiencia de encapsulación, el cual es un parámetro muy importante para indicar la calidad del proceso, que es mejor o más eficiente en la medida que se logre encapsular una fracción mayor de la sustancia a encapsular. Pean *et al.* (1998) definen que la eficiencia de encapsulación es la fracción expresada en por ciento del material encapsulado con respecto a la cantidad total que se emplea para realizar el proceso. En las microcápsulas de gelificación iónica hechas en pH 3.5 se obtuvo una eficiencia del 87.54 % mientras que en las microcápsulas hechas en pH 3.75 fue 90.54%. De acuerdo con Sankalia *et al.*, (2005) altas concentraciones de alginato favorecen la eficiencia de encapsulación, reportando que para una concentración de alginato de sodio al 2% el porcentaje de atrapamiento fue mayor al 90%. Roy y Gupta (2004) reportan eficiencia de atrapamiento de 92 a 89% en alginato de sodio para enzimas glucoamilasas.

Fue determinado el tamaño medio de las microcápsulas de GI en los valores de pH mencionados siendo de 130.01 ± 8.61 μm para pH 3.5 y 130.31 ± 7.11 μm para un valor de pH de 3.75, sin diferencia estadística entre las medias ($p > 0,05$).

4.5 Determinación de la adsorción de proteína sobre la superficie de las microcápsulas de gelificación iónica

Conociendo el porcentaje de lípidos y humedad en 100 gramos de microcápsulas se calculó la relación en masa (w/w) a partir de la relación en volumen escogida (1:4), para las microcápsulas de GI hechas en pH 3.5, el cual fue de 1:2,92 w/w y de 1:2,85 w/w para las microcápsulas hechas en pH 3.75. Y de esta manera a partir de dichas relaciones, se produjo una serie de lotes de microcápsulas de GI en pH 3.5 para recubrir con soluciones de proteína (ovoalbúmina) al 1.7, 3 y 4 % y microcápsulas de GI en pH 3.75 para recubrir con soluciones de WPC al 1.7, 3 y 4 %. Donde se determinó humedad, y proteína absorbida en las microcápsulas. En la tabla 4.1, se muestran los valores obtenidos de proteína adsorbida.

Tabla 4.1 Contenido de proteína (base seca) de las microcápsulas producidas por gelificación iónica recubiertas con ovoalbúmina y con WPC por interacción electrostática.

Ovo pH3.5			WPC pH3.75		
Proporción w/w	OVO (%)	Proteína (%) en la partícula	Proporción w/w	WPC (%)	Proteína (%) en la partícula
1:2.92	1.7%	25.70 ± 1.45 Cb*	1:2.85	1.7%	38.82 ± 4.07 Ca
1:5.83	3%	33.12 ± 2.21 Bb	1:5.7	3%	46.08 ± 2.08 Ba
1:11.67	4%	45.55 ± 2.76 Ab	1:11.4	4%	59.18 ± 1.91 Aa

*Medias seguidas de las mismas letras (mayúsculas en la columna y minúsculas en la fila) no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey (p>0.05).

De acuerdo con de Souza *et al.*, (2012), las microcápsulas de GI hechas de pectina y recubiertas con una solución de WPC al 4% presentaron una adsorción de proteína en base seca del 49.2%, valor inferior al obtenido en este estudio, con microcápsulas de GI hechas con la mezcla de alginato-pectina. En trabajos realizados por Bürger (2012) fueron recubiertas microcápsulas de pectina producidas por gelificación iónica y recubiertas con soluciones proteicas de WPC al 8 %, obteniendo una adsorción de proteína del 58.45%,

valor próximo al encontrado en este trabajo cuando se utilizó la mezcla de alginato-pectina y una concentración de 4% de WPC en solución.

Altos contenidos de proteína que van desde 53.7 hasta 83.8% se obtuvieron en partículas hechas con concentrado proteico de suero de leche y alginato (Rosenberg y Lee, 2004). Una mayor adsorción de proteína en la microcápsula, además de brindar una mejor protección al activo, promueve el valor nutrimental de la misma.

A pesar que el alginato ha sido adecuado para la encapsulación, el gel presenta sensibilidad a pH extremos y matrices porosas que condicionan tanto la liberación como la protección de los compuestos. Esta característica puede ser contrarrestada al modificar la estructura del gel, al emplear sistemas mixtos poliméricos para la formación de la matriz o con el recubrimiento de las microcápsulas (Pal, 2005).

Diversas investigaciones mostraron mejoras en las propiedades físico-químicas del alginato al preparar matrices mixtas con quitosano y polilisina aplicando diferentes técnicas de encapsulación (Chávarri *et al.*, 2010). En este sentido, otros estudios señalaron el uso de sistemas compuestos por alginato y almidones, proteína de suero (lactoglobulina) y proteína del huevo (Chen y Subirade, 2006; Somchue *et al.*, 2009), glucomanano konjac y pectinas (Madziva *et al.*, 2006).

En un estudio para encapsular ácido fólico con el uso de alginato en combinación con pectina se obtuvieron cápsulas más robustas y una mejor eficiencia de encapsulación. La mezcla de alginato y pectina mostró una mayor retención de ácido fólico en las cápsulas después de la liofilización y almacenamiento, en comparación con aquellas fabricadas sólo con alginato (Madziva *et al.*, 2006).

Una amplia gama de mezclas de alginato de sodio y pectina han sido investigadas. Las mezclas mostraron sinergia tanto de las propiedades mecánicas y la tasa de permeación de vapor. Después de tratamiento con CaCl_2 , las propiedades mecánicas cambiaron drásticamente debido al desarrollo de puntos de enlace en la estructura de la red molecular (Gohil, 2010).

Al comparar las adsorciones de proteína de las microcápsulas recubiertas con ovoalbúmina con aquellas recubiertas con WPC se observan valores inferiores en todas las concentraciones utilizadas. Esto puede deberse a que la ovoalbúmina de acuerdo con

Vadehra y Nath (1973), puede ser desnaturalizada por varios factores, entre ellos la agitación, un factor de interés utilizado en la realización de este estudio. Cuando una proteína globular es desnaturalizada, sus interacciones químicas y físicas cambian sensiblemente de manera que hay una exposición de los grupos apolares y de los grupos que contienen azufre que originalmente se encontraban al interior de la proteína. Consecuentemente las proteínas desnaturalizadas poseen una mayor tendencia de agregación por medio de la formación de enlaces hidrófobos y disulfuro (Jones y McClements, 2010).

4.6 Caracterización de las microcápsulas obtenidas por gelificación iónica, recubiertas con proteína

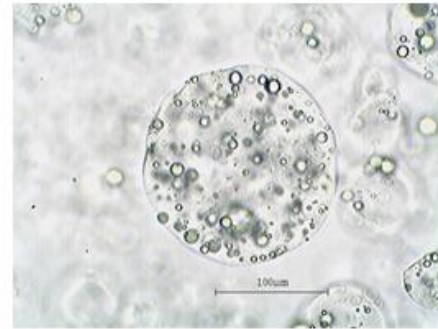
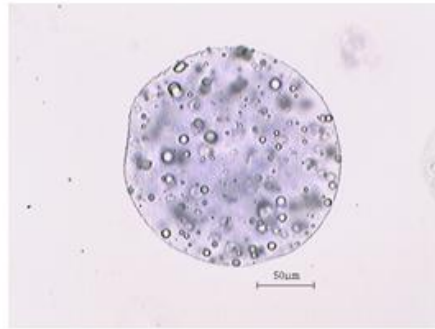
4.6.1 Microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido

Las microcápsulas fueron observadas en húmedo, utilizando microscopio óptico, por lo general presentando un formato esférico. La mayoría de las microcápsulas producidas por biopolímeros presentan formas esféricas, sin embargo pueden presentarse formas de fibras, esferoides o aglomerados (Jones y McClements, 2010). Algunas de las microcápsulas fueron coloreadas con azul brillante de Coomassie G-250 con fines meramente estéticos, para distinguir la proteína en la periferia, sin embargo como la pectina utilizada para la producción de las microcápsulas contiene cierto porcentaje de nitrógeno proteico, el colorante logró difundirse ligeramente al interior de la partícula. En la Figura 4.10, se muestra la morfología de microcápsulas de gelificación utilizando microscopía óptica.

