



Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales

Bryshila Lupo Pasin

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Programa de Doctorado: “Ciència i Tecnologia de Materials”

**Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación:
caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos
funcionales.**

Bryshila Lupo Pasin

Dra. Alicia Maestro Garriga

Dra. Carme González Azón

Departament d'Enginyeria Química

Departament d'Enginyeria Química

Departament d'Enginyeria Química. Facultat de Química.

Universitat de Barcelona

“No puede responder otra cosa que gracias y gracias”

William Shakespeare

Esta Tesis Doctoral es el fruto, no sólo del trabajo y la dedicación de la doctoranda sino también del esfuerzo y colaboración de numerosas personas. Aunque estas líneas no puedan compensar todo lo que cada una de ellas ha aportado a esta etapa de mi vida, espero que al menos sirvan para expresar mi más sincero agradecimiento.

A mis Directoras de tesis, Dra. Carme González y Dra. Alicia Maestro por guiarme en este largo proyecto, dedicar su tiempo a pesar de sus muchas otras ocupaciones y por sobre todo haberme dado la oportunidad de disfrutar de un periodo de aprendizaje que me ha hecho crecer como persona. Me gustaría agradecer a la Dra. Montse Porrás por sus consejos y enriquecedoras aportaciones al inicio de la tesis y, al Dr. José M. Gutiérrez por su colaboración especial durante todo el desarrollo de este trabajo.

Gracias a Blaia y a Esther por su amabilidad y ayuda en los diferentes trámites requeridos durante toda mi estancia y para la finalización de la tesis.

Agradezco a las personas del CSIC, especialmente a Susana Vilchez por su dedicación y ayuda en la realización de diferentes análisis, también a María y Jonathan por sus buenos consejos. Quiero dar las gracias al personal del CCiT por sus servicios y excelencia profesional, en especial a la plataforma de microscopía electrónica, poliformismo y calorimetría, resonancia magnética nuclear y técnicas separativas. Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Elvira López y Dra. Montse Riu por sus importantes aportaciones y especial apoyo para la realización de la evaluación sensorial.

A mis compañeros del laboratorio, con los que tantas horas he compartido, gracias a ellos por hacer de este camino un trayecto más fácil y divertido, lleno de momentos gratos que han formado parte de una hermosa etapa de mi vida, en especial a Esther, Mabel, Anna, María, Marta, Ricard, Xavi y Blanca.

A la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado por su apoyo institucional, especialmente al personal del DFPA y a mis compañeros de labores del Dpto. de Procesos Agroindustriales.

Agradezco al proyecto Europeo de Movilidad Académica, Erasmus Mundus Ánimo, ¡Chévere! por la beca otorgada para la realización de mis estudios doctorales. A la oficina de Movilidad y Programas Internacionales de la UB por sus servicios, amabilidad y disposición en todo momento, en especial a Marta y a Esther.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos y compadres del alma por creer en mí, motivarme y apoyarme siempre en mis decisiones: Flavia, Erika, Daniel, Carolina, Erich, Jorge, Meilin y Juviey. Gracias a Montse, Lucia, Karla, Ira y Bruno por estar cuando necesité ser escuchada.

A mis padres, quienes me infundieron la ética y el rigor que guían mi transitar por la vida, les tengo que agradecer su apoyo incondicional. A mi madre que es el ser más maravilloso de todo el mundo, gracias por el apoyo moral, tú cariño y comprensión. A mi padre, para mí un gran hombre al que siempre he admirado. Gracias, ambos han hecho que sea lo que soy.

A mis hermanas por darme su cariño, palabras de aliento y mostrarme que la vida siempre te recompensa gratamente cuando te has esforzado. Gracias, porque me conocen tal y como soy, porque me aceptan a pesar de todas mis faltas, porque son Uds. mis mejores amigas.

A mis abuelos, que hoy ya no están en esta tierra pero que han sido ejemplo de constante lucha, fortaleza y trabajo, a ellos dedico esta tesis. Los llevo siempre en mi corazón.

A mi familia, mi maravilloso marido, amigo y compañero de vida, eres el pilar fundamental de éste gran logro, este trabajo es producto de tu inmensa paciencia, tu tiempo, tu incondicional amor hacia mí y, a mi hijo, un ser tan especial que solo con una sonrisa llena mi vida de motivación y profunda alegría. Por Uds. Todo, con Uds. al infinito y más allá...

DIOS, cada vez que me caí, cada vez que me sentí atrapada, siempre me mostraste la luz que me guiaría a la salida. Un “gracias” no basta para mostrarte mi gratitud. Gracias por ser mi padre y no abandonarme.

Y finalmente, a todos aquellos que no hayan visto sus nombres escritos en estas líneas, pero que saben que de una u otra manera han estado presente durante estos años de mi vida.

“La Ciencia es parte de nuestra naturaleza en la vida”

Anónimo

RESUMEN	9
1. OBJETIVOS	13
2. INTRODUCCIÓN	17
2.1 Alginatos	20
<u>2.1.1 Fundamentos Teóricos: Alginatos</u>	20
<u>2.1.2 Mecanismos de gelificación</u>	28
<u>2.1.3 Caracterización del Gel</u>	31
2.2 Tensioactivos	40
<u>2.2.1 Definición</u>	40
<u>2.2.2 Clasificación</u>	41
<u>2.2.3 Balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de los tensioactivos</u>	42
<u>2.2.4 Tensioactivos de uso alimentario</u>	43
2.3 Emulsiones	44
<u>2.3.1 Conceptos y propiedades</u>	44
<u>2.3.2 Métodos de preparación de emulsiones</u>	47
<u>2.3.3 Estabilidad de las emulsiones</u>	48
2.4 Encapsulación	49
<u>2.4.1 Encapsulación y sus técnicas: Generalidades</u>	50
<u>2.4.2 Técnicas de encapsulación con alginato</u>	53
<u>2.4.3 Antecedentes: aplicaciones de encapsulación con alginato</u>	56
2.5 Diseño Experimental	59
<u>2.5.1 Diseño factorial</u>	60
2.6 Modelos para ajustes cinéticos de liberación	62
<u>2.6.1 Modelos matemáticos mecanicistas o realistas</u>	63
<u>2.6.2 Modelos matemáticos empíricos</u>	68
2.7 Alimentos Funcionales	72
<u>2.7.1 Tendencias en el desarrollo de alimentos funcionales</u>	73
<u>2.7.2 Compuestos bioactivos: Polifenoles</u>	74
2.8 Análisis Sensorial	79

2.8.1 Aspectos Generales.....	80
2.8.2 Métodos de Evaluación Sensorial.....	81
2.8.3 Análisis de Perfil de Textura (TPA).....	83
2.8.4 Ensayo de Resistencia.....	88
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
3.1 Materiales.....	93
3.2 Equipos.....	95
3.3 Técnicas de análisis y caracterización.....	97
3.4 Métodos de preparación.....	101
3.4.1 Caracterización del alginato de sodio.....	101
3.4.2 Preparación de los geles de alginato.....	103
3.4.3 Preparación de las microesferas de alginato en emulsión.....	108
3.4.4 Preparación de las esferas por extrusión.....	118
3.4.5 Métodos de determinación de la liberación del principio activo.....	122
3.4.6 Preparación y análisis de gelatinas para la aplicación de un alimento funcional.....	125
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	133
4.1 Caracterización del alginato de sodio.....	135
4.1.1 Determinación de la composición química.....	135
4.1.2 Determinación de otros compuestos.....	138
4.2 Caracterización reológica de los geles de alginato obtenidos con diferentes sales de calcio y mecanismos de gelificación.....	141
4.2.1 Influencia de la concentración de calcio en los geles preparados por gelificación externa.....	141
4.2.2 Influencia de la fuente de calcio y la concentración en los geles preparados por gelificación interna.....	145
4.2.3 Comparación de las propiedades reológicas entre los geles de alginato obtenidos por gelificación externa y gelificación interna.....	152
4.3 Estudio del método de preparación de las microesferas de alginato en emulsión por gelificación interna.....	155

<u>4.3.1 Obtención de las microesferas de alginato con diferentes sales de calcio y concentraciones en emulsión por gelificación interna</u>	155
<u>4.3.2 Estudio de estabilidad de las emulsiones para la obtención de las microesferas de alginato</u>	162
<u>4.3.3 Estudio de las variables de composición y preparación para la obtención de las microesferas en emulsión por gelificación interna con el principio activo a encapsular</u>	169
<u>4.3.4 Estudio del mecanismo de liberación del principio activo desde las microesferas</u>	188
4.4 Estudio de las esferas de alginato con principio activo preparadas por extrusión con diferentes mecanismos de gelificación	191
<u>4.4.1 Influencia del mecanismo de gelificación, concentración del extracto de cacao y sal de calcio en el tamaño, morfología y textura de las esferas obtenidas por extrusión</u>	192
<u>4.4.2 Estudio del mecanismo de liberación del principio activo desde las esferas preparadas por gelificación externa y gelificación interna</u>	205
4.5 Estudio de un producto alimentario de aplicación funcional con la incorporación de los encapsulados	218
<u>4.5.1 Evaluación sensorial de las gelatinas enriquecidas con los encapsulados</u>	219
<u>4.5.2 Estudio comparativo de las texturas de las gelatinas con y sin la incorporación de encapsulados y su evolución con el tiempo de almacenamiento</u>	220
<u>4.5.3 Evolución de la concentración del principio activo en las gelatinas con el tiempo</u>	229
<u>4.5.4 Influencia del principio activo en la presencia de microorganismos en las gelatinas</u>	231
5. CONCLUSIONES	233
6. RECOMENDACIONES	241
7. BIBLIOGRAFÍA	245
8. GLOSARIO	263
9. APÉNDICES	273
9.1 Datos para la caracterización del alginato sódico: RMN, CET, DSC y refractometría	275
9.2 Propiedades reológicas de los geles de alginato preparados con diferentes fuentes de calcio y mecanismos de gelificación	279

9.3 Datos para la caracterización de las microesferas de alginato en emulsión por gelificación interna.....	288
9.4 Datos para la caracterización del extracto de cacao.....	294
9.5 Viscosidad de la fase dispersa para el estudio de preparación de las microesferas en emulsión por gelificación interna.....	296
9.6 Caracterización de las esferas de alginato/cacao preparadas por extrusión con diferentes mecanismos de gelificación: diámetros, morfología y textura.....	297
9.7 Publicaciones.....	301

La industria alimentaria ha estudiado en los últimos años la encapsulación de compuestos bioactivos para su aplicación en el diseño de alimentos funcionales. Por ello, diferentes trabajos han utilizado los biopolímeros como agentes encapsulantes, ya que proporcionan matrices biodegradables, no tóxicas y versátiles tanto para el consumo humano como para su utilización industrial. El alginato gelificado puede emplearse como encapsulante de compuestos activos, resultando en un producto final que proteja a éstos de factores adversos como el calor y la humedad, mejore su estabilidad y biodisponibilidad, e incluso enmascare o preserve sabores y aromas al hacer funciones de aislante.

En este trabajo se han analizado los mecanismos de gelificación del alginato y las técnicas derivadas para la encapsulación de principios activos en estos geles. En primer lugar, se caracteriza el alginato sódico utilizado y los geles de alginato cálcico preparados por gelificación externa (GE) y gelificación interna (GI). Estos resultados son considerados para el estudio de las diferentes técnicas de encapsulación. Para ello, se ha estudiado cómo formar una emulsión estable que proporcione las microesferas de menor tamaño por GI, así como la encapsulación de compuestos activos en ellas, a través de un diseño experimental. En segundo lugar, se han analizado esferas obtenidas por extrusión con diferentes formulaciones, comparándose su tamaño, morfología y textura. También se ha estudiado la liberación de los polifenoles desde los encapsulados hacia el medio que los rodea y se ha ajustado la curva de liberación a varios modelos propuestos en la bibliografía. Finalizando se han incorporado las esferas más idóneas según las características deseadas en un alimento para su evaluación sensorial.

Del estudio experimental, se concluye que la estructura polimérica del alginato sugiere una contribución equilibrada de sus monómeros con una distribución por bloques heterogénea que proporciona mayor flexibilidad al gel formado. Su alto peso molecular promedio e índice de polidispersidad indican que éste contiene una amplia distribución de diferentes alginatos. Las características viscoelásticas de los geles obtenidos, en general, muestran que un incremento de la $[Ca^{+2}]$ proporciona geles más compactos. Las diferencias observadas entre sus propiedades indican una influencia de la fuente de calcio al utilizar GI, que resulta en geles débiles cuando se forman a partir de $CaCO_3$ atribuido a la presencia de poros debido a la liberación del CO_2 durante la gelificación, geles fuertes pero de estructura irregular a partir de $Ca(OH)_2$ y geles de viscoelasticidad intermedia, aspecto homogéneo y compacto

cuando son formados a partir de citrato cálcico para un determinado rango de concentración de calcio. Para la $[Ca^{+2}]$ mayor utilizada las características reológicas se presentan independientes del tipo de sal. Para esta última $[Ca^{+2}]$ el gel formado por GE muestra un gran carácter sólido atribuido al proceso de formación que tiene lugar en la superficie, donde van llegando los iones calcio desde el exterior y, en consecuencia, se forma una capa externa muy reticulada que ralentiza la difusión de los iones calcio hacia las partes más internas del gel. Los geles formados por GI no muestran propiedades viscoelásticas tan acusadas, pero sí son más homogéneos, mostrando un grado de reticulación similar en la superficie y en el interior del gel, debido a que en este mecanismo de gelificación el calcio ya se encuentra distribuido inicialmente en toda la masa de alginato a gelificar.

Las microesferas de alginato preparadas en emulsión por GI evidencian un efecto de la fuente de calcio en sus tamaños, siendo sensiblemente menores las obtenidas a partir de citrato cálcico. Éstas muestran una superficie uniforme. Por el contrario, las microesferas formadas con el carbonato cálcico presentan una superficie de aspecto poroso atribuido al CO_2 liberado durante la gelificación, lo que podría ocasionar una liberación prematura del compuesto activo encapsulado si se utiliza esta sal.

Las emulsiones preparadas con distintas concentraciones de tensioactivos tipo Spans se presentan muy inestables, mientras que las formadas con PGPR se muestran estables y con un grado de coalescencia considerablemente menor. La distribución de tamaños de las microesferas obtenidas a partir de las diferentes emulsiones y citrato cálcico indican que las microesferas de menor tamaño y polidispersidad se producen con PGPR, debido precisamente a que este tensioactivo forma las emulsiones más estables. Además, se obtiene una correlación entre el tamaño de gota de las emulsiones y las microesferas que indica una contracción importante producto del fenómeno de sinéresis. Al encapsular el extracto de cacao en las microesferas, el diseño experimental muestra que la cantidad de fase dispersa influye significativamente en el porcentaje retenido de polifenoles y que la velocidad de agitación afecta al diámetro medio y la polidispersidad de las microesferas. El aporte de acidez por parte del extracto de cacao induce una pregelificación del alginato antes de la emulsificación lo que lleva a resultados poco reproducibles, cosa que se subsana con un control del pH de la fase dispersa. La encapsulación del compuesto puro no indica efecto alguno de las variables

analizadas en las propiedades de las microesferas dentro del rango estudiado. Por otro lado, el porcentaje retenido de éste sugiere que una cantidad importante se encuentra entre los polifenoles encapsulados en las microesferas con extracto de cacao al considerar que la catequina es uno de sus principales constituyentes fenólicos.

Todas las esferas obtenidas por extrusión se ven afectadas por el aumento de la $[Ca^{+2}]$ al producirse una disminución en sus diámetros, efecto reportado por otros autores y atribuido a la formación de un gel más compacto que produce más sinéresis. La estructura interna de las esferas confirma la influencia del tipo de gelificación, siendo las esferas obtenidas por GE heterogéneas con una capa externa tipo cáscara, mientras que las formadas por GI se presentan más homogéneas. Sus propiedades texturales indican que son más duras las esferas preparadas por GE que las formadas por GI, lo que evidencia la existencia de una capa más rígida en la superficie de éstas cuando se utiliza la GE. Las esferas preparadas por GI muestran una cohesividad superior dada su estructura más homogénea, son más elásticas según la cantidad de extracto utilizada para una misma $[Ca^{+2}]$ y para todas las formulaciones son menos gomosas por lo que requieren menor energía para su ruptura en boca durante la masticación.

La liberación de los polifenoles desde los diferentes encapsulados muestra los mejores ajustes al modelo de *Peppas-Sahlin*, lo que sugiere una cinética dominada por la difusión del compuesto activo a través de los poros de una matriz hinchada producto del mecanismo disolución/relajación. Un aumento de la $[Ca^{+2}]$ induce un retraso en la liberación de los polifenoles desde las diferentes esferas siendo más notable en las obtenidas por GI.

La incorporación de esferas más suaves, menos gomosas con un alto contenido de extracto de cacao y $[Ca^{+2}]$ a un producto alimentario como la gelatina muestra a través de una evaluación sensorial que el sabor astringente y amargo del extracto natural es satisfactoriamente enmascarado debido a su encapsulación al no ser percibido por la mayoría de los panelistas. El análisis del perfil de textura y la prueba de ruptura de las diferentes gelatinas y su evolución con el tiempo de almacenamiento indican que el extracto no se puede añadir directamente a la gelatina sin ser encapsulado, ya que entonces ésta no se forma adecuadamente y, además el contenido fenólico se degrada rápidamente. La incorporación de esferas con extracto de cacao en gelatinas aporta una dureza inferior que las esferas sin

aditivo, cosa que se atribuye a la formación de puentes entre iones calcio y polifenoles que impiden mayores puntos de gelificación en el gel. Las diferencias de dureza y cohesividad entre la gelatina tipo postre y la natural neutra se atribuyen a los ingredientes añadidos donde la fructosa contribuye a una mayor consistencia debido a su capacidad para retener el agua expulsada por parte de las esferas. El contenido fenólico total difundido desde las esferas con cacao a la gelatina es pequeño, evidenciando que una cantidad significativa permanece encapsulada.