Coloridas

Sin colorar

pH 3.5



pH 3.75

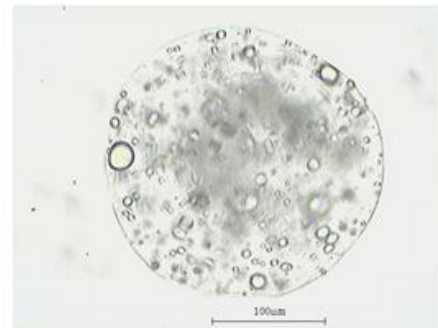


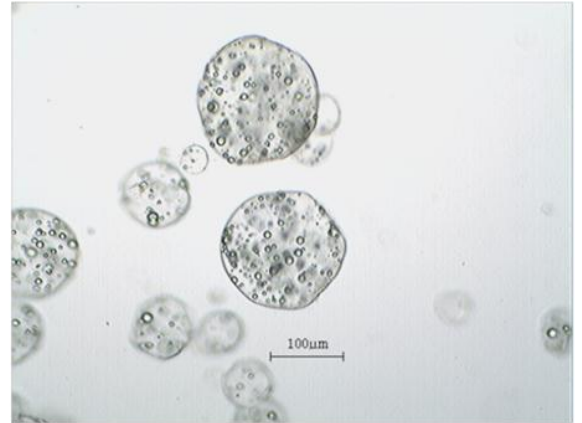
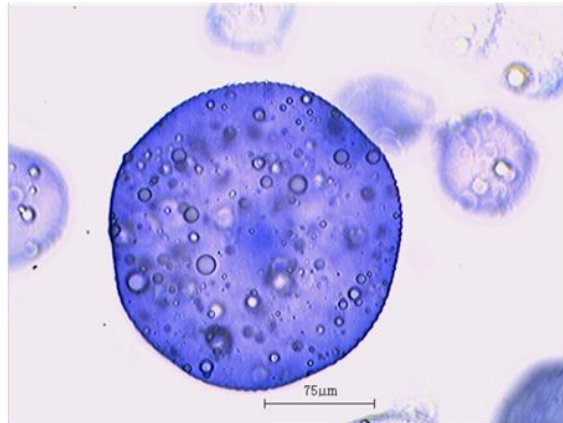
Figura 4.10. Microscopía óptica de microcápsulas de gelificación iónica.

La forma esférica de las microcápsulas pudo haber sido influenciada por la concentración de pectina. Un estudio realizado con microcápsulas de alginato muestra que estas obtienen una forma esférica más estable a mayores concentraciones de alginato, para concentraciones de solución iónica constante (Li *et al.*, 2011). En la figura 4.11 se muestra la morfología de microcápsulas recubiertas con Ovoalbúmina utilizando microscopía óptica.

Coloridas

Sin colorar

1.7%



3%

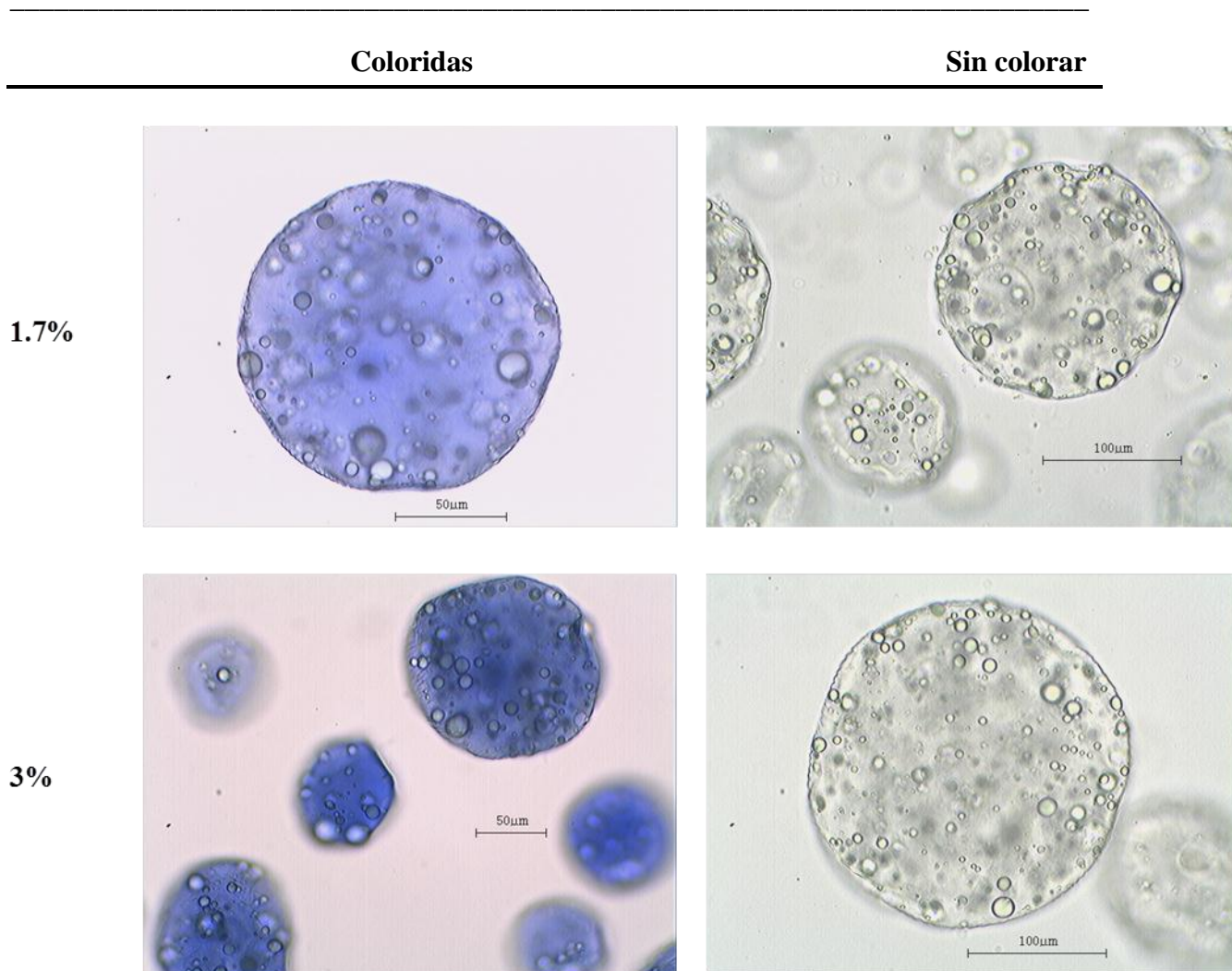


4%



Figura 4.11. Microscopía óptica de microcápsulas recubiertas con Ovalbúmina.

Independientemente de la proteína utilizada para recubrir las microcápsulas, éstas presentaron una morfología esférica similar, con la emulsión lipídica homogéneamente dispersa a través de la partícula. En la Figura 4.12 se muestra la morfología de microcápsulas recubiertas con WPC utilizando microscopía óptica.



4%

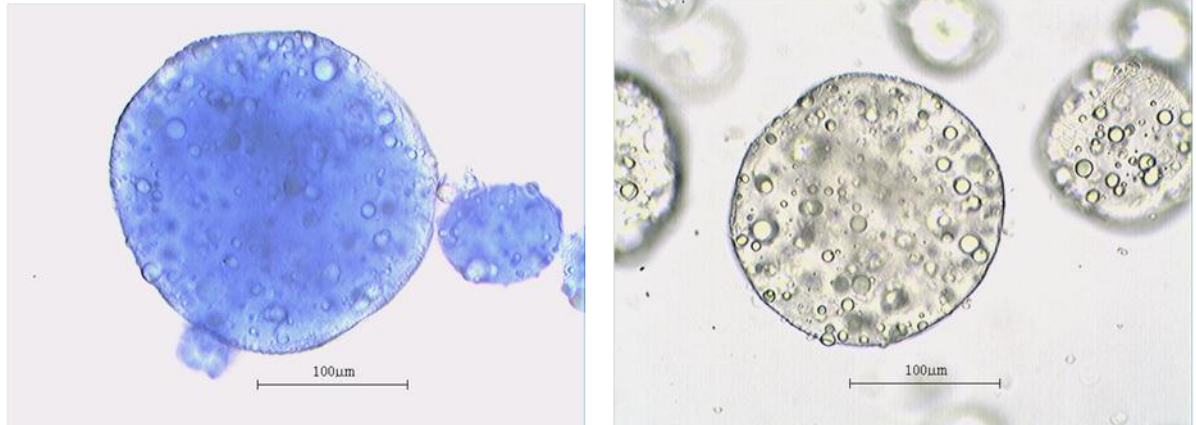


Figura 4.12. Microscopía óptica de microcápsulas recubiertas con WPC.

Las imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (Figuras 4.13, 4.14 y 4.15) se puede observar que las microcápsulas sufrieron una ligera contracción debido al proceso de liofilización al que fueron sometidas antes de ser analizadas en el microscopio, perdiendo parcialmente su forma original para todos los niveles de concentración de proteína estudiados. Diversos factores como el contenido de agua en la matriz debido a la pectina pudo haber elevado la fragilidad de las microcápsulas durante el proceso de secado. De acuerdo con Sagis *et al.*, (2008), las microcápsulas de pectina de alto grado de esterificación recubiertas con aislado proteico de suero de leche soportaron el proceso de secado manteniendo su forma original. Mientras que microcápsulas producidas con alginato mostraron alteración en su forma debido al proceso de secado (Albertini *et al.*, 2010). Al comparar la superficie de las microcápsulas sin recubrimiento (Figura 4.13) con aquellas recubiertas (Figuras 4.14 y 4.15) se observa una superficie más lisa en las de alginato pectina. En el caso de las partículas recubiertas con ovoalbúmina (Figura 4.14) al compararlas con las recubiertas con WPC (Figura 4.15) se aprecian formas menos definidas y superficies más rugosas. También, puede observarse en todos los casos de microcápsulas recubiertas, que conforme aumenta el porcentaje de proteína en solución, la superficie de las microcápsulas es más homogénea y uniforme debido a una mayor concentración de sólidos en su superficie con respecto a las microcápsulas hechas sólo de alginato-pectina.

SEM

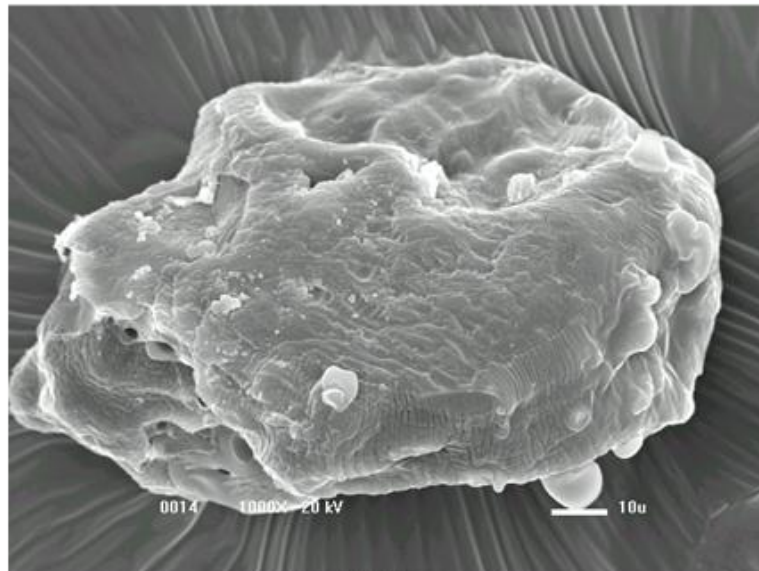
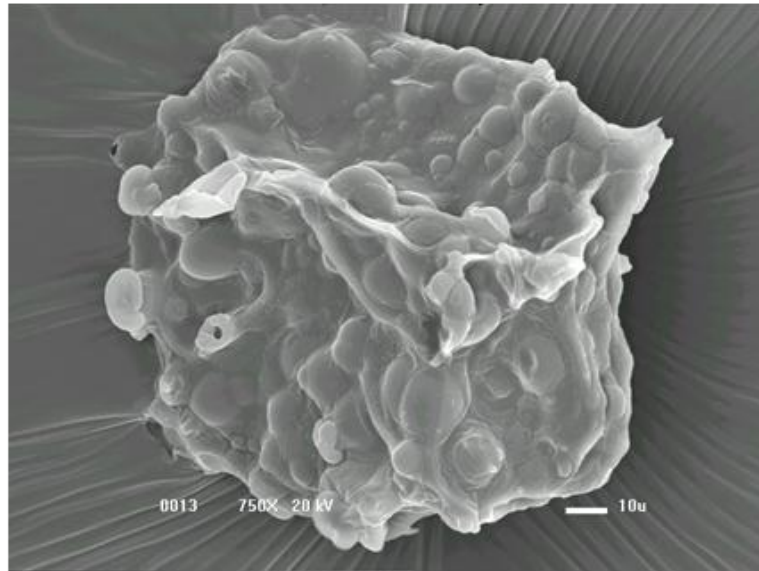
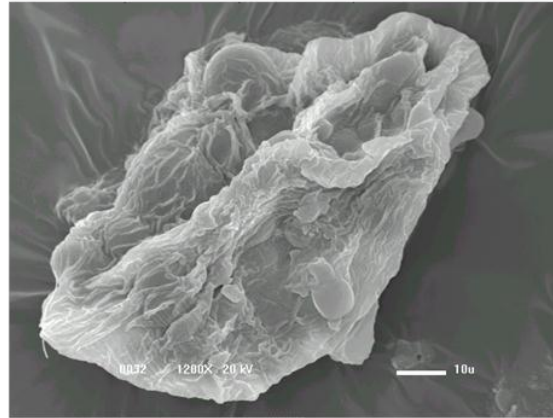


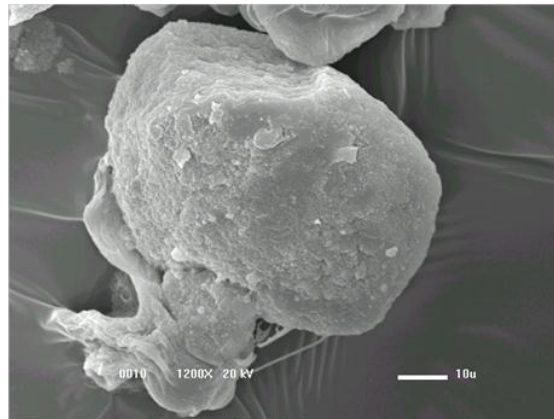
Figura 4.13. Microscopía electrónica de barrido de microcápsulas de GI.