1. OBJETIVOS

La evolución humana ha generado cambios en el estilo de vida y en sus hábitos alimentarios y de consumo. Actualmente la elección racional de los alimentos se fundamenta no sólo en satisfacer las necesidades básicas (hambre y proporción de nutrientes), sino también en prevenir las enfermedades relacionadas con la nutrición y mejorar el bienestar físico y mental. En tal sentido, los alimentos denominados funcionales constituyen el segmento del mercado alimentario de mayor crecimiento. En los últimos años, su mayor interés se ha enfocado en el desarrollo de compuestos activos encapsulados para así ofrecer sus múltiples beneficios sin ser dañados por las agresiones del entorno durante el procesado y almacenamiento de los alimentos. Estos encapsulados deben estar formados por matrices biodegradables, no tóxicas y versátiles tanto para el consumo humano como para su utilización industrial. En virtud de las nuevas tendencias alimentarias este trabajo surge por la necesidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de gelificación de alginatos y las técnicas derivadas para la encapsulación de principios activos en estos geles. El objetivo global de este trabajo es el estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales. Para llevar a cabo este estudio se plantean objetivos específicos los cuales se desglosan a continuación:

Objetivos Específicos.

- Caracterización del alginato sódico como material de partida para la preparación de los geles de alginato de calcio.
- Caracterización de las propiedades viscoelásticas de los geles de alginato producido con diferentes sales de calcio y rango de concentraciones empleando diferentes mecanismos de gelificación, así como la influencia del pH en las propiedades del gel.
- Estudio del método de preparación de microesferas de alginato en emulsión por gelificación interna.
- Estudio de la influencia de las diferentes variables de composición y preparación de las microesferas de alginato con el principio activo encapsulado en el tamaño y propiedades de dichas esferas, preparadas por emulsificación y gelificación interna.

OBJETIVOS

- Estudio y caracterización de las esferas de alginato con el principio activo encapsulado, preparadas por el método de extrusión utilizando diferentes mecanismos de gelificación.
- Estudio del mecanismo de liberación del principio activo desde los encapsulados obtenidos con las diferentes técnicas de encapsulación.
- Estudio y evaluación de un producto alimentario funcional.

2. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria y nutracéutica ha estudiado en los últimos años la encapsulación de compuestos bioactivos como herramienta para la aplicación de éstos en alimentos y en la formulación de preparados de liberación controlada a objeto de diseñar alimentos funcionales y/o ingredientes alimentarios. Para ello, diferentes trabajos han estudiado el uso de los biopolímeros como agentes encapsulantes y su efecto sobre la estabilidad e interacción polímero-activo. Estos encapsulados deben estar formados por matrices biodegradables, no tóxicas y versátiles tanto para el consumo humano como para su utilización industrial. En tal sentido, el alginato ha sido utilizado debido a sus múltiples ventajas tanto para el consumo humano como en aplicaciones industriales. Tales aspectos han sido compilados en la literatura por **Imeson (2010)** resaltando el efecto prebiótico de los alginatos de bajo peso molecular, los beneficios de su ingesta como fibra diaria para la reducción de los niveles de azúcar y colesterol en sangre, así como, la capacidad para prolongar la vida útil en productos. Las nuevas tendencias tecnológicas se han enfocado en la producción de alimentos estructurados y funcionales mediante la adición de compuestos activos como antioxidantes, vitaminas, aminoácidos, minerales e incluso de pequeñas moléculas como células, enzimas y microorganismos probióticos beneficiosos para la salud. Estos compuestos activos deben conservarse manteniéndose sus propiedades beneficiosas en los alimentos durante el procesamiento y almacenaje (**Parra-Huertas, 2010**). El alginato gelificado puede utilizarse para ello, a través de las técnicas de encapsulación, resultando en un producto final que permite proteger a los compuestos encapsulados de factores adversos como el calor y la humedad, mejorando así su estabilidad y biodisponibilidad. Además, la encapsulación puede ser usada como medio para enmascarar o preservar sabores y aromas al hacer funciones de aislante (**Lupo et al, 2012**).

Los antioxidantes como fenoles, flavonoides y proantocianidinas retardan o inhiben la oxidación de los lípidos y previenen ciertas enfermedades (**Woodside et al., 1999; Owen et al., 2000; Kris-Etherton et al., 2004**), tales como el cáncer, arterosclerosis neurodegenerativa o inflamatoria y las enfermedades cardiovasculares (**Prior y Gu, 2005**). Teniendo en cuenta los beneficios anteriores y nuevas ideas para reducir el uso de antioxidantes comerciales sintéticos, surge la utilización de extractos naturales ricos en polifenoles como ingredientes activos que pueden ser incorporados en alimentos.

La encapsulación, aplicada con el objetivo de producir alimentos funcionales debe considerar, entre otras cosas, la influencia de la incorporación de las partículas o cápsulas a los alimentos desde el punto de vista organoléptico. Asimismo, el tamaño de éstas podrá afectar a la textura final del alimento. En este orden de ideas, la aplicación de diferentes técnicas de encapsulación debe ser tomada en cuenta dependiendo del producto final deseado. La preparación de microcápsulas o microesferas puede proporcionar tamaños lo suficientemente pequeños para no interferir con la textura y sabor original del alimento. Por otro lado, el uso de cápsulas o esferas perceptibles fácilmente por el consumidor puede ser un factor favorable o no dependiendo del aspecto y textura final que se pretenda dar al producto.

2.1 Alginatos.

El alginato es un componente de la pared celular de las algas pardas (*Phaeophyceae*). Sus propiedades varían de una especie a otra, por tanto su selección para la cosecha se basa tanto en la disponibilidad de la especie como en las propiedades del alginato que contiene (**McHuge, 1987**). Se encuentra formando un complejo insoluble del ácido algínico y sus sales cálcica, magnésica, de estroncio y bario en diferentes proporciones. Su función biológica en las algas consiste en permitir la formación de una estructura intracelular cuya matriz de gel confiere a la planta resistencia mecánica y flexibilidad. Es a causa de su capacidad para retener agua, sus propiedades gelificantes, su acción espesante y estabilizante por lo que es ampliamente empleado industrialmente. La producción global anual de alginato se estima aproximadamente en 38000 toneladas (**Draget, 2000**).

2.1.1 Fundamentos Teóricos: Alginatos.

Los alginatos son considerados hidrocoloides debido a su afinidad por el agua y propiedades reológicas. La composición y arreglo secuencial en la cadena polimérica de los alginatos se relaciona con el origen, de manera que existe una influencia tanto ambiental como genética en su conformación estructural. En consecuencia, su geometría y composición específica proveen propiedades diferentes al polímero. Por ello, la importancia de conocer la distribución de sus

monómeros a lo largo de la cadena y peso molecular promedio, parámetros que están estrechamente relacionados con la funcionabilidad de los alginatos, tales como: solubilidad, viscosidad, estabilidad y formación de geles.

2.1.1.1 *Definición de Hidrocoloide.*

Los hidrocoloides son macromoléculas con una gran afinidad por el agua donde se disuelven en mayor o menor medida, modificando su reología, aumentando la viscosidad del líquido e, incluso, llegando a gelificar dando un aspecto sólido al líquido inicial.

Las fibras con mucha capacidad de absorción de agua, clasificadas como aditivos (agar, alginato, goma arábiga, pectina, entre otros) son cadenas más o menos largas, lineales o ramificadas, de diferentes azúcares y derivados. Según las características de sus cadenas (longitud, ramificaciones y cargas eléctricas), los hidrocoloides pueden ser solubles en frío o pueden requerir un previo tratamiento térmico para que se puedan solubilizar. Estos se clasifican según su origen en naturales o modificados, lo cuales son codificados para ser utilizados como hidrocoloides alimentarios.

- **Hidrocoloides solubles en frío:** no requieren un tratamiento térmico para dar viscosidad o gelificar. Por ejemplo: alginato (E-400 al E-404), goma guar (E-412), goma arábiga (E-414) y goma xantana (E-415).
- **Hidrocoloides solubles con pretratamiento térmico:** necesitan un tratamiento térmico para dar viscosidad o gelificar. El efecto es más apreciable cuando la solución se enfría. Por ejemplo: agar (E-406), pectina (E-440), carragenato (E-407), goma garrofín (E-410), entre otros.

La mayoría de los hidrocoloides son de origen vegetal y se trata de fracciones de fibras más o menos purificadas mediante procesos fisicoquímicos que posteriormente, pueden ser modificadas químicamente para mejorar sus características. Otros, se obtienen por biotecnología, cultivando en grandes reactores algunas especies de microorganismos que secretan mucílagos o gomas.

2.1.1.2 *Estructura del alginato.*

El alginato se ha descrito como un polisacárido lineal poliiónico conformado en su estructura por copolímeros binarios no ramificados del ácido urónico, los cuales son bio-sintetizados mediante enzimas específicas que catalizan la formación de los monómeros de ácido α -L-gulurónico (G; 1-4 enlace ácido α -gulopyranosyluronic C₄) y el ácido β -D-manurónico (M; 1,4-enlace ácido β -D-mannopyranosyluronic C₁). En la estructura en bloques se encuentran generalmente tres tipos de enlaces glucosídicos, incluyendo el diecuatorial (MM), diaxial (GG), y ecuatorial-axial (MG). El bloque-G es más rígido y el más extendido en la configuración de la cadena respecto al bloque-M (**Funami et al., 2009**).

Los bloques G o M, se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo bloques-G (-GGG-), bloques-M (-MMM-) o heteropolímeros donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-) como se aprecia en la Figura 2.1 (**Pawar y Edgar, 2012**). Tanto la distribución de sus monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen de los grupos carboxílicos confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido en G. En alginatos de alto contenido en M, las cadenas son lineales, y tienen la función de ayudar a dar conformación tridimensional aguantando las cadenas G. Por esta razón dan lugar a un tipo de gel dúctil, flexible, elástico y con poca sinéresis. Mientras que, en alginatos de alto contenido en G, las cadenas tienen estructura de zig-zag y permiten una unión más fácil del calcio dándose la forma conocida como “caja de huevos” que proporciona un gel consistente, rígido, quebradizo y con sinéresis (**Cubero et al., 2002**).

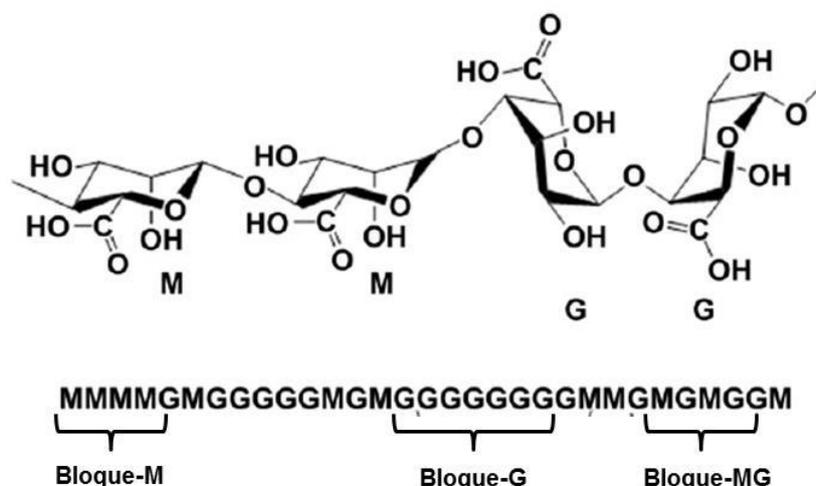


Figura 2.1 Distribución por bloques de los monómeros constituyentes en el polímero de alginato. Tipo de bloque-G, bloque-M y bloque-MG alternado (**Power y Edgar, 2012**).

Diversas investigaciones han demostrado que la distribución de sus monómeros (secuencia) a lo largo de la cadena polimérica no puede describirse de manera suficiente empleando modelos estadísticos. Una información más detallada respecto a la secuencia de sus monómeros, llegó a estar disponible con la introducción de la espectroscopía de alta resolución o resonancia magnética nuclear (NMR) (**Grasdalen et al., 1977, 1981; Grasdalen, 1983**). Esta técnica ha permitido determinar la frecuencia mónada (F_M y F_G), la frecuencia díada (F_{GG} , F_{GM} , F_{MG} y F_{MM}) y las frecuencias tríadas (F_{MGM} y F_{GGM}). El conocimiento de ello, por ejemplo, permite el cálculo de la longitud media de bloques-G mayores de 1 (Ec. 1), la cual se ha demostrado que correlaciona bien con las propiedades de gelificación (**Draget, 2000**).

$$N_{G>1} = (F_G - F_{MGM}) / F_{GGM} \quad (1)$$

Durante el proceso de extracción del alginato, éste puede sufrir degradación en la longitud del polímero debido a las altas temperaturas o por exposición a los rayos UV durante el lavado, lo que puede ser desventajoso para su uso como material de encapsulación al considerar que su biocompatibilidad aumenta con el aumento de la masa molar. Además, durante la producción del alginato comercial suele emplearse mezclas de algas como materia prima. De todo ello, se desprende la importancia de determinar la relación M/G, estructura secuencial y tamaño, al considerar las diferencias existentes entre especies de algas e incluso la presencia de impurezas, información que generalmente no es proporcionada por los fabricantes pero cuyos parámetros dictan las propiedades fisicoquímicas y gelificantes de los alginatos (**Storz et al., 2009**).

2.1.1.3 Solubilidad y Viscosidad.

En general, hay tres parámetros esenciales que determinan y limitan la solubilidad en agua de los alginatos. El pH del medio es importante debido a la necesidad de cargas electrostáticas en los residuos de ácidos urónicos. Un descenso abrupto del pH puede causar la precipitación del ácido algínico (**Draget, 2000**). También es determinante la fuerza iónica del medio y la presencia de iones gelificantes en el disolvente lo que limitaría la solubilidad de los alginatos (**Pawar y**

Edgar, 2012). Este último aspecto, pudiera ser un problema en términos de “dureza” del agua debido al contenido de iones Ca^{+2} . El alginato, en forma de sal sódica, potásica o magnésica es soluble en soluciones acuosas a pH superior de 3,5. Las sales de cationes monovalentes (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{NH}_4^+$) del ácido algínico y su éster de propilenglicol son solubles en agua y pueden actuar como espesantes tixotrópicos o pseudoplásticos en ausencia de iones calcio en el medio. Por el contrario, el ácido algínico y sus sales divalentes o trivalentes son insolubles en agua (**Cubero et al., 2002**).

La viscosidad es la característica principal de las soluciones de alginato y junto a su reactividad frente a los cationes polivalentes, es la que genera características como espesante, estabilizante y gelificante. Con el fin de preparar soluciones efectivas de alginato, es necesario dispersar y disolver completamente las partículas de alginato en el sistema, lo que puede lograrse mediante la adición lenta y progresiva del polímero durante un mezclado con alta cizalladura (**Imeson, 2010**). Una solución viscosa de alginato exhibe un comportamiento pseudoplástico. Esto es una consecuencia de las largas cadenas de polímero y la rigidez de las moléculas hidratadas. A bajas velocidades de cizalla, como por ejemplo durante el almacenamiento o muy baja velocidad de agitación, las moléculas de alginato se encuentran distribuidas al azar debido al movimiento browniano. Al aumentar la velocidad de cizallamiento, las moléculas comienzan a ubicarse en forma paralela ordenándose en la dirección del flujo y disminuyendo, por tanto, la resistencia al fluir. Como resultado, la viscosidad aparente disminuirá cuando la velocidad de cizallamiento se incrementa más allá de la zona newtoniana primaria del sistema (**Imeson, 2010**). Por consiguiente, las soluciones de alginato tienen un comportamiento no newtoniano de tipo pseudoplástico, es decir, que la viscosidad decrece al aumentar el gradiente de velocidad. Este efecto es reversible excepto a velocidades de corte muy elevadas, y es más marcado en soluciones de alginato de alto peso molecular.

El comportamiento del alginato se ve afectado, en general, por los siguientes factores (**Cubero et al., 2002**):

- **Temperatura:** la viscosidad de las soluciones de alginato decrece en aproximadamente un 2,5% por cada grado de incremento en la temperatura, siendo el proceso reversible. Si a este aumento de temperatura se le suma un aumento del pH y del tiempo se consigue una despolimerización de la molécula, lo cual baja la

viscosidad. Tras un proceso de congelación/descongelación se mantiene la viscosidad inicial.