SEM

1.7%



3%



4%

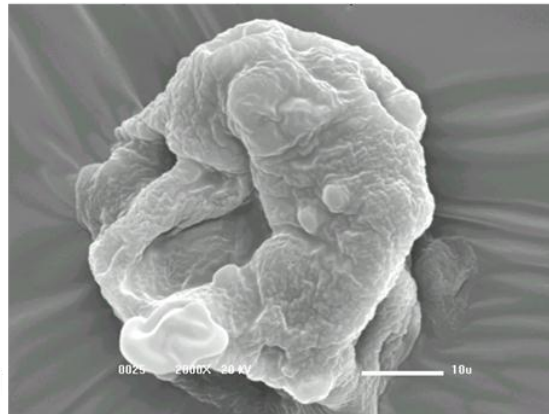
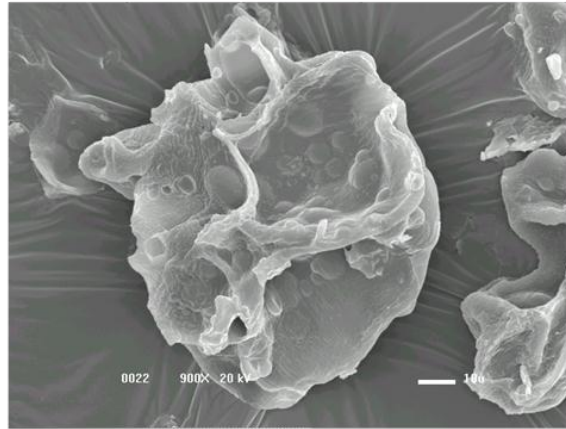


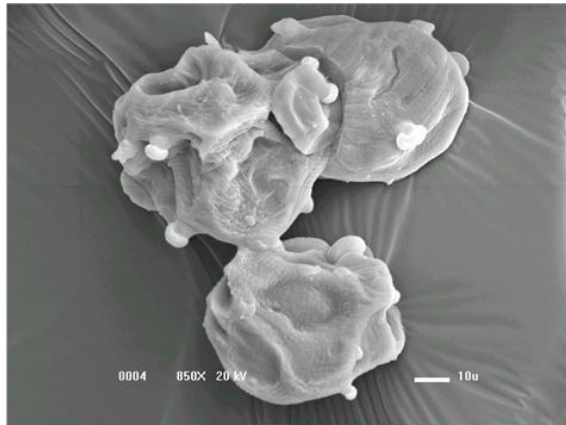
Figura 4.14. Microscopía electrónica de barrido de microcápsulas recubiertas con OVO.

SEM

1.7%



3%



4%

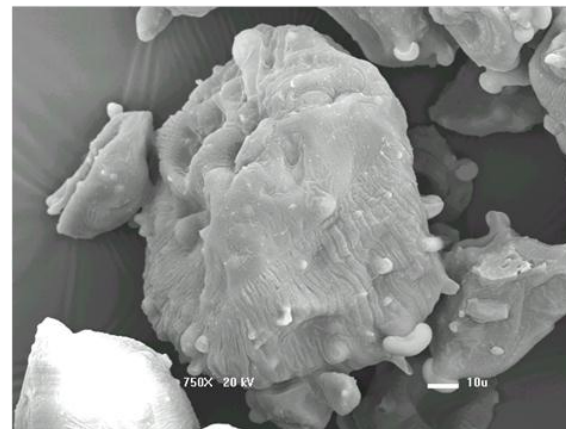


Figura 4.15. Microscopía electrónica de barrido de microcápsulas recubiertas con WPC.

4.6.2 Tamaño medio de las microcápsulas

El tamaño de las microcápsulas recubiertas se ve influenciado por el tamaño de las microcápsulas de GI, que a su vez está determinado por el diámetro de la boquilla utilizada para la atomización, la presión del aire, viscosidad de la solución, velocidad de flujo, concentración de cloruro de calcio en el baño iónico y la concentración del polisacárido gelificante (Burey *et al.*, 2008). El tamaño de las microcápsulas húmedas recién producidas en diferentes concentraciones de proteína se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Tamaño de las microcápsulas producidas por gelificación iónica recubiertas con ovoalbúmina y con WPC por interacción electrostática.

OVO pH 3.5			WPC pH 3.75		
Proporción w/w	OVO (%)	Tamaño (µm)	Proporción w/w	WPC (%)	Tamaño (µm)
1:2.92	1.7%	157.89 ± 14.43 ABa*	1:2.85	1.7%	190.34 ± 12.51 Bb
1:5.83	3%	176.15 ± 30.12 Ba	1:5.7	3%	178.40 ± 25.01 Aa
1:11.67	4%	138.02 ± 20.71 Aa	1:11.4	4%	197.47 ± 24.63 Cb

*Medias seguidas de las mismas letras (mayúsculas en la columna y minúsculas en la fila) no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$).

Es importante mencionar que independientemente de la proteína utilizada (WPC u ovoalbúmina) el tamaño medio de las partículas aumenta con la adsorción de proteína en relación al tamaño de las partículas de gelificación iónica.

En un estudio realizado por de Souza *et al.*, (2012) el tamaño de microcápsulas de pectina recubiertas con WPC en concentraciones que fueron de 2 a 12 %, varió de 188.1 µm a 231.3 µm; valores similares a los obtenidos en este estudio.

4.6.3 Composición centesimal

Fue determinado el contenido de humedad en las microcápsulas recubiertas con proteína, los resultados se muestran en la tabla 4.3. De acuerdo con Liu *et al.*, (2007), las microcápsulas de gelificación iónica que utilizan hidrocoloides como pectina y alginato como material pared, contienen una gran cantidad de agua y poros en su matriz así como un mayor contenido de grupos ionizables en su superficie que en su interior. El contenido de humedad presente en las microcápsulas está relacionado con las características de la pectina, polisacárido de alta higroscopicidad (Xie *et al.*, 2009).

Tabla 4.3 Contenido de humedad de las microcápsulas producidas por gelificación iónica recubiertas con ovoalbúmina y con WPC por interacción electrostática.

OVO pH 3.5			WPC pH 3.75		
Proporción w/w	OVO (%)	Humedad en la partícula (%)	Proporción w/w	WPC (%)	Humedad en la partícula (%)
1:2.92	1.7%	94.88 ± 0.83 Aa*	1:2.85	1.7%	92.35 ± 0.99 Ab
1:5.83	3%	91.78 ± 2.07 Ba	1:5.7	3%	90.54 ± 0.99 Ba
1:11.67	4%	89.70 ± 0.77 Ca	1:11.4	4%	85.20 ± 0.77 Cb

*Medias seguidas de las mismas letras (mayúsculas en la columna y minúsculas en la fila) no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$).

4.6.4 Capacidad de Hinchamiento

Las microcápsulas recubiertas con 3% de proteína tanto de ovoalbúmina como de WPC, fueron liofilizadas bajo las condiciones ya mencionadas en el punto 3.2.6.1 y rehidratadas con agua a diferentes valores de pH (1.2, 7 y en aquel en el que fueron hechas 3.5 o 3.75). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Tamaño en (μm) de las microcápsulas recubiertas al 3% de proteína, liofilizadas y rehidratadas con agua a diferentes valores de pH.

OVO pH3,5		WPC pH3,75	
pH	Tamaño la partícula (μm)	pH	Tamaño la partícula (μm)
1.2	234.88 \pm 68.61 Aa*	1.2	115.97 \pm 2.37 Cb
3.5	146.78 \pm 8.07 Ba	3.75	143.69 \pm 2.75 Ba
7	234.72 \pm 33.90 Aa	7	151.09 \pm 3.26 Ab

*Medias seguidas de las mismas letras (mayúsculas en la columna y minúsculas en la fila) no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$).

En el caso de las microcápsulas recubiertas con WPC, cuando fueron colocadas en un pH fuertemente ácido se observa un decrecimiento en el tamaño de las microcápsulas presentando diferencia estadística significativa. En este pH las microcápsulas fueron suficientemente resistentes para impedir el acceso de los grupos H^+ manteniéndose la interacción electrostática entre la mezcla de polisacáridos y la proteína. De acuerdo con estudios realizados por Rosenberg y Lee (2004) microcápsulas dispersas en pH 2.5 presentan una menor capacidad de hinchamiento cuando se compara con el hinchamiento observado en otros valores de pH tales como 4.5, 6 y 7.

Las microcápsulas de WPC rehidratadas en pH 3.75 y 7 readquieren su morfología esférica manteniendo la distribución de las gotas de aceite observadas en las microcápsulas húmedas (Figura 4.12). Observando una ligera disminución de tamaño.

Para el caso de las microcápsulas recubiertas con ovoalbúmina, sometidas a un pH de 1.2 se observa un incremento en el tamaño de las mismas, lo cual puede deberse a una repulsión electrostática entre la mezcla de polisacáridos y la proteína. De acuerdo con Santipanichwong *et al.*, (2008) el aumento en el tamaño de las microcápsulas en valores de pH bastante ácidos e inferiores al pKa de la pectina (≈ 2.9) está indicado por la repulsión electrostática pectina – proteína.

Cuando el pH aumenta a 7 de acuerdo con Rosenberg y Lee (2004) las cargas negativas de la superficie de la proteína y la disociación de los grupos carboxílicos de las

moléculas de alginato aumentan las fuerzas repulsivas y como consecuencia aumentan la capacidad de hinchamiento en ese pH. En pH 3.5, las microcápsulas presentan una ligera reducción de tamaño, sin embargo, en todos los valores de pH estudiados se readquiere la forma original. En las figuras 4.16 y 4.17 se observan las microcápsulas rehidratadas.

pH

1.2



3.75



7



Figura 4.16. Microcápsulas recubiertas con WPC 3%, liofilizadas y rehidratadas.

1.2



3.75



7

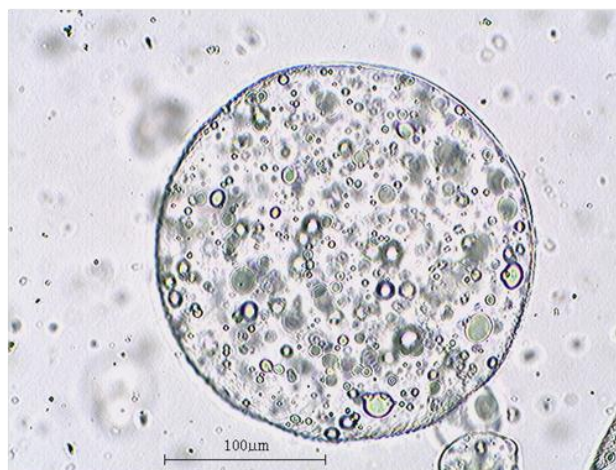


Figura 4.17. Microcápsulas recubiertas con OVO 3%, liofilizadas y rehidratadas.

4.6.5 Evaluación de la solubilidad de la proteína absorbida en las microcápsulas, simulando condiciones gastrointestinales

Microcápsulas liofilizadas, recubiertas con 3% de proteína en solución, tanto ovoalbúmina como WPC, fueron sometidas a una simulación de condiciones gastrointestinales *in vitro* para determinar la solubilidad proteica después de 2 horas, los resultados se muestran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Solubilidad media (%) de microcápsulas recubiertas con 3% de proteína en solución, después de 2 horas de simulación gástrica.

OVO pH3.5		WPC pH3.75	
pH	Solubilidad (%)	pH	Solubilidad (%)
1.2	45.20 ± 2.70 Aa*	1.2	47.63 ± 2.57 Aa
3	42.08 ± 4.68 Aa	3	44.65 ± 4.46 Aa

*Medias seguidas de las mismas letras (mayúsculas en la columna y minúsculas en la fila) no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$).

Una alta solubilidad de la cobertura proteica fue observada independientemente del tipo de proteína utilizada, con porcentajes superiores al 40% en todos los casos, tanto en la condición más drástica con un pH de 1.2 como en el pH 3, menos drástico. Indicando que las microcápsulas fueron frágiles a la asociación pH en presencia de pepsina. Las proteínas de suero de leche en su forma nativa son menos susceptibles a la hidrólisis enzimática, sin embargo eso puede ser alterado por tratamiento térmico, alta presión, alteración de la polaridad, entre otros (Foegeding *et al.*, 2002). Lo mismo ocurre para la ovoalbúmina, que de acuerdo con Vadehra y Nath, (1973) puede ser desnaturalizada por exposición al calor. En vista de que se trabajó con microcápsulas previamente sometidas a un proceso de liofilización, eso pudo haber repercutido en el resultado obtenido, las altas solubilidades observadas.

Algunos materiales, como los polisacáridos, no son digeridos por las enzimas en el tracto gastrointestinal, siendo fermentados por la flora intestinal presente en el colon, presentándose como buenos materiales para el desenvolvimiento de microcápsulas con resistencia entérica, entre ellos se encuentra pectina, inulina, quitosana, amilosa y algunas gomas (Liu *et al.*, 2007).

Al finalizar la simulación gastrointestinal, se observó la liberación del aceite encapsulado y la desintegración de las cápsulas en el sistema.

Las microcápsulas producidas con biopolímeros como pectina y alginato no son digeridos por las enzimas gástricas y permanecen intactas en la parte superior del tracto gastrointestinal, siendo deshechas después de la fermentación por las bacterias en el colon, necesitando un tiempo mayor de permanencia en el ambiente intestinal para la liberación del compuesto encapsulado (Rayment *et al.*, 2009).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

La mezcla alginato-pectina presentó valores de potencial zeta negativos en todo el rango de pH estudiado, su electronegatividad aumentó conforme lo hizo el pH. Esto pudo deberse al sinergismo dado entre los materiales y afectar directamente la adsorción de proteína en la superficie de las microcápsulas producidas por gelificación iónica.

Al utilizar polisacáridos formadores de geles (alginato y pectina), para producir microcápsulas por gelificación iónica se obtuvieron humedades elevadas > 90% debido a la elevada capacidad de retener agua de los materiales.