- **pH:** la viscosidad es casi independiente del pH en un rango entre 5 y 10 debido a un efecto repulsivo de los grupos carboxilos cargados negativamente, los que mantienen extendidas las cadenas del polímero e incrementan su capacidad de unión con las moléculas del agua. A pH entre 3 y 3,5 el alginato es insoluble y precipita en forma de ácido algínico, mientras que un incremento del pH por encima de 10 causaría una despolimerización.
- **Fuerza iónica:** la viscosidad de las soluciones del alginato de sodio decrece levemente con la presencia de sales con cationes monovalentes, debido a que, el polímero tiende a contraerse en solución al aumentar la fuerza iónica, efecto que se hace máximo en concentraciones salinas de 0,1 N.
- **Concentración y peso molecular:** la viscosidad de las soluciones de alginato varía con la concentración, incrementándose la viscosidad a mayor cantidad del hidrocoloide. Por otra parte, se ha observado que mayores pesos moleculares el poder espesante resulta mayor. Por ello, la importancia de conocer éstas características a fin de ser mejor aprovechadas al momento de formular un producto (Imeson, 2000).

2.1.1.4 *Estabilidad de las soluciones de alginatos.*

El alginato de sodio puro en polvo puede tener una vida útil de varios meses si se almacena en un lugar seco, fresco y sin exposición a la luz solar. En congelación incluso se conserva varios años sin una reducción significativa del peso molecular. Por el contrario, el ácido algínico seco tiene una estabilidad limitada a temperaturas ordinarias debido a su condición de ácido débil lo que cataliza su degradación. Respecto a las soluciones acuosas de alginato, su estabilidad se ve limitada por diversas causas de degradación. Por ejemplo, a pH muy ácido o alcalino se produce una reducción severa de la viscosidad, que también se observada con la presencia de radicales que oxiden al polímero. Además, debido a que los alginatos son productos naturales, éstos pueden ser atacados por microorganismos para su digestión. El empleo de tratamientos térmicos y de esterilización también propicia el proceso de despolimerización, lo que se evidencia no sólo en la reducción de la

viscosidad relativa sino en la pérdida de la resistencia del gel si ha habido gelificación (**Draget, 2000**).

Las soluciones de alginatos neutros de baja a media viscosidad pueden ser conservadas a 25 °C durante muchos años sin apreciarse pérdidas en la viscosidad siempre que se añada un antimicrobiano. La adición de pequeñas cantidades de calcio puede incrementar la estabilidad de las soluciones de alginato de sodio. Una combinación con ácido fuerte puede causar la precipitación del ácido algínico, mientras que la presencia de álcalis fuertes facilita el rompimiento de la cadena polimérica, degradándola. Las soluciones de alginato de propilenglicol son estables a temperatura ambiente a pH entre 3 y 4, a pH por debajo de 2 y por encima de 6 pierden viscosidad rápidamente (**McHuge, 1987**).

2.1.1.5 *Formación del gel.*

El proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes (excepto el magnesio), de los cuales el ion calcio es el más empleado por la industria alimentaria. La gelificación tiene lugar al producirse una zona de unión entre un bloque-G de una molécula de alginato que se enlaza físicamente a otro bloque-G contenido en otra molécula de alginato a través del ion calcio, formando una configuración espacial tipo bucle en cuyas cavidades se acomodan los cationes divalentes. Este enlace tipo quelato forma así una red intermolecular de tipo matricial. Los bloques-M y bloques-MG no participarán en las zonas de unión, sino que forman los llamados segmentos elásticos en la red del gel. Por ello la proporción de los bloques-G determina la rigidez del gel, como se mencionó anteriormente. La visualización de la estructura física, denominada modelo “caja de huevos” por **Draget (2000)**, se muestra en la Figura 2.2.

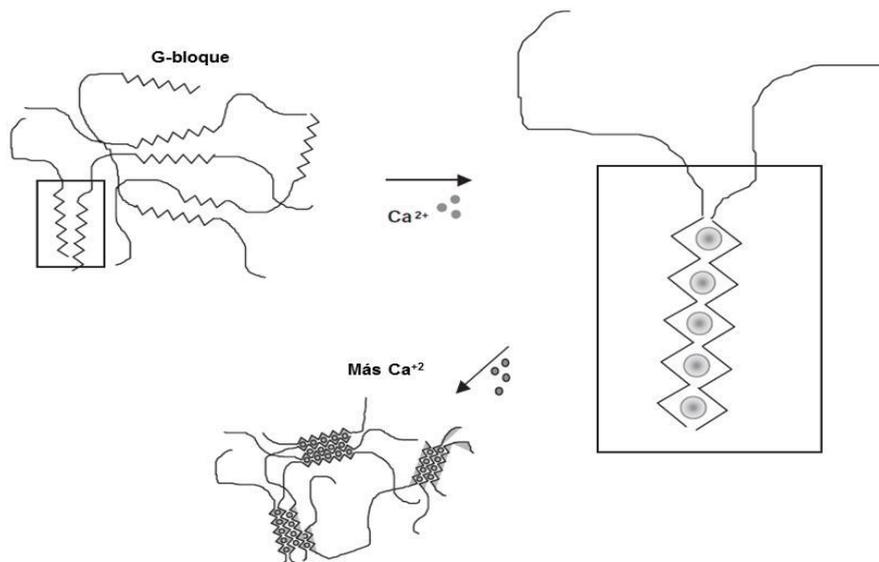


Figura 2.2 Gelificación del alginato con calcio. Modelo “caja de huevos” (Imeson, 2000).

El modelo de “caja de huevos” puede modificarse durante el proceso de formación del gel debido a la proximidad de dos bloques-G. Esta unión originaría zonas de múltiples capas tal como se aprecia en la Figura 2.2. Por tanto, el gel formado sería más resistente. En este sentido, un mayor contenido en G y bloques-G más largos hace al alginato más reactivo y por tanto podrá admitir mayor cantidad de calcio. Por ello, es importante considerar la disponibilidad de iones calcio e incluso el peso molecular de la cadena a fin de formar geles más o menos fuertes, según convenga (Imeson, 2010).

2.1.1.6 Estabilidad del gel.

En contraste con la mayoría de los polisacáridos gelificantes, los geles de alginato tienen la característica particular de ser preparados en frío. Además, los geles de alginatos son termoirreversibles, no obstante resisten bien temperaturas relativamente elevadas (≈ 100 °C). Esta resistencia a la temperatura junto con su poder espesante y rápida gelificación, ha permitido su amplio uso en la elaboración de productos alimentarios, tales como: cremas para hornear, pastelería, postres congelados, jaleas, entre otros (Draget, 2000).

Los alginatos están sujetos a procesos de degradación química. Un tratamiento térmico prolongado a pH bajo o alto puede desestabilizar el gel (Mancini *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 2004). Por otra parte, ya que el gel retiene agua a través

de enlaces de hidrógeno, una vez que éste se contrae entonces expulsa agua. Este efecto denominado sinéresis, es observado comúnmente en diversos sistemas de geles obtenidos de biopolímeros. En los geles de alginato, la sinéresis depende de parámetros tales como el ratio M/G, la concentración de calcio, el mecanismo de gelificación y el peso molecular. El control de estos factores es importante para evitar o disminuir un fenómeno de sinéresis indeseable (**Imeson, 2010**).

Los geles preparados a partir de alginatos de menor peso molecular muestran menor sinéresis respecto a los geles de mayor peso molecular. Esto es probablemente debido a un menor número de segmentos elásticos intactos entre zonas de unión, lo que resulta en una menor capacidad de la red para reorganizarse y contraerse durante el proceso de gelificación. De hecho, los alginatos con altos niveles de bloques-MG, por poseer segmentos elásticos más flexibles, exhiben un mayor grado de sinéresis (**Draget et al., 2001**). En una formulación equilibrada (calcio/alginato) con suficiente calcio para saturar todos los bloques-G, la sinéresis suele ser insignificante, mientras que un exceso de calcio puede agravar el fenómeno. El mecanismo de gelificación interna tiende a dar geles con menos sinéresis en comparación con los preparados por gelificación externa, debido fundamentalmente a que la relación calcio/alginato es más fácil de distribuir en forma más homogénea (**Imeson, 2010**).

2.1.2 Mecanismos de Gelificación.

El proceso de formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de calcio externa o interna desde donde el ion calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica. Como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con características de gel. El grado de gelificación depende de la hidratación del alginato, la concentración del ion calcio y el contenido de los bloques-G (**Funami et al., 2009**). La transición sol-gel se ve esencialmente controlada por la habilidad de introducir el ion vinculante entre las moléculas de alginato. También se ha observado que la cinética de gelificación y las propiedades del gel pueden depender del tipo de contraíón. De hecho, se ha encontrado que los alginatos de potasio presentan un proceso de transición sol-gel más rápido respecto a los alginatos de sodio preparados a bajas concentraciones calcio, probablemente debido a la mayor

afinidad del sodio respecto al alginato, comparada con la de potasio. Y a pesar de que los geles de alginato de calcio obtenidos mostraron semejante estabilidad a simple vista, al ser analizadas sus propiedades reológicas se evidenciaron marcadas diferencias en los módulos elásticos; siendo menores los valores de módulos elásticos para los geles preparados a partir del alginato de sodio que en aquellos con alginato de potasio. En este sentido, se ha señalado que este aspecto de las propiedades viscoelásticas de los geles puede ser contrarrestado utilizando alginatos con mayor composición de ácido gulurónico en su estructura (**Draget, 2000**). La gelificación iónica se ha llevado a cabo fundamentalmente por dos mecanismos: la gelificación externa y la gelificación interna.

2.1.2.1 Gelificación Externa.

El proceso de gelificación externa ocurre al introducir la solución de alginato en otra con presencia de iones calcio. Así se produce la difusión del ion calcio desde dicha solución externa hacia la solución de alginato, de pH neutro. La formación del gel se inicia en la interfase y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio, de manera que el contraión proveniente de la sal de alginato es desplazado por el catión divalente solubilizado en agua. Éste interacciona con los bloques-G de diferentes moléculas poliméricas, enlazándolas entre sí. Aunque, la fuente de calcio más usada ha sido el CaCl_2 debido a su mayor porcentaje de calcio disponible y bajo coste, existen otras sales empleadas con menor frecuencia tales como el acetato monohidratado y el lactato de calcio (**Helgerud et al., 2010**).

2.1.2.2 Gelificación Interna.

El proceso de gelificación interna consiste en la liberación controlada del ion calcio desde una fuente interna de sal de calcio insoluble o parcialmente soluble dispersa previamente en la solución de alginato de sodio. La liberación del ion calcio puede ocurrir mediante dos mecanismos: si se tiene una sal de calcio insoluble a pH neutro pero soluble a pH ácido, se puede adicionar un ácido orgánico a una fase orgánica externa que está en contacto con la solución acuosa de alginato. De este modo, al difundirse los protones hasta la fase acuosa permiten la acidificación del medio, consiguiendo solubilizar los iones calcio. En este caso, las sales de calcio

más empleadas son el carbonato de calcio y el fosfato tricálcico, y en casos específicos el fosfato dicálcico y el citrato tricálcico. Para la acidificación del medio se cuenta con ácidos orgánicos como el acético, adípico y el glucono delta-lactona. Por otro lado, si la sal de calcio es parcialmente soluble, el proceso de gelificación interna se lleva a cabo mediante la adición a la mezcla alginato-sal de calcio de un agente secuestrante como el fosfato, sulfato o citrato de calcio. La adición de un secuestrante evita la formación previa del gel, al producirse un enlace entre dicho agente y el calcio. De este modo, al adicionarse el ácido orgánico se produciría la liberación de los iones calcio y, por tanto, la formación de un gel más homogéneo. El sulfato de calcio ha sido comúnmente el agente secuestrante más empleado debido a su bajo coste y conveniente solubilidad. Los mecanismos de gelificación iónica son descritos en la Figura 2.3.

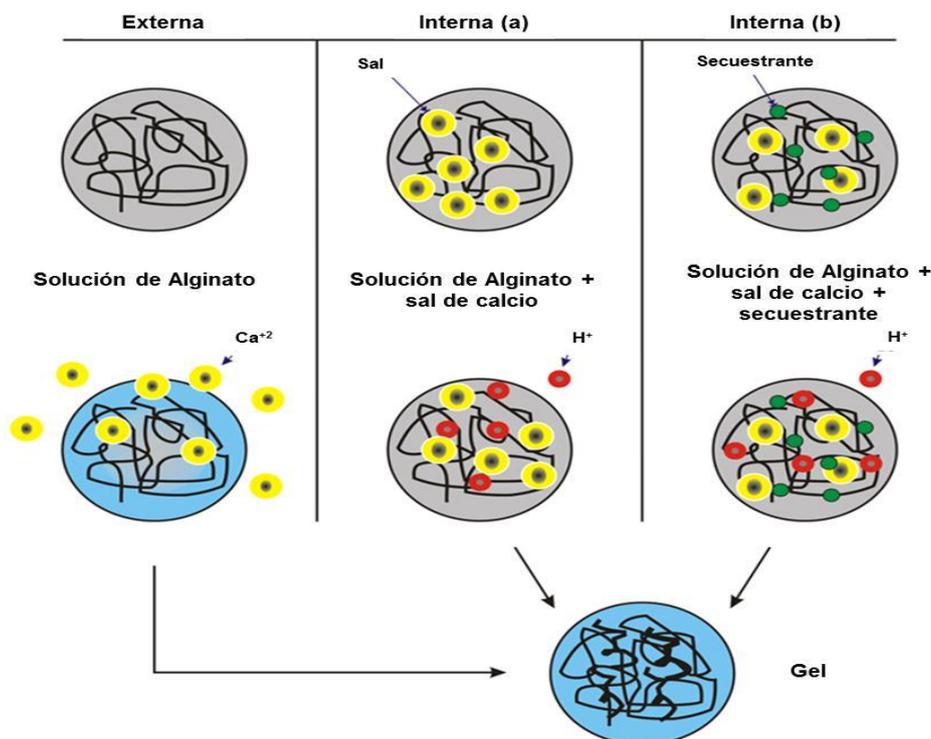


Figura 2.3 Mecanismos de gelificación iónica. Gelificación externa y Gelificación interna: sal insoluble, (a) y sal parcialmente soluble, (b) (Helgerud *et al.*, 2010).

La principal diferencia entre el mecanismo de gelificación externa e interna es la procedencia de la fuente calcio. Si lo que se pretende es el control de la transición sol-gel, en el proceso de gelificación externa los factores a manipular son la concentración de calcio y composición del polímero, mientras que para el proceso de gelificación interna se deben considerar la solubilidad y concentración de la sal de

calcio, concentración del agente secuestrante y del ácido orgánico empleado (Draget, 2000).

2.1.3 Caracterización del Gel.

Un gel es un sistema coloidal donde la fase continua es sólida y la dispersa es líquida. Al tener esta consideración, se entiende que los geles presentan una densidad similar a los líquidos, aunque su estructura se asemeje más a un sólido. Por ello, es importante estudiar las características del gel mediante el uso de la Reología como ciencia que estudia la deformación y flujo de los materiales sometidos a fuerzas externas. El comportamiento reológico de un material, puede predecir su flujo en distintas condiciones, e incluso relacionarse con su microestructura. En este sentido, son de gran importancia las técnicas viscoelásticas. Idealmente, los sólidos se deforman elásticamente y la energía de deformación se recupera totalmente al desaparecer la fuerza externa, regresando a su forma original, mientras que los fluidos se deforman irreversiblemente, es decir, su energía se disipa en forma de calor y, por tanto, no recuperan su forma inicial. En la mayoría de los casos, los materiales presentan en mayor o menor grado ambas características simultáneamente, lo que se conoce como características viscoelásticas.

2.1.3.1 *Reología.*

La Reología es la ciencia que estudia el flujo y deformación de un material al ser sometido a esfuerzos externos. En concreto analiza la relación existente entre las variables de esfuerzo cortante (σ), deformación (y) y gradiente de velocidad (dV / dy), mostradas en la Figura 2.4. En este sentido, se aplica una fuerza en una dirección sobre una superficie. El cociente entre dicha fuerza y la superficie en la que aplica se define como el esfuerzo cortante. El cambio de velocidad de los elementos del fluido en la dirección perpendicular de las placas (dirección y) es el gradiente de velocidad. Dependiendo de cómo sea esta relación los materiales presentan comportamientos reológicos diferentes y únicos.

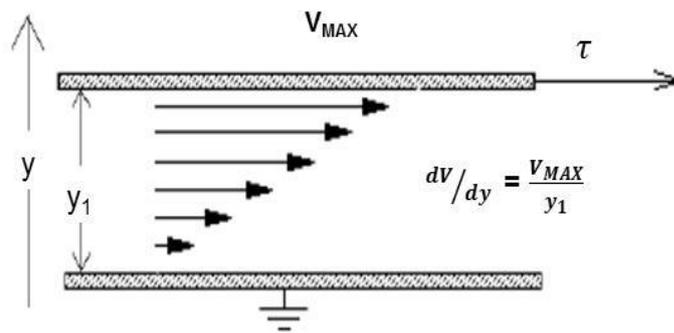


Figura 2.4 Flujo entre dos placas paralelas (Maestro, 2002).

Las propiedades reológicas de los materiales son producto del comportamiento del material. El estudio reológico de un material permite caracterizarlo, y por tanto, determinar su comportamiento en distintas condiciones durante su fabricación, transporte, almacenamiento o utilización (Maestro, 2002).

Como fluido se entiende toda porción de materia capaz de deformarse continuamente cuando es sujeta a una fuerza o deformación, a diferencia de los sólidos que no se deforman o sólo se deforman hasta cierto punto. En tal sentido, el comportamiento de los fluidos se puede acotar en dos casos. En los fluidos puramente viscosos donde la energía de deformación no se recupera al desaparecer la fuerza aplicada sino que se disipa completamente en forma de calor por lo que no recuperan su forma inicial. Este comportamiento sigue la ecuación de la ley de *Newton*:

$$\sigma = \eta \frac{dV}{dy} = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (2)$$

Donde $\dot{\gamma}$ es el gradiente de velocidad o velocidad de deformación y η la viscosidad.