Se lograron mejores adsorciones de proteína (WPC) al utilizar la mezcla de polisacáridos alginato-pectina en las matrices conteniendo aceite de girasol, que en aquellas hechas de un sólo material, gracias a la interacción sinérgica de ambos polisacáridos. Se obtuvo la mayor adsorción (59.18%), cuando se utilizó una concentración de 4% de WPC en solución.

Al comparar la adsorción de proteína de las microcápsulas recubiertas usando ovoalbúmina con aquellas recubiertas con WPC se observan valores inferiores en todas las concentraciones utilizadas (1.7, 3 y 4 %). Esto puede deberse a que la ovoalbúmina presenta mayor sensibilidad y puede ser desnaturalizada por varios factores, entre ellos la agitación, un factor importante utilizado en la realización de este estudio. Elevadas adsorciones de proteína en las microcápsulas, además de brindar una mejor protección al activo, promueven el valor nutrimental de las mismas.

El uso de proteínas globulares como la ovoalbúmina y las proteínas de suero de leche (WPC) para el recubrimiento de las matrices, debido a sus características funcionales, disponibilidad y bajo costo representan opciones viables para ser utilizadas como agentes de recubrimiento en la producción de microcápsulas para proteger activos de interés en la industria de los alimentos.

En el caso de las microcápsulas recubiertas con WPC, cuando fueron colocadas en un pH fuertemente ácido se observa una disminución en su tamaño, mientras que aquellas rehidratadas en pH 3.75 y 7 readquieren su morfología esférica con una ligera disminución de tamaño. Para las microcápsulas recubiertas con ovoalbúmina, sometidas a un pH de 1.2 se observa un incremento en el tamaño de las mismas, de igual manera cuando el pH aumenta a 7 y con un pH 3 presentan una ligera reducción de tamaño, más sin embargo para todos los valores de pH se adquiere la forma original

Las microcápsulas recubiertas con proteína (sea ovoalbúmina o WPC) sometidas a condiciones gastrointestinales presentaron una elevada solubilidad de la cobertura proteica, independientemente del tipo de proteína utilizada, con porcentajes superiores al 40% en todos los casos, tanto en la condición más drástica con un pH de 1.2 como en el pH 3, menos drástico. El proceso de liofilización al que fueron previamente sometidas las microcápsulas, pudo haber propiciado dicha solubilidad.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, M. Pharmaceutical Microencapsulation Technology for Development of Controlled Release Drug Delivery systems. World Academy of Science, Engineering and Technology, 75:384-387, 2011.

Albella, J. M. Cintas A. M. Miranda T. Serratosa J. M. Introducción a la ciencia de materiales. Consejo Superior de Investigaciones científicas. Madrid 1993.

Albertini, B., Vitali, B., Passerini, N., Cruciani, F., Di Sabatino, M., Rodriguez, L., Brigidi, P. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 40(4): 359-366, 2010.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 18th ed. Gaithersburg, Maryland, USA, 2005.

Asker, D., Weiss, J., Mclements, D. J. Formation and Stabilization of Antimicrobial Delivery Systems Based on Electrostatic Complexes of Cationic–Non-ionic Mixed Micelles and Anionic Polysaccharides. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(3): 1041-1049, 2011.

Augustin, M. A., Sanguansri, L., Margetts, C., Young, B. Microencapsulation of food ingredients. Food Australia, 53:220–223, 2001.

Ayala, A. D. A. Curso Biología General y Aplicada. Facultad de Ciencias de la Salud - Universidad Nacional del Altiplano – UNAP. Disponible en: <http://www.monografias.com/microscopio-optico-compuesto.html>. Consultado: octubre 2009.

Barros, T.C., Tessaro I.C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 278(1–3): 381–386, 2011.

Bengoechea, C., Peinado, I., Mclements, D. J. Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: Factors affecting particle characteristics. Food Hydrocolloids, 25(5):1354-1360, 2011.

Bligh, E. G., Dyer, W. J. – A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J. Biochem. Physiol. 37:911-917, 1959.

Burey, P., Bhandari, B. R., Howes, T., Gidley, M. J. Hydrocolloid gel particles: Formation, characterization, and application. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48(5): 361-377, 2008.

Bürger, R.J. Desenvolvimento de micropartículas contendo *Lactobacillus Acidophilus* para alimentação de larvas de Pacu (*Piaractus Mesopotamicus*). Tesis de maestría presentada en la Facultad de Ingeniería de Alimentos de la UNICAMP, para la obtención del título de Maestro en Alimentos y Nutrición. (2012).

Cooper, C. L., Dubin, P. L., Kayitmazer, A. B., Turksen, S. Polyelectrolyte–protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10(1-2): 52-78, 2005.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F.C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 142(1-2):185-189, 2010.

Chen, L., Subirade, M. Alginate–whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*. 27(26):4646-4654, 2006.

Dziedzic, J.D. Microencapsulation and encapsulation ingredients. *Food Technology*, 42:136–151, 1988.

Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D., McGuffey, M. K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 13(5): 151-159, 2002.

Fox, P. F., Kelly, A. L. Developments in the chemistry and technology of milk proteins 1. Overview of major milk proteins. *Food Australia*, 55(3):104- 108, 2003.

Fraeye, I., Colle, I., Vandevenne, E., Duvetter, T., van Buggenhout, S., Moldenaers, P., et al. Influence of pectin structure on texture of pectinecalcium gels. *Innovative Food Science and Engineering Technology*, 11: 401-409, 2010.

Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., Marchioni, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1):103-105, 2009.

Gohil, R. M. Synergistic Blends of Natural Polymers, Pectin and Sodium Alginate. *Journal of Applied Polymer Science*, 120: 2324–2336. 2011.

Grant, G. T., Edwin R. Morris E. R., Rees D. A., Smith P. J. C., Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *Febs Letters - FEBS LETT*, 32 (1): 195-198, 1973.

Green, B.K., Scheicher, L. Pressure Sensitive Record Materials. US Patent 2: 217, 507, Ncr C, 1955.

Humblet-Hua, K. N. P., Scheltens, G., Van Der Linden, E., Sagis, L. M. C. Encapsulation systems based on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 25(4): 569-576, 2011.

Huntington, J. A., Stein P. E. Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B*, 756: 189–198, 2001.

Jones, O. G., Decker, E. A., McClements, D. J. Thermal analysis of β - lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. *Food Hydrocolloids*, 24(2-3):239-248, 2010.

Jones, O. G.; McClements, D. J. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(4):374-397, 2010.

Kastner, H. , Einhorn-Stoll U., Senge B. Structure formation in sugar containing pectin gels e Influence of Ca^{+2} on the gelation of low-methoxylated pectin at acidic pH. *Food Hydrocolloids*, 27: 42-49, 2012.

Kim, Y.D., Morr, C.V. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray dried orange oil emulsion particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:1314–1320, 1996.

King, W., Trubiano, P., Rerry, P. Modified Starch Encapsulation Agents offer superior Emulsification, Film Forming and Low Surface Oil. *Food Prod. Dev.* 10: 56-57. 1976.

Li, L., Hong-Hua, X., Xin-Huai, Z., Jian-Chun, H., Tie-Jing, L. Conformation and stability of three different enzymes adsorbed onto SiO nanoparticles. *New Technology of Agricultural Engineering (ICAE), International Conference.* 925-930, 2011.

Liu, L.; Fishman, M.; Hicks, K. Pectin in controlled drug delivery – a review. *Cellulose*, 14(1): 15-24, 2007.

Lopes da Silva, J. A., Rao, M. A. Pectins: structure, functionality and uses. In A. M. Stephen, G. O. Phillips P. A. Williams (Eds.), *Food polysaccharides and their applications* (2nd ed.). (pp. 353-411). 2006.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41:1–2. 2006.

Madziva, H.; Kailasapathy, K., Phillips, M. Evaluation of alginate-pectin capsules in cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (LWT) - Food Science and Technology.* 39(2):146-151, 2006.

Malvern Instruments. Disponible en:
<http://www.malvern.com/labeng/products/iwtm/particle_size_analysis.htm>. Acceso en:
octubre 2012.

Malvern Instruments. Disponible en:
<http://www.malvern.com/labeng/products/iwtm/zeta_potential.htm> Acceso en: octubre
2012.

Malvern Instruments. Zeta potential: an introduction in 30 minutes. Technical note.
Worcestershire, Reino Unido. 1-6, 2011.

Mekhloufi G., Sanchez C, Renard D, Guillemin S. pH-induced structural transitions during
complexation and coacervation of beta-lactoglobulin and acacia gum. *Langmuir* 21(1): 386-
394, 2005.

Mukai-Correa, R. Produção e caracterização de microcápsulas obtidas por gelificação
iônica para alimentação de larvas de peixe. Campinas. Dissertação-Universidade Estadual
de Campinas. Campinas – SP. 2003.

Mukai-Correa, R., Prata S., Alvim, I. D., Grosso, C. R. F. Controlled Release of Protein
from Hydrocolloid Gel Microbeads Before and After Drying. *Current Drug Delivery*, 1(3):
265-273, 2004.

Mukai-Correa, R.; Prata, A. S.; Alvim, I. D.; Grosso, C. Caracterização de microcápsulas
contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. *Brazilian
Journal of Food Technology*, 9:73-80, 2005.

Nisbet, A.D., Saundry, R.H., Moir, A.J., Fothergill, L.A., Fothergill, J.E. The complete
Amino-Acid sequence of hen ovalbumin. *European Journal Biochemistry*, 115(2), 335-
345, 1981.

Oakenfull, D., Pearce, J., Burley, R.W. Protein gelation. In: *Food Proteins and Their
Applications* (edited by S. Damodaran, A. Paraf). Pp. 111–142. New York: Marcel Dekker.
1997.

Onwulata, C. I., Qi P. X. Physical properties, molecular structures, and protein quality of
texturized whey protein isolate: Effect of extrusion moisture content. *American Dairy
Science Association* 94 :2231–2244, 2011.

Opanasopit, P., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., Rojanarata T., Ruktanonchai, U.
Development and Characterization of Pectinate Micro/Nanoparticles for Gene Delivery.
AAPS PharmSciTech, 9(1):67-74, 2008.

Ovodov, Y. Current views on pectin substances. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*,
35(3): 269-284, 2009.

Pal, R. Rheology of high internal phase ratio emulsions. *Food Hydrocolloids* 20:997-1005. 2005.

Patil, J. S., Kamalapur, M. V., Marapur, S. C., Kadam, D. V. 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, 2010.

Patil, S., Sandberg, A., Heckert E., Self W., Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*, 28(31): 4600-4607, 2007.

Pawar, S., Edgar, K. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* 33: 3279-3305, 2012.

Pawley, JB (editor). *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (3rd edición). Berlin: Springer. 2006.

Péan, J., Venier J., Filmon, R., Sergent, M., Phan-Tan Luu R., Benoit J. Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles. *Int. J. Pharm*, 166:105-115, 1998.

Rayment, P., Wright, P., Hoad, C., Ciampi, E., Haydock, D., Gowland, P., Butler M. F. Investigation of alginate beads for gastrointestinal functionality, Part 1: In vitro characterisation. *Food Hydrocolloids*, 23(3): 816-822, 2009.

Roach, P., Farrar, D., Perry, C. C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *Journal of the American Chemical Society*, 127(22): 8168-8173, 2005.

Rosenberg, M., Kopelman, I. J., Talmon, Y. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *J. Food Sci.* 50: 139-144, 1985.

Rosenberg, M., Lee, S. J. Calcium-alginate coated, whey protein-based microspheres: preparation, some properties and opportunities. *Journal of Microencapsulation*, 21(3): 263-281, 2004.

Roy, I., Gupta, M. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. *Enzyme and Microbial Technology* 34:26-32. 2004.

Sagis, L. M. C., De Ruyter, R., Miranda, F. J. R., De Ruyter, J., Schroen, K., Van Aelst, A. C., Kieft, H., Boom, R., Van Der Linden, E. Polymer Microcapsules with a Fiber-Reinforced Nanocomposite Shell. *Langmuir*, 24(5): 1608-1612, 2008.

Saha, D., Bhattacharya, S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal of Food Science and Technology*, 47(6): 587-597, 2010.

Sankalia, M., Mashru, R., Sankalia, J., Sutiraya, V. Papain entrapment in alginate beads for stability improvement and site-specific delivery: physicochemical characterization and factorial optimization using neural network modeling. *AAPS PharmSciTech* 6 (2), 2005.

Santipanichwong, R., Supphantharika, M., Weiss, J., McClements, D. J. Core-Shell Biopolymer Nanoparticles Produced by Electrostatic Deposition of Beet Pectin onto Heat-Denatured β -Lactoglobulin Aggregates. *Journal of Food Science*, 73 (69): N23-N30, 2008.

Schoubben, A., Blasi, P., Giovagnoli, S., Rossi, C., Ricci, M. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. *Chemical Engineering Journal*, 160(1): 363-369, 2010.

Shahidi, F., Han, X. Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33 (6): 501-547, 1993.

Silva, C. M., Ribeiro, A. J., Figueiredo, I. V., Gonçalves, A. R., Veiga, F. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 311(1-2): 1-10. 2006.

Simsek-Ege, F.A., Gillian, M., Bond, G.M., Stringer, J. Polyelectrolyte Complex Formation between Alginate and Chitosan as a Function of pH. *Journal of Applied Polymer Science*, 88: 346-351. 2003.

Skoog, D., Leary, J. Análisis instrumental. Editorial McGraw-Hill. Cuarta edición. México. 1995.

Smrdel, P., Bogataj, M., Zega, A., Planinšek, O., Mrhar, A. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation*, 25(2): 90-105, 2008.

Somchue, W., Sermsri, W., Shiowatana, J. and Siripinyanond, A. Encapsulation of α -tocopherol in protein-based delivery particles. *Food Research International*. 42(8):909-914, 2009.

Souza, F. N., Cordeiro, C.G.M.S., Ribeiro, M.C.E., Chaves, K. S., Gigante, M. L. Grosso C.R.F., Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins, *Food Research International*, 49(1): 560-566, 2012.

Sperber, B. L. H. M., Cohen Stuart, M. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., Norde, W. Binding of α -Lactoglobulin to Pectins Varying in their Overall and Local Charge Density. *Biomacromolecules*, 10(12): 3246- 3252, 2009.

Sperling L. H. Introduction to Physical Polymer Science. Fourth edition. Jhon Wiley and Sons Publications. 2006.

Srivastava, P., Malviya, R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry - an overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2(1): 10-18, 2011.