En un sólido puramente elástico, la energía de deformación se recupera totalmente al desaparecer la fuerza, recuperándose la forma inicial. Este comportamiento sigue la ecuación de la ley de *Hooke*:

$$\sigma = G \cdot \gamma \quad (3)$$

Donde G es la constante de proporcionalidad o módulo elástico y γ la deformación instantánea.

En esta clasificación de los comportamientos reológicos de los materiales con relación a sus respuestas respecto a los esfuerzos aplicados se ha de introducir un nuevo parámetro que es la escala del tiempo en la cual se aplica la deformación. Para ello, se define una magnitud que tenga en cuenta el tiempo de observación o experimental y el tiempo de relajación o tiempo que requiere un material para adaptarse a una deformación. La relación entre el tiempo de relajación y el de observación es el número de Deborah (D). En este sentido se puede decir que los sólidos tienen un tiempo de relajación infinito, y, por tanto, un D muy grande que podría definirse como un comportamiento elástico. Mientras que en un líquido este valor se aproxima a cero y, por tanto, el D es muy pequeño lo que podría describirse como un comportamiento de tipo viscoso.

Los materiales viscoelásticos tienen un comportamiento intermedio que se puede modelizar como una combinación de los anteriores casos. Al margen de ello, es importante destacar que los materiales pueden ser clasificados según su comportamiento reológico como fluidos newtonianos y fluidos no newtonianos. Estos son descritos desde el punto de vista de la dependencia de su viscosidad en estado estacionario con el gradiente de velocidad o el esfuerzo aplicado (**Ferry, 1980**).

- **Fluidos Newtonianos:** son fluidos en los que el esfuerzo cortante es una función lineal de la velocidad de corte, es decir, siguen la ecuación de Newton, y su viscosidad es por tanto una magnitud de estado, constante y dependiente sólo de presión y temperatura. Este comportamiento es propio de fluidos no estructurados. Su comportamiento reológico, suele representarse mediante el gráfico que relaciona los valores de τ con el gradiente de velocidad. En este caso, el reograma es una simple línea recta que pasa por el origen y el valor de su pendiente es μ , conocido como viscosidad dinámica.

- **Fluidos no Newtonianos:** son fluidos cuyo comportamiento no se ajusta al de un líquido newtoniano, sino que la viscosidad cambia con el gradiente de velocidad, al menos en un cierto rango de esfuerzos. Estos fluidos suelen ser sistemas estructurados, dispersos (emulsiones) o soluciones de macromoléculas (plásticos, fluidos biológicos). Un fluido no newtoniano puede tener comportamiento newtoniano en un cierto rango de esfuerzos lo suficientemente bajos como para no modificar su estructura. Sin embargo, la aplicación de un esfuerzo superior a un esfuerzo crítico modifica la estructura y, por lo tanto, la viscosidad del fluido. Por ello,

el concepto de viscosidad como propiedad intrínseca desaparece y, en todo caso, puede hablarse de una viscosidad aparente ($\eta' = \sigma/\dot{\gamma}$). Se distinguen dos grandes grupos de fluidos no newtonianos: los independientes del tiempo y los dependientes del tiempo.

Independientes de tiempo: son aquellos para los que la viscosidad aparente sólo depende del esfuerzo cortante o el gradiente de velocidad aplicado. Por tanto, necesitan un mínimo valor de esfuerzo para que el fluido se ponga en movimiento.

La gran mayoría de fluidos no newtonianos son de tipo pseudoplástico, donde la viscosidad aparente disminuye a medida que aumenta el esfuerzo cortante o el gradiente de velocidad a fin que fluya. Sin embargo, pueden presentar una zona de comportamiento newtoniano a esfuerzos o gradientes bajos, los suficientemente pequeños como para no modificar la estructura interna del material.

Los fluidos dilatantes son menos comunes y en ellos su viscosidad aumenta con el esfuerzo cortante o el gradiente (**Malkin y Isayev, 2006**). Estos fluidos siguen la ley de la Potencia:

$$\sigma = k\dot{\gamma}^n \quad (4)$$

Donde k es el índice de consistencia y n es el índice de comportamiento. Si n es menor que la unidad el fluido es pseudoplástico, y la viscosidad aparente del mismo disminuye con el aumento del esfuerzo o del gradiente (comportamiento de *shear thinning*). Si n es mayor que la unidad el fluido es dilatante y su viscosidad aparente aumenta al aumentar el esfuerzo o el gradiente (comportamiento *shear thickening*).

Los plásticos de *Bingham* la única diferencia con los newtonianos es que la relación entre el esfuerzo y la velocidad de corte no pasa por el origen debido a que se presentan un esfuerzo umbral por debajo del cual no fluyen. Los fluidos denominados plásticos generales se ajustan a la ecuación:

$$\sigma = \sigma_0 + k\dot{\gamma}^n \quad (5)$$

Los plásticos generales incluyen, naturalmente, a todos los demás fluidos de menos parámetros (si $\sigma_0 = 0$ se trata de un pseudoplástico o dilatante, si $n = 1$ es un plástico de *Bingham* y si se dan ambas cosas a la vez es un fluido newtoniano).

Dependientes del tiempo: son aquellos en los que la viscosidad varía con el tiempo, así como con el gradiente de velocidad y la temperatura, debido a que su estructura depende de su historia o de sus deformaciones anteriores. Se trata de los fluidos cuya estructura no se adapta instantáneamente a la deformación aplicada, sino que tarda un tiempo en alcanzarse la estructura en equilibrio, variando mientras tanto sus propiedades reológicas. Este tipo de fluido presenta una propiedad denominada tixotropía (**Malkin y Isayev, 2006**). Dicha propiedad se produce cuando bajo la acción de un esfuerzo cortante constante, alguna de sus propiedades decrece isotérmicamente, y con capacidad de recuperar su valor inicial una vez cese dicha acción. La propiedad de más interés sujeta a estos cambios es la viscosidad.

2.1.3.2 *Comportamiento Viscoelástico de los fluidos.*

Como se ha dicho, la reología implica relacionar el esfuerzo cortante, la deformación y el tiempo mediante una ecuación reológica de estado. Los materiales viscoelásticos se caracterizan por mostrar un flujo viscoso combinado con deformación elástica, cuando se les somete a un esfuerzo. Puede expresarse matemáticamente el comportamiento viscoelástico de los fluidos mediante análogos mecánicos que se combinan de diversos modos, las ecuaciones expresadas por la ley de *Newton* (Ec. 2) y ley de *Hooke* (Ec. 3).

Los modelos más sencillos empleados para explicar el comportamiento de materiales viscoelásticos son los modelos de *Maxwell* y *Kelvin* simples. En el modelo de *Maxwell*, cuyo análogo mecánico consta de un muelle ideal de tipo *Hooke* conectado en serie a un amortiguador de *Newton*, la aplicación de un esfuerzo causa un alargamiento instantáneo, correspondiente al muelle, seguido de la respuesta lenta del pistón en el cilindro del amortiguador. En contrapartida, el modelo de *Kelvin* consta de una conexión muelle-amortiguador en paralelo donde la respuesta elástica se retrasa debido a la resistencia viscosa del fluido del amortiguador (**Seymour y Carraher, 2002**). En general, el modelo de *Maxwell* se utiliza para describir el comportamiento de los líquidos viscoelásticos, mientras que el modelo de *Kelvin* se ajusta mejor a sólidos viscoelásticos.

Para el modelo de *Maxwell*, la deformación total será la suma de las deformaciones de los elementos muelle y amortiguador colocados en serie. Si esto

se expresa de modo diferencial se obtiene para la velocidad de deformación la expresión:

$$\dot{\gamma} = \frac{\sigma}{\eta} + \frac{\dot{\sigma}}{G} \quad (6)$$

Donde G es el módulo de elasticidad que describe el componente elástico y η es la viscosidad relacionada con el componente viscoso.

En el caso del modelo de *Kelvin*, en el que el muelle y el amortiguador están situados en paralelo, la deformación total es igual a la deformación de cada elemento individual, mientras que el esfuerzo total es la suma de cada uno de los dos esfuerzos. La ecuación resultante es:

$$\sigma = G\gamma + \eta\dot{\gamma} \quad (7)$$

En el caso de que tanto el esfuerzo como la deformación sean lo suficientemente pequeños como para que ambas magnitudes se puedan describir a lo largo del tiempo mediante ecuaciones diferenciales lineales de coeficientes constantes, el material se encuentra dentro del rango de *viscoelasticidad lineal*. En este rango la relación entre el esfuerzo y la deformación sólo es función del tiempo o de la frecuencia, pero no depende de la magnitud del esfuerzo o deformación aplicados, porque éstos no son lo suficientemente grandes como para modificar la estructura del material. Por ello, el comportamiento viscoelástico lineal de los materiales puede relacionarse con su estructura interna, si se utilizan ensayos de viscoelasticidad lineal para caracterizar los materiales. En este caso particular, las ecuaciones de estado pueden ser relativamente sencillas. Ahora bien, si las deformaciones son grandes, de manera que la relación entre el esfuerzo cortante y la deformación depende de este esfuerzo, entonces el material tiene comportamiento viscoelástico no lineal y su ecuación de estado se complica (**Maestro, 2002**).

2.1.3.3 Caracterización de materiales viscoelásticos.

Las funciones viscoelásticas que se utilizan para describir el comportamiento de los materiales dependen del sistema experimental que se dispone. Los ensayos de caracterización viscoelástica se describen a continuación (**Ferry, 1980**):

- **Ensayo de fluencia:** consiste en aplicar un esfuerzo cortante constante a un material inicialmente en reposo y medir cómo varía la deformación con el tiempo. La función viscoelástica obtenida en este ensayo es la capacitancia $J(t)$, que se define como el cociente entre la deformación y el esfuerzo.
- **Ensayo de relajación del esfuerzo:** consiste en aplicar una deformación de forma instantánea, como función escalón, y medir la variación del esfuerzo cortante con el tiempo.

Las propiedades viscoelásticas de los geles pueden describir tanto el proceso de gelificación como las propiedades finales de un gel. Es necesario que el método utilizado permita una medida rápida sin alterar el sistema en el intervalo de respuesta lineal. Estos requisitos hacen que en algunos casos no sea adecuado usar métodos transitorios como las medidas de fluencia o relajación explicadas anteriormente. Los métodos reológicos dinámicos, donde se aplica un esfuerzo o deformación oscilatoria, se pueden usar de forma alternativa.

- **Ensayos oscilatorios:** consisten en aplicar al material un esfuerzo o deformación que pueda variarse periódicamente, siguiendo una función sinusoidal a una determinada frecuencia. Las deformaciones deben ser de pequeña amplitud para mantenerse en el rango de respuestas lineales. Por ejemplo, la deformación de tipo sinusoidal puede seguir la siguiente función.

$$\gamma(t) = \gamma_0 \text{Sen}(\omega t) \quad (8)$$

Donde, γ_0 es la amplitud de la deformación y ω la frecuencia de oscilación. Lo que se mide es el esfuerzo cortante necesario para aplicar esta deformación y su variación con la frecuencia. En el caso de un sólido elástico, el esfuerzo cortante será máximo cuando la deformación sea máxima, es decir, cuando $\text{Sen}(\omega t) = 1$ y, por tanto, ωt sea un número impar de veces $\pi/2$. Por tanto, la respuesta del material estará en fase con la perturbación aplicada:

$$\sigma = \sigma_0 \text{Sen}(\omega t) \quad (9)$$

Si el material es viscoso puro, el esfuerzo cortante será máximo cuando sea máxima la velocidad de deformación, que, al ser la derivada de la deformación respecto al tiempo, viene dada por la expresión:

$$\gamma = \frac{d\gamma}{dt} = \gamma_0 \omega \text{Cos}(\omega t) \quad (10)$$

Es decir, que sigue la función:

$$\sigma = \sigma_0 \text{Cos}(\omega t) = \sigma_0 \text{Sen}\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right) \quad (11)$$

Se observa, por tanto, que en el caso de un sólido elástico el esfuerzo cortante está en fase con la deformación, mientras que en el caso de un líquido viscoso existe un desfase de $\pi/2$ radianes (Figura 2.5). Por lo tanto, un fluido viscoelástico presentará un desfase entre 0 y $\pi/2$, y el ángulo de desfase indicará la relación entre elasticidad y viscosidad, y dependerá de la frecuencia de oscilación. Por ejemplo, a frecuencias muy altas, correspondientes a tiempos de ensayo muy cortos (inverso de la frecuencia), el material no tiene tiempo de relajarse y su comportamiento se acerca al de un sólido elástico, con ángulo de desfase pequeño. Por el contrario, a frecuencias bajas, el material tiene tiempo de relajarse y fluir y, por tanto, su comportamiento es más viscoso, lo que implica un ángulo de desfase mayor.

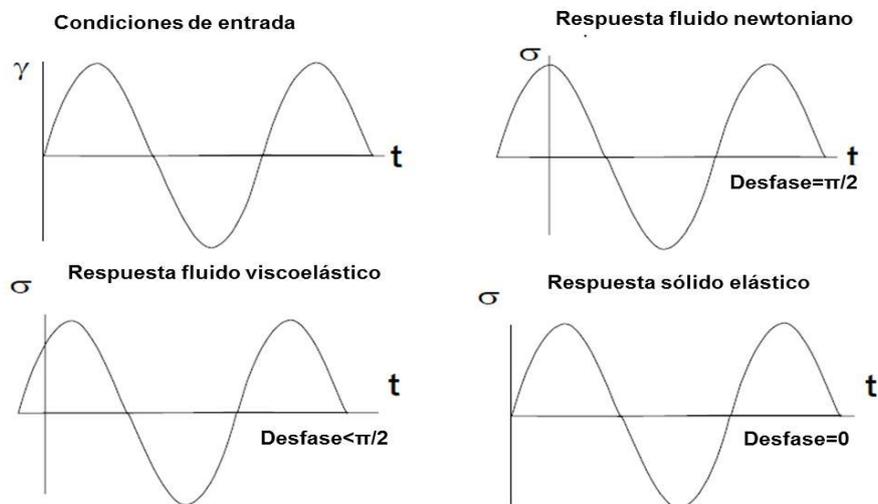


Figura 2.5 Ensayo oscilatorio (Maestro, 2002).

Si δ es el ángulo de desfase, que dependerá de ω , y se tiene en cuenta que σ_0 es proporcional a γ_0 y depende de ω se puede expresar la respuesta σ como:

$$\sigma = G^* \gamma_0 \text{Sen}(\omega t + \delta) \quad (12)$$

Donde, G^* es la constante de proporcionalidad entre las amplitudes del esfuerzo y la deformación, y se denomina módulo complejo. No obstante, son más usados los módulos de almacenamiento G' y de pérdidas G'' dados por las expresiones:

$$G' = G^* \cos \delta \quad (13)$$

$$G'' = G^* \sin \delta \quad (14)$$

G' y G'' se relacionan, por tanto, con el esfuerzo cortante mediante la ecuación:

$$\sigma = G' \gamma_0 \sin(\omega t) + G'' \gamma_0 \cos(\omega t) \quad (15)$$

Estas funciones presentan la ventaja de tener sentido físico. Así, el módulo de almacenamiento (G') está relacionado con la respuesta σ en fase con γ y, por tanto, con la parte de energía que queda almacenada y puede recuperarse. Es decir, es una medida de la elasticidad. El módulo de pérdidas (G'') indica la parte de σ desfasada $\pi/2$ radianes respecto a γ y está relacionado con la energía que se disipa. Es, por tanto, una medida del carácter viscoso del material. G^* se puede expresar en función de G' y G'' tal como muestra la Ec. 16:

$$G^* = G' + iG'' \quad (16)$$

Asimismo, el G^* se puede expresar gráficamente como función de la frecuencia (Figura 2.6).

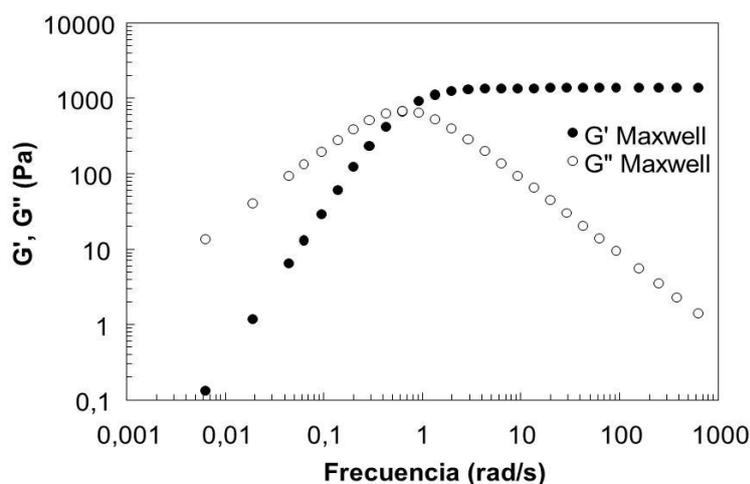


Figura 2.6 Ensayo oscilatorio para un fluido de Maxwell (Maestro, 2002).

2.2 Tensioactivos.

Este apartado pretende introducir el uso de los compuestos tensioactivos como estabilizantes en las emulsiones, considerando que parte del estudio de encapsulación con alginatos, tiene como objetivo estudiar la formación de microesferas en emulsión por gelificación interna. En el proceso de formación de las microesferas por GI la reacción de gelificación ocurre en las pequeñas gotas de alginato dispersas en aceite. Para estabilizar estas gotas en el seno de la fase orgánica se utilizan tensioactivos. En este sentido, a continuación se introducen definiciones básicas, propiedades, su clasificación y aplicaciones para uso alimentario.

2.2.1 Definición.

La mayoría de emulsiones estables se consiguen por la presencia de agentes emulsionantes que se sitúan en la interfase líquido-líquido. Estos agentes emulsionantes o tensioactivos juegan un papel importante en la formación y estabilidad de las emulsiones. Los tensioactivos son sustancias con una estructura molecular que consta de una parte hidrófila y una parte hidrófoba. La parte hidrófoba o lipófila suele estar formada por una cadena hidrocarbonada (lineal o ramificada), mientras que la parte hidrófila está constituida por grupos iónicos o polares (**Falbe, 1987**). Se representan esquemáticamente con formas similares a la mostrada en la Figura 2.7. El hecho de que coexistan estas dos porciones estructuralmente diferentes en una misma molécula constituye lo que se conoce como estructura anfifílica.

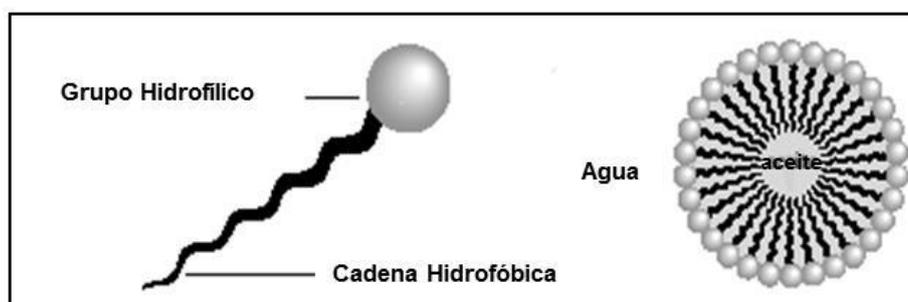


Figura 2.7 Esquema de una molécula de tensioactivo y gota de aceite estabilizada por un tensioactivo. “Obtenida de <http://www.sciencelearn.org.nz>” (2012).

Debido a dicha característica anfifílica, tienden a situarse en las interfases, con la parte hidrofílica hacia el agua y la hidrofóbica hacia el aire (superficie) o hacia la fase aceite, disminuyendo la tensión superficial e interfacial. El exceso de tensioactivo forma micelas o agrupaciones en las que en fase acuosa las cabezas hidrofílicas del tensioactivo se orientan hacia el agua y las colas hidrofóbicas de los tensioactivos se agrupan entre sí para no estar en contacto con el agua, además, la cadena hidrófoba tiene que poseer ocho o más átomos de carbono (hidrofobicidad mínima).

La naturaleza dual (polar-apolar) de los tensioactivos y en particular el equilibrio entre las porciones hidrófoba e hidrófila de la molécula se conoce como balance hidrófilo-lipófilo (HLB). Es la característica responsable de los fenómenos de actividad superficial y de agregación supramolecular de los tensioactivos. Estas características proporcionan a los tensioactivos sus numerosas aplicaciones y permiten el desarrollo de productos industriales (**Rosen, 2004**).

2.2.2 Clasificación.

Dependiendo de la naturaleza de la fracción polar los tensioactivos se clasifican en aniónicos, catiónicos, anfóteros y no iónicos.

- **Tensioactivos aniónicos:** contienen un grupo hidrófobo hidrocarbonado conectado con uno o más grupos hidrofílicos. En solución acuosa, el grupo hidrófilo presenta carga negativa. Todos ellos poseen un contraión que suele ser de Na^+ .
- **Tensioactivos catiónicos:** contienen un grupo hidrófobo hidrocarbonado conectado con uno o más grupos hidrófilos. En este caso, el grupo hidrófilo resulta cargado positivamente en solución acuosa.
- **Tensioactivos anfóteros:** en ellos el grupo hidrofílico puede presentar carga positiva o negativa en función del pH del medio.
- **Tensioactivos no-iónicos:** son sustancias activas superficialmente que, sin ionizarse, se solubilizan. La solubilidad de estas sustancias en agua viene dada por el grupo hidrófilo de carácter polar.

2.2.3 Balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de los tensioactivos.

El balance hidrofílico-lipofílico de los tensioactivos es una medida de su anfifilicidad, que es una medida de la eficiencia y fuerza relativa entre las partes polares y apolares de la molécula. El concepto de HLB se introdujo por **Griffin (1949)** como una escala empírica que proporciona información del comportamiento hidrofílico o lipofílico del tensioactivo para su aplicación en campos tales como la detergencia o la estabilización de emulsiones. Originalmente fue utilizado para clasificar los tensioactivos de la serie “Span” y “Tween”. El sistema HLB ha sido aplicado a muchos otros tensioactivos, incluidos los tensioactivos iónicos y anfóteros.

Este balance, se basa en asignar a cada tensioactivo un número adimensional, denominado número HLB, de valores comprendidos entre 0 y 20 para los tensioactivos no iónicos que proporciona información sobre la solubilidad en agua y aceite. Los tensioactivos con un HLB < 9 son tensioactivos solubles en disolventes apolares, es decir, tensioactivos lipofílicos, por lo que se suelen usar para estabilizar emulsiones agua en aceite (W/O). Por el contrario, los tensioactivos con valores de HLB altos presentan afinidad por disolventes polares y se usan para estabilizar emulsiones aceite en agua (O/W). En general, se obtienen emulsiones W/O con tensioactivos de HLB comprendidos entre 3 y 8; y emulsiones O/W con tensioactivos de HLB comprendidos entre 8 y 18 (**Schramm, 2005**).

Para tensioactivos no iónicos el parámetro HLB se puede calcular como:

$$HLB = \frac{H}{H+L} \cdot 20 \quad (17)$$

Donde, H es la masa molecular de los grupos hidrofílicos de la molécula tensioactiva y L es la masa molecular de los grupos lipofílicos de la molécula tensioactiva. En la Tabla 2.1, se muestra la relación existente entre el valor del HLB, la solubilidad del tensioactivo en agua y su aplicación (**Rosen, 2004**).

Tabla 2.1 Relación valores HLB, solubilidad y aplicaciones.

HLB	Aplicaciones	Solubilidad en agua	Estado del tensioactivo en agua
3 – 6	Emulsiones W/O	1 – 4	No dispersable
7 – 9	Agente humectante	3 – 6	Poco dispersable
8 – 15	Emulsiones O/W	6 – 8	Dispersión turbia inestable
13 – 15	Detergente	8 – 10	Dispersión turbia estable
		10 – 13	Dispersión translúcida
15 - 18	Solubilizador	13	Solución transparente

Un HLB adecuado puede conseguirse mezclando tensioactivos con distintos HLB en proporciones diversas o mezclando tensioactivos con otros compuestos, denominados cotensioactivos. El HLB de la mezcla de tensioactivos se determina mediante la regla lineal introducida por **Huibers (1997)** en la que las fracciones en peso de cada componente se multiplica por el HLB correspondiente, expresada como:

$$HLB_{mezcla} = w_A \cdot HLB_A + w_B \cdot HLB_B \quad (18)$$

Donde, w es la fracción en peso.

2.2.4 Tensioactivos de uso alimentario.

La industria alimentaria es una de las muchas industrias que dependen en gran medida del uso de emulsiones y tensioactivos. Los productos tales como, refrescos, leche, cremas, aderezos para ensaladas, mayonesa, salsas, sopas, mantequilla y margarina son ejemplos de emulsiones. Los tensioactivos más utilizados son los anfifílicos naturales como las proteínas, polisacáridos y fosfolípidos (**Guzey y McClements, 2006**). Una visión general de tensioactivos alimentarios y su número de identificación según el estatus legal se presenta en la Tabla 2.2 (**Friberg et al., 2005**).

Tabla 2.2 Tensioactivos alimentarios.

Nombre Químico	Abreviación	CAD	Código
Lecitina	-	No limitado	E-322
Monodiglicéridos	MAG	No limitado	E-471
Éster Monoglicérido del ácido acético	ACETEM	No limitado	E-472a
Éster Monoglicérido del ácido láctico	LACTEM	No limitado	E-472b
Ácidos grasos de ésteres poliglicerol	PGE	0 - 25	E-475
Poliricinoleato de poliglicerol	PGPR	0 – 7,5	E-476
Monoestearato sorbitán	SMS	0 - 25	E-491
Triestearato sorbitán	STS	0 – 15	E-492
Polisorbato 60	PS 60	0 – 25	E-435
Polisorbato 65	PS 65	0 – 25	E-436
Polisorbato 80	PS 80	0 - 25	E-433

CAD: consumo aceptable diario en mg/kg peso corporal por día (a). Generalmente reconocido como seguro (b).

2.3 Emulsiones.

Este apartado pretende justificar el uso de las emulsiones como medio para el proceso de gelificación de pequeñas gotas de alginato. En este sentido, el apartado anterior hizo mención al empleo de tensioactivos como compuestos estabilizantes de las emulsiones. Por tanto, primeramente se hace una breve reseña de conceptos y propiedades. Seguidamente, de los métodos de preparación de las emulsiones y por último, de la importancia de la estabilidad de las emulsiones y los fenómenos más comunes de desestabilización que sufren con el tiempo.

2.3.1 Conceptos y propiedades.

Una de las definiciones más precisa y completa ha sido la propuesta por **Becher (1972)**: “Una emulsión es un sistema heterogéneo termodinámicamente inestable, formado al menos por dos fases líquidas no miscibles, de las cuales una está dispersa en la otra bajo forma de pequeñas gotas cuyo diámetro es en general

superior a 0,1 μm . Tal sistema posee una estabilidad mínima que puede aumentarse por adición de agentes estabilizantes o tensioactivos”.

Las emulsiones tienen importancia en muchas aplicaciones de diversos campos como pueden ser la alimentación o la industria farmacéutica. Las emulsiones pueden estar constituidas por dos o más fases líquidas donde una de ellas, denominada fase dispersa, se encuentra finamente dividida en el seno de la otra fase, denominada fase continua. Se pueden formar dos tipos de emulsiones. Como se puede observar en la Figura 2.8, las emulsiones cuya fase continua es agua se llaman emulsiones O/W, y si por el contrario tienen como fase continua el aceite se llaman emulsiones W/O.

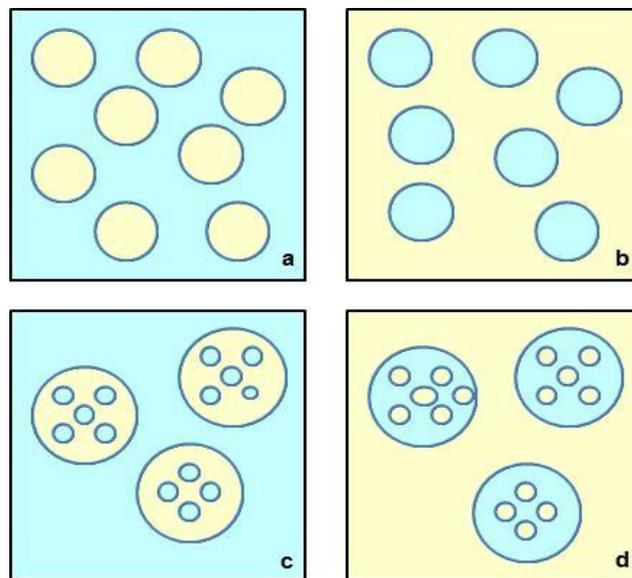


Figura 2.8 Representación de diferentes tipos de emulsiones. Emulsión aceite en agua (O/W), a; emulsión agua en aceite (W/O), b; emulsión agua en aceite en agua (W/O/W), c y emulsión aceite en agua en aceite (O/W/O), d.

También se pueden encontrar emulsiones múltiples, es decir, emulsiones de aceite en agua en aceite (O/W/O) y agua en aceite en agua (W/O/W). El tipo de emulsión que se forma depende de distintos factores. Si la relación de volúmenes de las fases es muy grande o muy pequeña, la fase que tiene el volumen más pequeño normalmente es la fase dispersa, pero no siempre es así, dependiendo de la naturaleza del tensioactivo y del modo en el cual se ha preparado la emulsión (**Schramm, 2005**). La Figura 2.9, muestra la clasificación que reciben las emulsiones en función de la fracción de volumen ocupada por la fase dispersa (φ) según sea el caso:

- Emulsiones diluidas, sí $\varphi < 0,2$.
- Emulsiones concentradas sí $0,2 < \varphi < 0,74$.
- Emulsiones altamente concentradas con $> \varphi 0,74$.

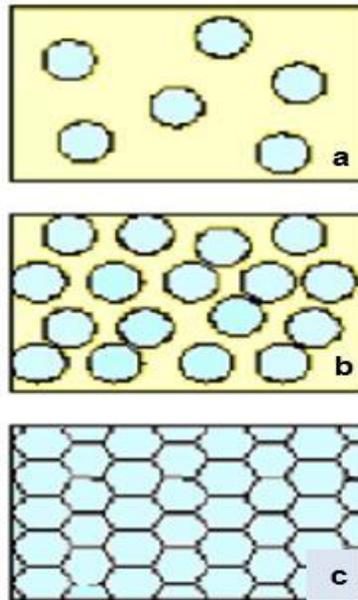


Figura 2.9 Tipos de emulsiones en función de la fracción volumen (φ). Emulsiones diluidas, a; emulsiones concentradas, b y emulsiones altamente concentradas, c.

La fase interna de una emulsión se dispersa en gotas de un diámetro en general menor de $0,25 \mu\text{m}$. Las gotas de mayor tamaño encontradas en emulsiones estables han sido aproximadamente 100 veces mayores, es decir, sobre $25 \mu\text{m}$ (**Becher, 1972**). La Tabla 2.3, muestra el efecto del tamaño de la gota en la apariencia de las emulsiones planteado por **Griffin**:

Tabla 2.3 Apariencia de la emulsión según tamaño de la partícula.

Tamaño	Apariencia
Macroglobulos	Se pueden distinguir dos fases
$\varnothing > 1 \mu\text{m}$	Emulsión blanco-lechosa
$1 < \varnothing > 0,1 \mu\text{m}$	Emulsión blanco-azul
$0,1 < \varnothing > 0,05 \mu\text{m}$	Gris transparente (seca con brillo)
$\varnothing < 0,05 \mu\text{m}$	Transparente

Diámetro, \varnothing .

Las emulsiones, a diferencia de las microemulsiones, son sistemas termodinámicamente inestables, tienden a su estado de equilibrio, es decir, tienden a reducir el área interfacial hasta alcanzar la completa separación de fases. Para estabilizar la emulsión se puede añadir emulsionantes tales como moléculas tensioactivas, polímeros o sólidos finamente divididos (**Scharrm, 2005**). Los emulsionantes se adsorben en la interfase, reducen la tensión interfacial y suponen un impedimento estérico al paso de componentes a través de la interfase.

El tipo de emulsión que se forma al mezclar las dos fases depende de diferentes factores (**Kruglyakov, 2000**):

- **Volumen de las dos fases:** normalmente la fase con menos volumen es la fase dispersa, exceptuando las emulsiones altamente concentradas.
- **Viscosidad de las dos fases:** la resistencia a la fluencia de las emulsiones es una propiedad importante, las medidas de viscosidad permiten obtener información sobre la estructura de las emulsiones y su estabilidad.
- **Naturaleza y concentración de los agentes tensioactivos utilizados.**
- **Temperatura.**
- **Método de preparación de la emulsión:** al ser sistemas de no equilibrio, sus propiedades dependen no solo de su formulación, sino de las variables de preparación.

En presencia de tensioactivos, los dos primeros factores no son determinantes ya que incluso es posible que la fase continua sea la fase de menor volumen, como es el caso de las emulsiones altamente concentradas.

Probablemente, la propiedad más importante de una emulsión es su estabilidad. Los tensioactivos, entre otros, favorecen esta estabilidad en las emulsiones mediante distintos mecanismos. Además, la naturaleza de los tensioactivos puede determinar la distribución de cada fase (**Goodwin, 2009**).

2.3.2 Métodos de preparación de emulsiones.

Cuando se realiza una emulsión se dispersa una fase líquida finamente dividida en otra fase líquida en la cual es inmiscible. La mayoría de emulsiones

tienen una distribución de tamaño de gota por encima del rango de tamaño de las dispersiones coloidales. Por tanto, requieren energía para su formación al ser sistemas termodinámicamente inestables. En el caso de las emulsiones, la energía libre de Gibbs es positiva, lo que informa que es un proceso no espontáneo y que requiere energía para su formación. Dependiendo del origen de esta energía requerida, se distinguen dos categorías de métodos de formación: métodos de alta energía o de dispersión y métodos de baja energía o de condensación (**Walstra, 1996**).

- **Métodos de dispersión o de alta energía:** se refiere a la aportación de energía por medios mecánicos con el fin de romper la interfase líquido-líquido inicial y forman las gotas durante el proceso de emulsificación, y, por tanto, crear nueva área interfacial (Ej: agitadores a altas revoluciones, homogeneizadores de alta presión, generadores de ultrasonidos).