Sze, A. Erickson, D. Liqing, R. Li, D. Zeta potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. *Journal of colloid and interface science* 261: 402-410, 2003.

Teoh, P. L., Mirhosseini, H., Mustafa, S., Hussin, A. S. M., Manap, M. Y. A. Recent approaches in the development of encapsulated delivery systems for probiotics. *Food Biotechnology*, 25(1): 77-101, 2011.

Thorne, J., Vine, G., Snowden, M. Microgel applications and commercial considerations. *Colloid and Polymer Science*, 289(5): 625-646, 2011.

Vadehra, D.V., Nath, K.R. Eggs as a source of protein. *Critical Reviews in Food Technology*, 4: 193-308, 1973.

Walkenstrom, P., Kidman, S., Hermansson, A., Rasmussen, P., Hoegh, L. Microstructure and rheological behaviour of alginate/pectin mixed gels. *Food Hydrocolloid*, 17: 593-603. 2003.

Weinbreck, F., Wientjies, R.H.W. Rheological properties of whey protein/gum arabic coacervates. *Journal of rheology*, 48(6): 1215-1228, 2004.

Willats W. G., Knox J.P., Mikkelsen J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Food Science and Technology* 17(97-104), 2006.

Xie, H. G., Zheng, J. N., Li, X. X., Liu, X. D., Zhu, J., Wang, F., Xie, W. Y., Ma, X. J., Effect of Surface Morphology and Charge on the Amount and Conformation of Fibrinogen Adsorbed onto Alginate/Chitosan Microcapsules. *Langmuir*, 26(8): 5587-5594, 2009.

Yañez, F.J., Salazar Montoya, J., A. Chaires M., L. Jiménez H., J. Márquez R., M., Ramos, R.E. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21:313-319, 2002.

Ye, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(3): 406-415, 2008.

Zambón A.A., Rodríguez M.M., Miguel V.U. Errazu A.F. Producción de alginatos comerciales a partir de algas pardas patagónicas. *Industria y Química*, 344, 2002.

Zhou, P., Liu, X., Labuza, T. P. Effects of moisture-induced whey protein aggregation on protein conformation, the state of water molecules, and the microstructure and texture of high-protein-containing matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12): 4534-4540, 2008.

Anexo 1

En las Tablas 1 y 2 se muestran los tamaños de los coacervados de solución en los diferentes valores de pH utilizados para ambas proteínas (ovoalbúmina y WPC).

En la Tabla 3 se muestra el tamaño de los coacervados de emulsión (alginato/pectina-oleo + solución de proteína (0.2%)) y finalmente en la Tabla 4 se exhibe el tamaño de los coacervados de microcápsulas de gelificación iónica más solución proteica al 0.2%.

Tabla 1. Tamaño de coacervados de alginato/pectina – Ovoalbúmina (0.2%) pH 3.2, 3.5 y 4

	pH 3.2	pH 3.5	pH 4
Proporción Mezcla-Proteína	Tamaño (μm)		
1:04	678.18 \pm 105.71 Aa*	43.60 \pm 12.98 CDc	128.34 \pm 56.97 ABb
1:06	376.04 \pm 95.50 Ba	54.74 \pm 19.11 Bb	67.56 \pm 35.59 CDb
1:08	310.71 \pm 113.81 BCa	49.50 \pm 11.63 BCDC	154.01 \pm 56.86 Ab
1:10	314.02 \pm 137.39 BCa	80.25 \pm 15.93 Ab	67.65 \pm 23.75 CDb
1:12	306.23 \pm 141.74 BCa	50.97 \pm 8.20 BCc	112.98 \pm 60.78 Bb
1:16	226.97 \pm 114.88 Ca	39.84 \pm 5.24 Dc	93.80 \pm 75.32 BCb
1:18	309.11 \pm 123.69 BCa	42.42 \pm 3.02 CDb	53.69 \pm 6.52 Db
1:20	229.69 \pm 91.81 Ca	42.65 \pm 9.01 CDb	60.68 \pm 9.36 CDb

*Medias seguidas de las mismas letras (mayúsculas en la columna y minúsculas en la fila) no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$).

Tabla 2. Tamaño de coacervados de alginato/pectina – WPC (0.2%) pH 3.5, 3.75 y 4

	pH 3.5	pH 3.75	pH 4
	Tamaño (μm)		
Proporción Mezcla-Proteína			
1:06	35.83 \pm 3.40 Aa*	32.3 \pm 4.53 Ab	18.92 \pm 6.14 ABc
1:08	26.70 \pm 3.76 Ba	27.3 \pm 3.72 Ba	19.04 \pm 2.88 ABb
1:10	23.59 \pm 2.59 Ca	21.82 \pm 9.83 Ca	20.21 \pm 2.00 Aa
1:12	22.03 \pm 2.21 Ca	18.92 \pm 2.47 DEb	18.43 \pm 1.62 ABb
1:14	19.61 \pm 3.10 Da	17.29 \pm 2.38 DEFb	16.84 \pm 2.26 BCb
1:16	17.48 \pm 1.68 DEa	19.19 \pm 4.4 Da	14.27 \pm 1.84 Db
1:18	18.52 \pm 2.91 DEa	16.72 \pm 3.28 EFb	14.69 \pm 1.57 CDc
1:19	19.55 \pm 2.96 Da	16.29 \pm 2.68 Fb	15.18 \pm 1.53 CDb
1:20	17.08 \pm 2.20 Ea	16.35 \pm 1.86 Fa	15.00 \pm 1.93 CDb

*Medias seguidas de las mismas letras (mayúsculas en la columna y minúsculas en la fila) no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$).

Tabla 3. Tamaño de coacervados de emulsión (alginato/pectina-oleo + Proteína (0.2%))

	Ovo pH 3.5	WPC pH 3.75
	Tamaño (μm)	
Proporción		
Mezcla-Proteína		
1:04	33.61 \pm 12.86 Da*	20.71 \pm 4.90 BCb
1:06	83.51 \pm 12.95 Aa	21.49 \pm 2.91 Bb
1:08	89.32 \pm 7.60 Aa	24.01 \pm 3.65 Ab
1:10	83.06 \pm 8.50 Aa	19.20 \pm 1.98 CDb
1:12	72.53 \pm 11.55 Ba	17.54 \pm 1.84 Db
1:14	67.18 \pm 11.88 Ba	14.31 \pm 1.22 Eb
1:16	56.51 \pm 7.61 Ca	13.67 \pm 1.40 Eb
1:18	57.00 \pm 12.05 Ca	13.19 \pm 1.16 Eb
1:19	57.70 \pm 9.29 Ca	13.32 \pm 1.54 Eb
1:20	52.79 \pm 12.09 Ca	14.18 \pm 1.60 Eb

*Medias seguidas de las mismas letras (mayúsculas en la columna y minúsculas en la fila) no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$).

Tabla 4. Tamaño de coacervados de microcápsulas de GI + Proteína, 0.2%

Proporción GI -Proteína	Tamaño (μm)	
	Ovo pH 3.5	WPC pH 3.75
1:04	111.35 \pm 9.10 Db*	118.04 \pm 22.78 Aa
1:06	125.01 \pm 19.92 Ca	139.12 \pm 29.76 Aa
1:08	149.39 \pm 14.84 Ba	154.60 \pm 30.98 Aa
1:10	172.45 \pm 22.01 Aa	152.79 \pm 25.52 Ab

*Medias seguidas de las mismas letras (mayúsculas en la columna y minúsculas en la fila) no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$).