- **Métodos de condensación o baja energía:** se fundamenta en la utilización de la energía química almacenada en los componentes del propio sistema con el fin de producir la emulsificación. Se libera la energía contenida en el sistema mediante transiciones de fases, bien manteniendo la composición constante y variando la temperatura (Phase Inversion Temperature Method, PIT), o bien variando la composición a temperatura constante (Phase Inversion Composition Method, PIC).

2.3.3 Estabilidad de las emulsiones.

El término estabilidad indica la habilidad de una emulsión de resistirse a cambios en sus propiedades en el transcurso del tiempo, en el caso de las emulsiones, implica términos cinéticos debido a su carácter de inestabilidad. Ahora bien, esto puede retrasarse mucho en el tiempo: una emulsión es más estable cuanto más lentamente cambien sus propiedades una vez formada (**Hunter, 2001**). Los principales mecanismos de desestabilización de las emulsiones son sedimentación y cremado y la variación de tamaño de partícula o agregación (floculación, maduración de Ostwald y coalescencia). La rotura de un sistema disperso puede estar provocada por estos mecanismos de manera aislada, simultánea o consecutiva. En la siguiente Figura 2.10, se muestra un esquema de los diferentes mecanismos de rotura de los sistemas dispersos.

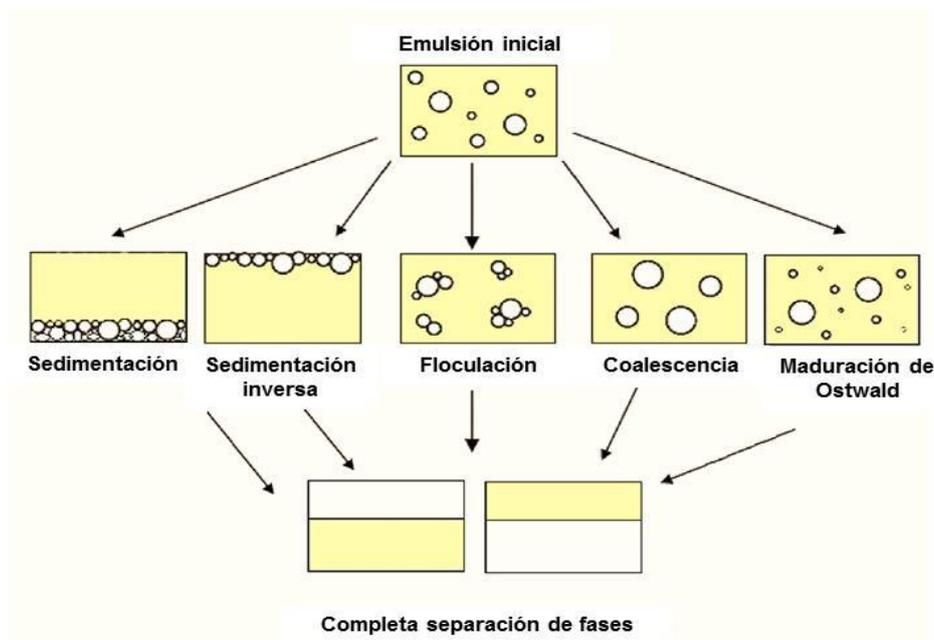


Figura 2.10 Mecanismos de desestabilización de las emulsiones (Walstra, 1996).

- **Sedimentación y cremado:** se produce debido a la diferencia de densidades entre la fase continua y la dispersa que forman la emulsión. Es un proceso reversible ya que la identidad original de las gotas se mantiene. En la sedimentación las gotas de la fase dispersa migran hacia la parte inferior, mientras que en el cremado las gotas se desplazan hacia la superficie.
- **Floculación:** consiste en la agregación de gotas de una emulsión pero sin romper la interfaz de la gota. Como se puede ver en la Figura 2.10 las gotas siguen manteniendo su identidad. Por tanto, también se trata de un proceso reversible.
- **Coalescencia:** es un proceso irreversible mediante el cual dos o más gotas se unen para formar una nueva gota. En este caso, sí que se ha perdido la identidad, rompiendo la gota para formar una de mayor tamaño.
- **Maduración de Ostwald:** es un proceso de difusión molecular en el cual las gotas grandes crecen a expensas de las pequeñas, que van perdiendo volumen hasta que solamente quedan gotas de gran tamaño.

2.4 Encapsulación.

El presente estudio tiene como objetivo general la encapsulación con alginato de principios activos para la elaboración de alimentos funcionales. De acuerdo con ello, en este apartado se describe el proceso de encapsulación, así como las

técnicas más utilizadas en los últimos años con el objetivo de proteger compuestos bioactivos de las agresividades del medio que los rodea o enmascarar su olor y sabor. Seguidamente, se presentan de forma más amplia las técnicas de encapsulación con alginato como material polimérico. Por último, se presenta una breve reseña de los antecedentes referentes a aplicaciones de encapsulación con alginato.

2.4.1 Encapsulación y sus técnicas: Generalidades.

La técnica de encapsulación ha sido descrita como un proceso en donde pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento homogéneo o heterogéneo integrado a las cápsulas con variadas aplicaciones (**Borgogna, et al., 2010**). Una definición general de encapsulación dada por **Desai y Park (2005)** se refiere al empaquetado de materiales sólidos, líquidos o gaseosos mediante cápsulas que liberan su contenido de forma controlada bajo condiciones determinadas.

Estas especificaciones han llevado a describir la encapsulación como la técnica de obtención de una barrera que retarda la interacción de un determinado producto con el medio que lo rodea promoviendo un aumento en la vida útil del mismo, la liberación gradual del compuesto encapsulado e incluso facilitando su manipulación al convertir un material líquido o gaseoso a una forma sólida llamada cápsula, microcápsula, nanocápsula, entre otras dependiendo de su tamaño. (**Fang y Bhandari, 2010**).

Una cápsula consiste en una membrana semipermeable, delgada y fuerte que rodea un núcleo sólido o líquido. El núcleo que compone la cápsula es también denominado fase interna o principio activo, así como la membrana se puede denominar capa externa o matriz. Se definen como microcápsulas aquellas con un diámetro que varía de pocos micrones a 1000 μm . En este sentido, las micropartículas, microcápsulas o microesferas son definidas como el producto del proceso de microencapsulación dependiendo de cuál sea su morfología y estructura interna (**Anal y Singh, 2007; Saez et al., 2007**). Las microcápsulas se han diferenciado de las microesferas principalmente por la distribución del principio activo. En el primer caso, el núcleo puede ser de naturaleza líquida o sólida incluido en una especie de reservorio recubierto por una película del material. Mientras que,

en las microesferas, el principio activo se encuentra altamente disperso en forma de partículas o moléculas en una matriz que no ocupa solo la superficie sino toda la esfera. La obtención de un tipo de estructura u otra depende de las propiedades físico-químicas del principio activo y de la matriz, así como de la técnica empleada para su preparación (**Lopretti et al., 2007**).

Las cápsulas en general, pueden tener forma esférica o irregular. Asimismo, pueden estar constituidas por una membrana simple, múltiples capas e incluso núcleos múltiples cuya matriz puede ser del mismo material o una combinación de varios tal como se muestra en la Figura 2.11. Según el tamaño deseado, se denominarán nanopartículas, nanocápsulas o nanoesferas por debajo del micrón. Y aunque el término cápsula, puede emplearse de manera genérica para nombrar tanto a las nano como las microcápsulas, también, puede referirse a cápsulas de mayores tamaños por encima del milímetro.

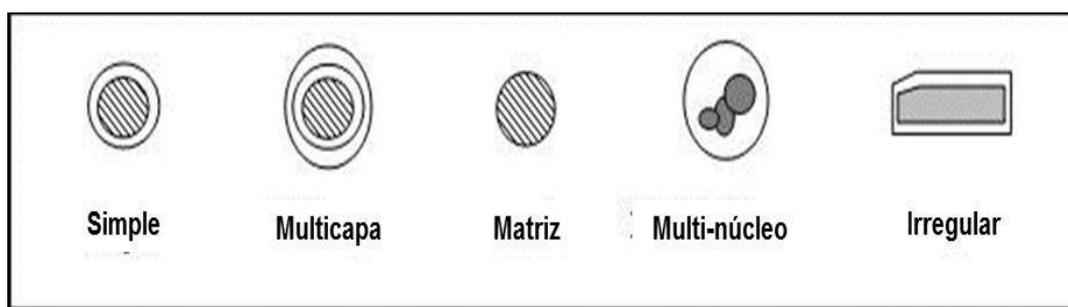


Figura 2.11 Tipos de Cápsulas (**Gibbs et al., 1999**).

Entre las técnicas más empleadas para formar las cápsulas, mostradas en la Tabla 2.4, se tienen: secado por atomización, enfriamiento por atomización, extrusión, recubrimiento en lecho fluidizado, atrapamiento con liposomas, coacervación, formación de complejos de inclusión, extrusión centrífuga y la suspensión por rotación-separación, entre otras (**Gibbs et al., 1999**).

Tabla 2.4 Técnicas de encapsulación y su proceso.

Técnica	Etapas del proceso
Secado por atomización	Preparación de la dispersión; Homogenización de la dispersión; Atomización de la dispersión; Deshidratación de las partículas atomizadas.
Enfriamiento por pulverización	Preparación de la dispersión; Homogenización de la dispersión; Atomización de la dispersión.
Recubrimiento en lecho fluidizado	Preparación de la solución de recubrimiento; Fluidización de las partículas; Recubrimiento de las partículas.
Extrusión	Preparación de la solución de recubrimiento; Dispersión del principio activo en el material; Paso de la mezcla por el dispositivo extrusor.
Extrusión centrífuga	Preparación de la solución principal; Preparación de la solución de recubrimiento; Co-extrusión de la solución principal y de recubrimiento a través de boquillas.
Atrapamiento con liposomas	Microfluidización; Ultrasonidos; Evaporación en fase inversa.
Coacervación	Formación de tres fases químicas inmiscibles; La deposición de la capa; La solidificación de la capa.
Liofilización	Mezcla del principio activo en una solución de recubrimiento; Secado por congelación de la mezcla.
Suspensión por rotación- separación	Mezcla del principio activo en un material de recubrimiento; Verter la mezcla sobre un disco giratorio para obtener pequeñas partículas encapsuladas; Secado.

Hay un número de materiales de recubrimiento aprobados comercialmente y disponibles para producir diversos encapsulados de uso alimentario (Tabla 2.5). No todos los materiales tienen las propiedades necesarias, por lo que se utilizan a menudo en combinación con otros materiales modificadores tales como, eliminadores de oxígeno, antioxidantes, agentes quelantes y tensioactivos.

Tabla 2.5 Materiales de encapsulación de grado alimentario.

Polisacáridos	Grasas y Ceras	Proteínas
Goma Arábica	Aceites vegetales hidrogenados	Gelatinas
Almidones modificados	Cera de abeja	Proteína del suero
Maltodextrinas	Proteína de soja	Caseinatos de sodio
Alginatos		
Pectinas		
Carragenatos		

En contraste con la mayoría de los polisacáridos, el alginato forma geles prácticamente independientes de la temperatura, aspecto que lo ha hecho atractivo en la elaboración de cremas, quesos, salsas, y aderezos. Sin embargo, la exposición prolongada a tratamientos de calor y variaciones extremas de pH degrada al polímero, presentando como consecuencia pérdidas de las propiedades del gel (**Mancini et al., 1999; Soares et al., 2004**). Adicionalmente, la condición de polielectrolito le confiere la capacidad de interactuar con otras moléculas permitiendo formar sistemas mixtos que muestran mejoras en las propiedades estructurales del gel de alginato. Al seleccionar una matriz polimérica para la microencapsulación deben considerarse sus propiedades físico-químicas, solubilidad, transición sol-gel (cinética) y permeabilidad (**Champagne y Fustier, 2007**).

2.4.2 Técnicas de encapsulación con alginato.

La encapsulación de principios activos puede realizarse por diferentes técnicas. La selección de la técnica de encapsulación adecuada se ve determinada por las propiedades físico-químicas del material soporte y la aplicación final deseada con el objeto de asegurar la biodisponibilidad de los compuestos, su funcionalidad e incluso su fácil incorporación en los alimentos sin la alteración de sus propiedades sensoriales (**Pal, et al., 2009**). Al emplear el alginato como matriz polimérica, las técnicas de encapsulación en aplicaciones alimentarias se reducen a: emulsión, extrusión y secado por atomización. Considerando, que las técnicas empleadas en

este estudio han sido en emulsión y por extrusión, se realiza en este apartado una explicación ampliada de ambas.

2.4.2.1 *Encapsulación en emulsión.*

La técnica de encapsulación en emulsión consiste en la dispersión de un líquido en otro líquido inmisible donde la fase dispersa contiene la solución de alginato que formará la matriz polimérica, así como el componente a encapsular. La adición de un tensioactivo mejora la formación y estabilidad de la emulsión, así como la distribución de tamaño de las gotas (**Poncelet, 2001; de Vos et al., 2010**), que se convertirán en microcápsulas o microesferas cuando la gelificación del alginato tenga lugar, por lo que el tamaño de las gotas determinará el tamaño de las partículas formadas. En este sentido, la encapsulación en emulsión permite la preparación de microcápsulas o microesferas empleando para ello dos posibles mecanismos: la gelificación externa (GE) y la gelificación interna (GI). La gelificación externa en emulsión consiste en la dispersión de una solución acuosa de alginato-componente activo a encapsular en una fase continua no acuosa, seguida de la adición de una fuente de calcio que al difundirse a la fase dispersa inicie la gelificación permitiendo la encapsulación. A continuación, la emulsión se desestabiliza para la separación de las cápsulas formadas. En la gelificación interna la fuente de calcio se encuentra en la misma fase dispersa, pero en forma de sal o complejo insoluble o parcialmente soluble en cuyo caso se adiciona un agente secuestrante (**Gouin, 2004; Chan et al., 2006**). La liberación del ion calcio ocurre con la adición de un ácido orgánico soluble en la fase continua que al difundirse hacia la fase dispersa disminuye el pH del medio solubilizando la sal de calcio y produciendo la gelificación. Las técnicas de microencapsulación en emulsión se describen en la Figura 2.12. Para ambos casos, dichas microcápsulas pueden ser denominadas microesferas al considerar que el principio activo se encuentra altamente disperso en la matriz polimérica.

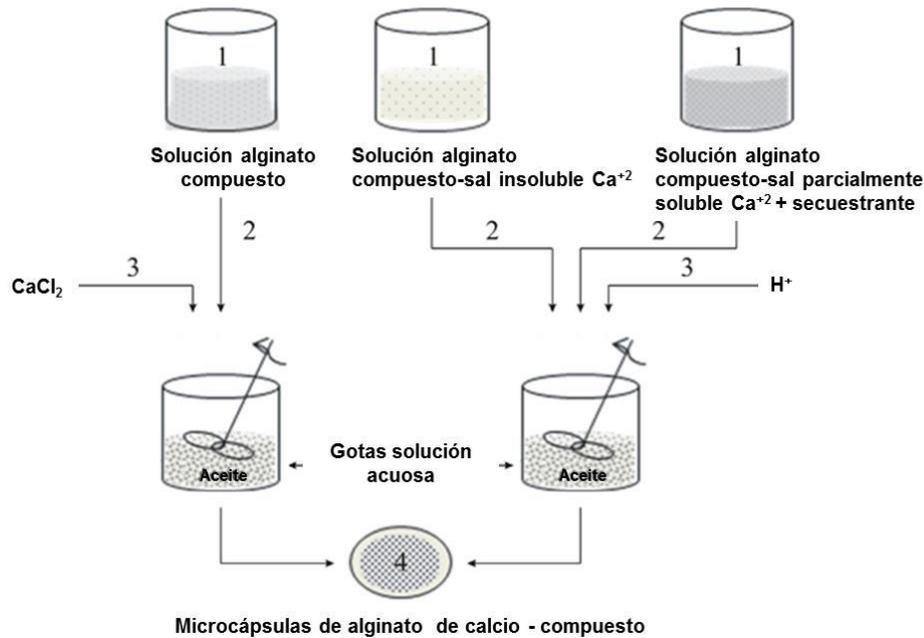


Figura 2.12 Técnica de microencapsulación en emulsión (Champagne y Fustier, 2007).

2.4.2.2 Encapsulación por extrusión.

Esta técnica consiste en la formación de gotas de la solución de alginato que contiene el componente a encapsular al hacer pasar dicha solución por un dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de goteo controlado. Estas gotas caen sobre un baño que contiene la fuente del ion divalente, quien induce la gelificación mediante el mecanismo de gelificación externa (Chan *et al.*, 2009). La principal limitación presentada por esta técnica es el gran tamaño de las cápsulas o esferas formadas, comparado con aquél obtenido por emulsificación, y que depende fundamentalmente del diámetro de la boquilla del dispositivo extrusor, además existe, la dificultad de producción a gran escala debido a que la formación de las cápsulas se logra una a una o de pocas en pocas lo cual trae como consecuencia largos tiempos de gelificación (Mofidi *et al.*, 2000). Adicionalmente, hay que considerar aspectos que influyen en la forma esférica y tamaño de las esferas, como la distancia de separación de la boquilla al baño, el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución que induce la gelificación (Chan *et al.*, 2009). A pesar de todos estos factores, la técnica de encapsulación por extrusión ha sido empleada tradicionalmente al permitir la producción de cápsulas o esferas con tamaños uniformes, empleando desde una simple jeringa hasta dispositivos extrusores más sofisticados.

Recientes estudios demuestran que la aplicación de esta técnica mejora notablemente al incorporar dispositivos extrusores como boquillas múltiples y discos aspersores (**Champagne et al., 2000**), inyectores con impulsos vibratorios (**Dohnal y Štěpánek, 2010**) e incluso con flujo de aire incorporado (**Mark et al., 2009**), todos diseñados con el mismo objetivo, la producción masiva de cápsulas. Como ejemplo, en la Figura 2.13 se muestran diferentes tipos de dispositivos extrusores para la preparación de cápsulas.

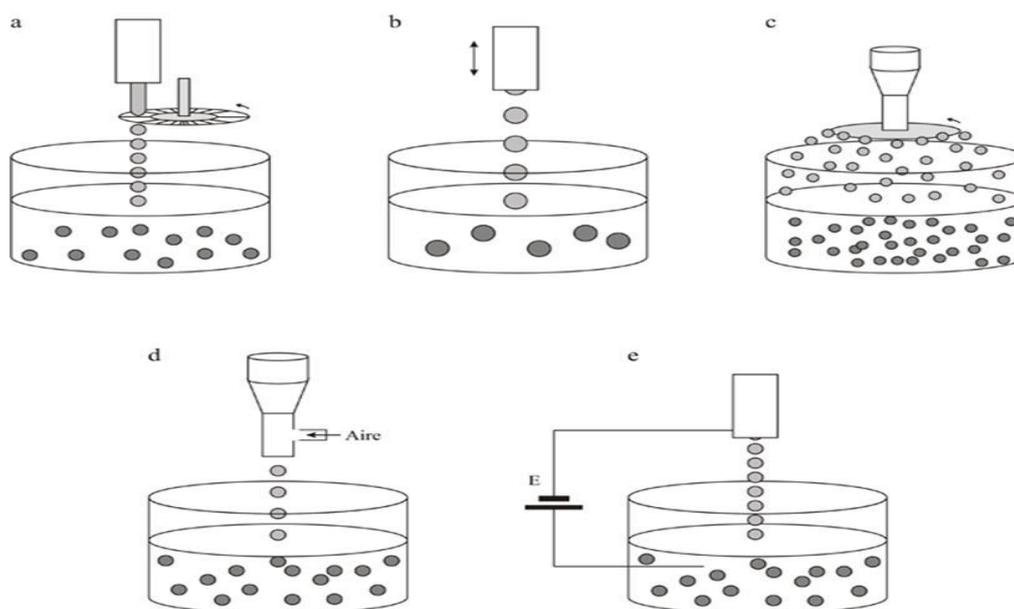


Figura 2.13 Tipo de dispositivos extrusores. Atomizador con corte sistemático del chorro, a; Boquilla vibratoria, b; Disco atomizador, c; Flujo de aire coaxial, d y Potencial electroestático, e. (**Zuidam y Shimoni, 2010**).

2.4.3 Antecedentes: aplicaciones de encapsulación con alginato.

La mayoría de las aplicaciones encontradas, se han realizado encapsulando microorganismos probióticos. Estas bacterias se han venido adicionando directamente en productos alimentarios debido a sus beneficios probióticos. Sin embargo, el mayor problema se presenta en la supervivencia de los microorganismos durante el procesado y almacenaje de los alimentos e incluso en procesos posteriores a su consumo como las agresivas condiciones gastrointestinales. Las últimas tendencias alimentarias hacen referencia a la incorporación de compuestos antioxidantes a la dieta diaria. En este sentido, han surgido recientes investigaciones con la finalidad de proteger las propiedades

funcionales de estos compuestos activos a objeto de evitar su degradación química (Lupo *et al.*, 2012).

2.4.3.1 Encapsulación de microorganismos probióticos.

La microencapsulación ha permitido inmovilizar bacterias probióticas en una matriz de alginato debido a la simplicidad del proceso de preparación de las microcápsulas, su biocompatibilidad y alta retención de microorganismos como consecuencia del tamaño de poro mostrado por la matriz estimado en 17 nm, mientras que el tamaño promedio de las bacterias oscila entre 1-3 μm . Por estas razones, la microencapsulación de probióticos ha sido investigada con la finalidad de proteger y mejorar la biodisponibilidad de los microorganismos (Krasaekoop *et al.*, 2003; 2004). Por otra parte, se han encontrado trabajos donde el objetivo ha sido producir mayor cantidad de biomasa para mejorar el proceso de fermentación, así como la obtención de metabolitos secundarios de interés industrial, tal como la vitamina B₁₂ (Gardner y Champagne, 2005).

La técnica por extrusión ha sido la más empleada para la encapsulación de bacterias probióticas en hidocoloides. Diferentes estudios obtuvieron diámetros de cápsulas superiores a 2 mm al inmovilizar diversas bacterias ácido lácticas. Los resultados mostraron una influencia importante de la viscosidad de la solución de alginato, la distancia desde el dispositivo extrusor al baño de calcio y el diámetro del orificio en el tamaño y esfericidad de las cápsulas. Por el contrario, al aplicar la técnica en emulsión se lograron producir microcápsulas con tamaños entre 25 μm y 2 mm, donde la velocidad de agitación y el tipo de tensioactivo mostraron ser las variables de influencia significativa sobre la distribución de tamaño (Krasaekoop *et al.*, 2003). En un estudio posterior sobre microencapsulación de *B. longum* por extrusión, se evidenció una mayor cantidad de bacterias existentes en un ambiente gástrico simulado frente a las células libres. Este índice de resistencia se incrementó con la concentración de alginato y el tamaño de las cápsulas. Por otra parte, las microcápsulas con *Lactobacillus* preparadas en emulsión presentaron tamaños inferiores a 100 μm y poca supervivencia de las células frente a fluidos gástricos. Parece que debido al gran tamaño de las bacterias, las microcápsulas han de ser moderadamente grandes para encapsularlas de forma efectiva. Aun así, al ser agregadas en productos refrigerados como yogurt y crema agraria mostraron

estabilidad durante el almacenamiento (**Chandramouli et al., 2004**). No obstante al éxito alcanzado por diferentes investigaciones, se han encontrado variados estudios que han empleado tratamientos especiales para elevar la eficiencia de encapsulación, empleando sistemas combinados de matrices, como almidón/alginato y proteína del suero/alginato (**Dembczyński y Jankowski, 2000; Chen y Subirade, 2006; Jayalalitha et al., 2012**).

2.4.3.2 *Encapsulación de compuestos activos no microbianos.*

Con el objetivo de mantener las propiedades funcionales de los principios activos y enmascarar sabores amargos o astringentes, se ha utilizado la técnica de encapsulación para evitar la degradación causada por factores químicos y externos como la oxidación e hidrólisis. Diversos trabajos hacen referencia a la encapsulación de ácidos grasos como el omega-3 y omega-6, aplicados tradicionalmente para el enriquecimiento de productos alimenticios, los cuales son altamente oxidables y de sabor desagradable (**Champagne y Fustier, 2007; Sanguansri y Augustin, 2010**). Compañías como *Denomega Nutritional Oils* (Denomega Pure Health, Sarpsborg, Noruega) y *GAT Food Essentials* (Ebenfurth, Austria) han encapsulado aceite de pescado en microesferas de alginato con tamaños entre 1 y 30 μm usando la técnica en emulsión y un recubrimiento de goma xantana.

La vitamina E (α -tocoferol) un antioxidante usado frecuentemente por la industria farmacéutica y de gran interés para los procesos alimentarios pero de aplicación limitada debido a su carácter lipofílico, alta sensibilidad al calor y a la luz. Ha sido encapsulado utilizando la técnica por extrusión y un dispositivo especial con doble boquilla para extruir la solución (**Helgerud et al., 2010**). A este respecto, un trabajo previo refiere la preparación de microcápsulas con vitamina E empleando mediante la formación de una emulsión O/W, donde la emulsión es a su vez extruida por atomización con aire comprimido sobre una solución de calcio para conseguir la gelificación de las gotas (**Yoo et al., 2006**). **Levi y colaboradores (2001)** encapsularon el aroma de limoneno ampliamente usado por la industria de bebidas refrescantes en un sistema alginato-alcohol polivinílico. Los resultados señalaron una alta resistencia frente a temperaturas por encima de las presentadas como críticas para el limoneno sin encapsular.

En la última década, las investigaciones han mostrado un interés creciente por la encapsulación de extractos naturales con alto contenido en polifenoles provenientes de plantas medicinales, hierbas, flores y semillas. Dicho manifiesto ha surgido con la finalidad de alcanzar nuevas propuestas nutricionales que permitan el uso de antioxidantes como aditivos alimentarios sin cambiar el sabor, aroma y color de los productos originales, así como, el aprovechamiento de sus beneficios protectores ante los efectos de los radicales libres y las enfermedades degenerativas. Por otra parte, el reciente uso de los extractos naturales, se ha debido a su gran carácter hidrofílico lo que, por tanto, ha facilitado su proceso de extracción y potenciado las aplicaciones en medios acuosos. Sin embargo, cuando el objetivo es retardar la liberación de sus compuestos activos en el medio acuoso, diversos trabajos señalan que tal efecto puede ser contrarrestado empleando tratamientos especiales a las microcápsulas durante su proceso de preparación. Así, la hierba mate (*Ilex paraguariensis*) fue microencapsulada en alginato, recubierta en quitosano y con posterior deshidratación de las microcápsulas utilizando diferentes métodos de secado, demostrando que la matriz alginato-quitosano retarda los tiempos de liberación del compuesto respecto a las microcápsulas sin recubrir (**Deladino et al., 2008**). En otros trabajos, se han encapsulado soluciones acuosas de extractos de la hierba *Piper sarmentosum* en esferas de alginato de calcio (**Chan, et al., 2010**). También, se han encapsulado soluciones preparadas a partir de hojas de frambuesa, espino, hiedra, milenrama, ortiga y extracto de hoja de olivo en microesferas de alginato/quitosano preparadas por extrusión electrostática con adición de ácido ascórbico para la disolución de quitosano (**Belščak-Cvitanović et al., 2011**).

2.5 Diseño Experimental.

Este apartado pretende describir brevemente, las bases teóricas del diseño experimental que ha sido utilizado en el estudio de preparación de microesferas de alginato en emulsión para la encapsulación del principio activo. Específicamente se hace referencia al diseño factorial a dos niveles, diseño central compuesto y factorial fraccionado como estrategias experimentales para el estudio de un sistema o proceso.

2.5.1 Diseño factorial.

Los diseños factoriales se usan ampliamente en experimentos que incluyen varios factores cuando es necesario estudiar el efecto conjunto de los factores sobre la respuesta. Hay varios casos especiales del diseño factorial que son importantes debido a su uso generalizado en el trabajo de investigación y porque constituyen las bases de otros diseños de gran valor práctico. Entre ellos se encuentra, el de k factores, cada uno estudiado sólo a dos niveles. Este diseño sirve como un estudio preliminar de la influencia de diversos factores en una determinada variable respuesta, ya que permite determinar si hay influencia o no, pero no permite cuantificar influencias no lineales. Si todos los factores se estudian a dos niveles, se dice que es un experimento factorial 2^k , donde k es el número total de variables que se estudian. Los niveles de estos factores pueden ser cuantitativos o bien cualitativos. Se denominan factores todas aquellas variables que puedan afectar al sistema, y se considera respuesta de salida o variable respuesta a las diferentes propiedades del producto obtenido. Existen diferentes técnicas de diseño factorial, en función de los niveles estudiados por variable y del número de experimentos programados (**Prat et al., 1997**).

- **Diseño factorial a dos niveles:** permite calcular de forma preliminar el efecto de cada variable sobre una respuesta del sistema, así como las posibles interacciones entre las diferentes variables. Para un diseño factorial a dos niveles, se debe escoger un nivel inferior y superior de cada variable. A partir de las respuestas determinadas para cada uno de los experimentos programados, se puede calcular el efecto principal de una variable sobre la respuesta de salida. Éste se define como el cambio que experimenta la respuesta cuando se produce la variación de una variable desde su nivel inferior al superior, para todas las combinaciones posibles del resto de variables. Se define interacción como la influencia que pueda tener el cambio de nivel de una variable en el efecto de otra variable sobre la respuesta de salida (**Montgomery, 2002**). Se puede analizar la interacción de dos variables representando la respuesta en función de una variable, x_1 , para los dos niveles estudiados de otra variable, x_2 . Cuando la diferencia de respuesta entre los dos niveles estudiados de una variable, x_1 , no es la misma a todos los niveles de otra variable, x_2 , se considera que existe interacción. Por el contrario, si la diferencia de respuesta para cada nivel de x_1 a diferentes niveles de x_2 , se considera que no

existe interacción entre ellas. En este caso, cada variable podría ser estudiada de manera independiente.

- **Diseño Central Compuesto (CCD):** estos diseños permiten describir comportamientos no lineales, ya que cada variable se estudia a tres o más niveles. Para un diseño central compuesto, el número total de experimentos a realizar es la suma de un diseño factorial completo, 2^k , un punto central que se replica un número de veces determinado y un diseño axial o estrella que permite la estimación de la curvatura. Si la distancia desde el punto central a un punto del diseño factorial completo o fraccionado es ± 1 unidades para cada variable, la distancia desde el punto central a un punto del diseño axial o estrella corresponde a $\pm \alpha$ con $|\alpha| > 1$. La Figura 2.14, muestra el dominio experimental y los puntos experimentales programados para un diseño central compuesto de dos y tres factores o variables, los cuales se han usado en el presente trabajo.

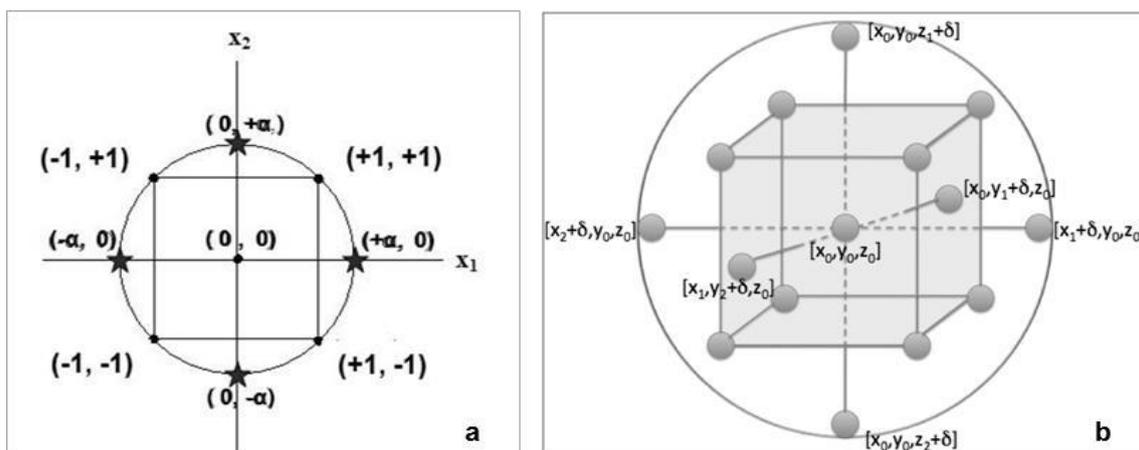


Figura 2.14 Dominio experimental de un diseño central compuesto para dos factores, a (Montgomery, 2002) y tres factores, b (Box et al., 1989).

El valor de α y el número de experimentos a realizar en el punto central, se seleccionan según criterios de ortogonalidad y rotabilidad (Montgomery, 2002). El diseño estrella implica la realización de un nuevo bloque de experimentos de nuevos valores extremos (inferior y superior) para cada variable de diseño. Para evitar el efecto de la experimentación en bloques, los dos diseños, estrella y factorial, deben cumplir la condición de ortogonalidad. El diseño central compuesto, también debe cumplir el principio de rotabilidad. Se considera que un diseño es rotable, si la precisión en la estimación de la superficie es igual para todos los puntos y

equidistante del centro del diseño, independientemente de la dirección en que se encuentren. Es decir, que al girar la superficie sobre su centro, la precisión en la estimación será la misma (**Prat et al., 1997**).

- **Diseño factorial fraccionado:** permite calcular el efecto de cada variable sobre una respuesta del sistema, así como las posibles interacciones entre las diferentes variables. Para un diseño factorial a dos niveles, se debe escoger un nivel inferior y superior de cada variable. El número de experimentos a realizar sería 2^{k-1} donde $k - 1$ corresponde al número total de variables que se estudian. Por tanto, representa a una fracción un medio del diseño 2^k completo, es decir, la mitad de las combinaciones (**Montgomery, 2002**).

2.6 Modelos para ajustes cinéticos de liberación.

La encapsulación y por consiguiente la liberación controlada del principio activo en alimentos se ha practicado en la industria alimentaria durante muchos años. Sin embargo, la tecnología que se ha desarrollado es relativamente poco sofisticada en comparación con otros campos de aplicación, tales como la farmacología. Esto se debe en gran parte a las limitaciones impuestas a la industria de alimentos para el uso de ingredientes comestibles de bajo coste, así como a su procesado. Este apartado hace mención a los mecanismos de liberación más empleados a nivel de fármacos que a su vez han sido aplicados recientemente para el estudio de la liberación de diferentes principios activos en alimentos, como vitaminas, proteínas, enzimas y compuestos polifenólicos.

Durante años, las aplicaciones farmacéuticas han hecho uso de sistemas poliméricos de liberación controlada, que a su vez protegen al compuesto activo de las degradaciones biológicas antes de su liberación. En este caso, el mecanismo de liberación se basa en las características físico-químicas del polímero como matriz, según tres categorías (**Arifin et al., 2006**):

- Difusión del fármaco desde el polímero no degradado (controlado por la difusión).
- Difusión del fármaco mejorada debido al hinchamiento del polímero (controlado por el hinchamiento).
- Difusión del fármaco debido a la degradación del polímero y su erosión (controlado por la erosión).

En este sentido, el fenómeno de liberación de un principio activo resulta difícil de modelizar. Quizás por ello, son numerosas las ecuaciones planteadas que intentan relacionar la cantidad del compuesto liberado (M) en función del tiempo (t). Los correspondientes modelos cinéticos destinados a describir la liberación desde formas de dosificación inmediata o modificada, se pueden agrupar en modelos matemáticos mecanicistas o reales y modelos matemáticos empíricos o semi-empíricos (**Siepmann y Göpferich, 2001**).

2.6.1 Modelos matemáticos mecanicistas o realistas.

Un modelo matemático mecanicista o realista, se fundamenta en parámetros teóricos explicados con un sentido real que relacionan a $M = f(t)$. Para ser capaz de resolverlos, las condiciones iniciales y de contorno dadas deben ser conocidas, por ejemplo, la distribución del compuesto dentro de la forma de dosificación antes de la exposición al medio de liberación, el mantenimiento potencial de unas perfectas condiciones de inmersión durante todo el experimento o la adecuación constante de los límites específicos. Cabe resaltar que estos modelos, toman como base teorías como la *Ley de Fick* o difusión, teorías que consideran el hinchamiento del polímero, teorías que consideran tanto el hinchamiento del polímero como su disolución y del compuesto activo, y teorías que toman en cuenta la erosión del polímero y su degradación.

Las teorías basadas en la *Ley de Fick* han sido las más destacadas, debido a su sencillez. Si la liberación del compuesto es una difusión controlada con coeficientes de difusión constantes, el tratamiento matemático puede ser bastante sencillo. Tal como se ilustra en la Figura 2.15, se tienen diferentes tipos de sistemas o dispositivos. Los sistemas de reservorio que consisten en un depósito del compuesto, que está rodeado por una membrana de control de velocidad de liberación o barrera (generalmente polimérica). Por otro lado, se tienen los sistemas tipo monolíticos, también llamados sistemas de "uno-bloque", debido a la formación compuesto activo-matriz, es decir, un sistema donde no existe una separación diferenciada entre el compuesto encapsulado y la membrana polimérica formada. Por tanto, el principio activo se encuentra distribuido prácticamente de forma homogénea en la matriz (**Siepmann J. y Siepmann, F, 2008**).

Para ambos tipos de sistemas, se debe distinguir si la concentración inicial del compuesto está por debajo o por encima de la solubilidad de éste en el dispositivo. Para el caso de un dispositivo tipo reservorio con una concentración inicial del compuesto por debajo de la solubilidad del mismo, las moléculas del compuesto liberado no se reemplazan y la concentración del compuesto en la superficie de la membrana interna disminuye continuamente con el tiempo (fuente de actividad no constante). Si la membrana no se hincha o se disuelve, si se proporcionan condiciones de inmersión perfectas durante todo el periodo de liberación y si la permeabilidad del compuesto a través de la barrera permanece constante, resulta en una cinética de liberación de primer orden e independiente de la geometría del dispositivo.

En contraste, si la concentración inicial del compuesto supera su solubilidad en un dispositivo tipo reservorio, las moléculas liberadas se van sustituyendo por la disolución (parcial) del compuesto, lo que resulta en concentraciones constantes del mismo (soluciones saturadas) en la superficie de la membrana interna (constante fuente de actividad). Si las propiedades de la barrera de control de la velocidad de liberación (incluyendo su grosor y la permeabilidad) permanecen constantes, y si se proporcionan condiciones de inmersión perfectas durante todo el periodo de liberación, la cinética de liberación resulta de orden cero (siempre que se proporcione el exceso de fármaco) e independiente de la geometría del sistema (**Baker, 1987**). Los diferentes sistemas descritos son mostrados en la Figura 2.15.

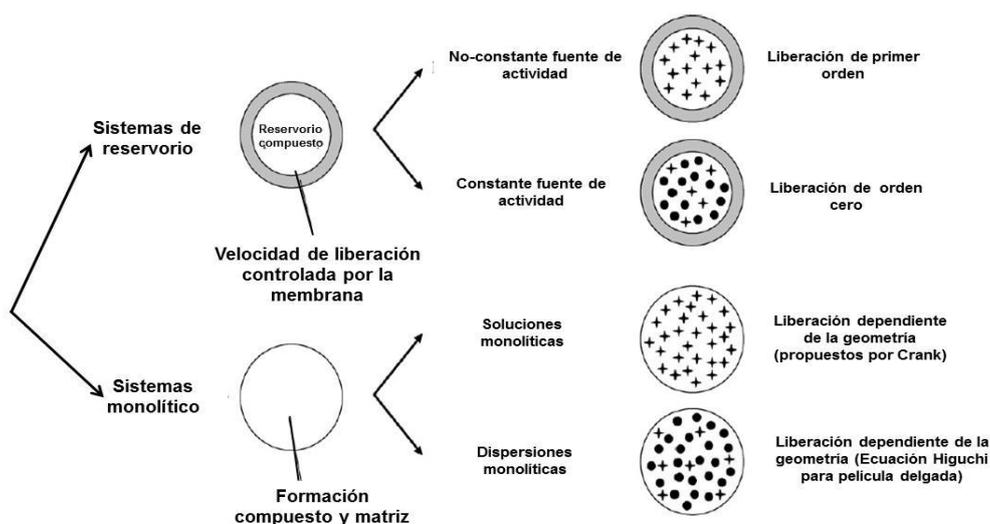


Figura 2.15 Sistema de clasificación de dosificación de fármacos por difusión controlada (**Siepmann J. y Siepmann, F, 2008**).

Los modelos matemáticos mecanicistas o realistas, se asientan en las teorías básicas de la disolución planteadas hace más de un siglo por *Noyes y Whitney* en 1897. Esta teoría relaciona, la velocidad de disolución de los sólidos a las propiedades del sólido y el medio de disolución. Afirmación que se expresa matemáticamente como:

$$\frac{dC}{dt} = k(C_s - C) \quad (19)$$

Donde dC/dt es la variación de concentración de sólido en solución por unidad de tiempo, k es una constante de velocidad que depende de las condiciones experimentales y tiene dimensiones de t^{-1} , C es la concentración de sólido en solución libre a un tiempo t y C_s es la concentración de saturación del sólido en el medio de disolución. Esta asume que la superficie del sólido permanece constante durante la disolución, y que la disolución tiene lugar en dos pasos consecutivos: disolución del sólido en la interfase sólido-líquido con la consiguiente formación de una fina capa de difusión alrededor de la superficie del sólido (C_s), seguida de la difusión del soluto desde esa capa saturada hacia el medio de disolución (C).

Estudios posteriores de *Noyes y Whitney* incorporaron el área de superficie del sólido accesible al medio de disolución al considerar los efectos de este aspecto sobre la velocidad de disolución. Estos fundamentos han sido usados para explicar y desarrollar diversos modelos de liberación, en los que la etapa limitante en la transferencia del soluto desde el sólido hacia el medio es siempre la difusión de las moléculas a través de esa capa en torno a la partícula sólida (**Viseras-Iborra, 2008**).

Los modelos mecanicistas plantean la liberación del principio activo como un proceso principalmente difusional, y han sido desarrollados para ajustar datos de liberación desde sistemas reservorios o matriciales. En los sistemas reservorio, el ajuste matemático de la liberación es sencillo si se supone que el sistema o dispositivo es esférico (**Crank, 1975**). En los sistemas matriciales, asumen que el compuesto se encuentra uniformemente distribuido en la matriz desde la que se libera, partiendo de dos situaciones:

- Que la cantidad del principio activo sea menor que la solubilidad en la matriz ($C_0 < C_s$), esto es, que el compuesto está disuelto.
- Que la cantidad del principio activo presente en la matriz sea mayor que su solubilidad ($C_0 > C_s$) y, por tanto el compuesto está disperso en la matriz.

2.6.1.1 *Modelo de orden cero.*

La denominación de modelo de orden cero surge de la base teórica desarrollada para el estudio cinético de las reacciones químicas, en las que el término “orden” de reacción se refiere a la forma en que la concentración de una sustancia influye en la velocidad de una reacción química, de manera que la velocidad es independiente de la concentración. En el medio biológico, la disolución de un sólido viene seguida de su absorción, por lo que la concentración del soluto se mantiene en valores muy alejados de su solubilidad. Esto permite plantear una solución parcial de la Ec. 19, para el caso en que $C \ll C_s$. Si C_s es constante y se considera el volumen de la disolución la ecuación queda:

$$\frac{dM}{dt} = k \quad (20)$$

Donde se expresa la cantidad de principio activo liberado en el tiempo y se describe la velocidad de disolución como constante e independiente de la cantidad del compuesto disuelto. Este modelo es válido si el área de la partícula permanece sin variación. Al integrar entre tiempo 0 y t , se tiene:

$$M_t = M_0 + kt \quad (21)$$

Donde, M_t es la cantidad de compuesto liberado en tiempo t y M_0 es la cantidad del compuesto inicial en solución. Usualmente el valor de M_0 tiende a ser cero.

2.6.1.2 *Modelo de primer orden.*

Establece que la velocidad de disolución es proporcional a la primera potencia de la concentración del principio activo disuelto. Partiendo de la Ec. 19, asumiendo que C_s es constante, que la forma del sólido no cambia y que su superficie será proporcional a la cantidad del compuesto que quede por disolver, se tiene la expresión matemática:

$$-\frac{dM}{M-M_t} = k_1 dt \quad (22)$$

Donde, k_1 es una constante de proporcionalidad, el signo negativo indica la disminución de la cantidad de sólido al disolverse. Integrando entre tiempo 0 y t , linealizando y reordenando, se tiene:

$$M_t = M_\infty(1 - e^{-k_I(t-t_0)}) \quad (23)$$

Donde, M_∞ es la cantidad de compuesto liberado en un tiempo infinito.

2.6.1.3 Modelo de Higuchi o de la Raíz Cuadrada.

El modelo surge de una propuesta hecha por Higuchi en 1961, para el ajuste de una cinética de liberación de fármacos suspendidos en bases pomadas, asumiendo: un diámetro de la partícula del principio activo mucho menor a la capa de pomada aplicada, la concentración del compuesto en la base de la pomada (C) sea mucho mayor que su solubilidad en la base (C_s) y la superficie de aplicación sea inmisible en la base de la pomada. En este sentido, el principio activo será primeramente disuelto y posteriormente comenzará a difundirse.

$$M = 2 \sqrt{\frac{DtC_s}{2C-C_s}} (C - C_s) = \sqrt{Dt(2C - C_s)C_s} \quad (24)$$

Donde, D es el coeficiente de difusión del compuesto en el vehículo de la pomada y $M = M_t/M_\infty$ es la cantidad de compuesto liberado en un tiempo t . Esta ecuación es válida para tiempos menores al agotamiento del compuesto, de manera que la cantidad del principio activo liberado, resulta proporcional a la raíz cuadrada de la concentración del compuesto, a la constante de difusión, solubilidad del compuesto y al tiempo.

Posteriormente, Higuchi planteó el uso de la Ec. 24 para la liberación desde matrices homogéneas y granulares. Cuando se trata de matrices no porosas (homogéneas), no hinchables y en las que el compuesto se encuentra uniformemente disperso, se asume que éste se disuelve en el seno de matriz y posteriormente se difunde desde allí hasta la superficie. Conforme el compuesto se va liberando, la distancia de difusión se hace mayor de manera que la variación de la concentración progresa. En cambio si la matriz, presenta poros, primero debe entrar el medio de disolución a través de éstos, por lo que resulta necesario introducir un factor de tortuosidad en la ecuación. Presuponiendo, que la concentración del compuesto en la matriz es menor que su solubilidad y que la liberación del mismo ocurre lentamente y posterior a la difusión a través de los poros, la ecuación se puede expresar como:

$$M = \sqrt{\frac{D\varepsilon}{\tau}(2C - \varepsilon C_s)C_s t} \quad (25)$$

Donde, ε es la porosidad de la matriz y τ es el factor de tortuosidad del sistema. Esta ecuación asume, por otra parte que el sistema no se encuentra recubierto y que la geometría de la matriz no cambia con la liberación.

De manera general, es posible agrupar las ecuaciones que describen el modelo de Higuchi de forma simplificada:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k' \sqrt{t} \quad (26)$$

Donde, k' es una constante y su uso estará limitado al ajuste de la primera parte (60%) de la cinética de liberación, es decir, $M_t/M_\infty \leq 0,6$.

2.6.2 Modelos matemáticos empíricos.

La mayoría de los ajustes cinéticos realizados con las ecuaciones anteriores no describen adecuadamente sistemas reales, debido principalmente a que un solo mecanismo no es suficiente para explicar el proceso de liberación. En consecuencia, surgen propuestas donde se plantea una contribución simultánea tanto de la difusión como de la disolución, cuyo peso en la liberación dependerá del sistema objeto en estudio (**Wang et al., 1969**). En estos casos, ni la cinética de primer orden ni la ecuación de *Higuchi* serán capaces de ajustar el perfil de disolución. Estas ideas condujeron al desarrollo de modelos empíricos (o semi-empíricos) en el que se relaciona la cantidad de compuesto liberado desde sistemas poliméricos hidrofílicos con el tiempo.

2.6.2.1 Modelos de Peppas.

Una ecuación muy simple y semi-empírica que se ha utilizado para describir la liberación de fármacos a partir de sistemas poliméricos es la llamada “*Ley de Potencia*”, que se expresa:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (27)$$

Donde, k es la constante cinética que refleja las características estructurales y geométricas del sistema polimérico/compuesto activo y n es el exponente cinético

que describe el mecanismo de liberación. El desarrollo de esta ecuación generalizada, resulta de una modificación propuesta por **Kosmeyer et al, (1986)**. Puede observarse que la ecuación de Higuchi clásica (Ec. 24), así como la ecuación general o simplificada (Ec. 26), representan el caso especial de la ley de potencia cuando $n = 0,5$.

Los trabajos iniciados por *Nikolaos Peppas* y en colaboración sucesiva con otros autores plantearon limitaciones a la *ley de la potencia*, con la finalidad de complementar dos mecanismos aparentemente independientes de transporte de fármacos; la difusión Fickiana y un comportamiento anómalo denominado no-Fickiano que describe en muchos casos la dinámica de hinchamiento y liberación del compuesto activo. Por lo tanto, la Ec. 27 tiene dos significados físicos distintos y realistas para los casos especiales extremos donde $n = 0,5$ (liberación controlada del compuesto por difusión) y $n = 1$ (hinchamiento controlado y liberación del compuesto). Los valores de n entre 0,5 y 1 pueden ser considerados como un indicador de superposición de los dos fenómenos (transporte anómalo) (**Siepmann y Peppas, 2012**). Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos valores extremos del exponente sólo son válidos para una geometría tipo película o laminar. Para esferas y cilindros se han obtenido diferentes valores, tal como se indica en la Tabla 2.6 por modificaciones propuestas por **Ritger y Peppas (1987)**.

Tabla 2.6 Valor del exponente cinético para la *Ley de la Potencia* y diferentes geometrías.

Valores del exponente cinético “n”			Mecanismo de Transporte
Película fina	Cilindro	Esfera	
0,5	0,45	0,43	Difusión Fickiana
$0,5 < n < 1$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anómalo (no fickiano)
1	0,89	0,85	Transporte Caso II

Por tanto, dependiendo de los valores de n se puede interpretar la cinética de liberación. Para el caso de esferas, si el mecanismo de difusión Fickiano es predominante, entonces $n = 0,43$ (Ec. 27), mientras $n = 0,85$ se asocia a un mecanismo anómalo o no-Fickiano, conocido como “transporte de Caso II” o polímero hinchable. Si los valores de n se encuentran entre 0,43 y 0,85 se explica como un mecanismo de transporte intermedio/anómalo. Si $n < 0,43$ se observa como un comportamiento de difusión pseudo-Fickiano, es decir, las curvas de liberación son parecidas a las obtenidas para una difusión Fickiana pero con un

ritmo más lento hacia el equilibrio. Se asocia incluso a la presencia de poros en la matriz polimérica, y la consiguiente difusión simultánea a través de la matriz hinchada y a través de los poros llenos del medio de disolución. Para $n > 0,85$ se tiene un Super-caso II, que se caracteriza por una liberación muy rápida (**Viseras-Iborra, 2008; Siepmann J. y Siepmann F., 2008**). La Ec. 27, presenta las siguientes limitaciones:

- Los coeficientes de difusión deben ser independientes de la concentración.
- Solo es aplicable hasta el 60% de la cantidad de compuesto activo liberado.
- El transporte debe tener lugar en una sola dirección.

En relación a la última limitación, *Peppas* planteó que su uso sólo era adecuado para películas finas, quedando para las formas esféricas y cilíndricas limitado a ajustes aproximados. Por ello, posteriores estudios condujeron a desarrollar modelos que tomaran en cuenta la dependencia del exponente cinético respecto a la geometría del sistema.

A partir de la Ec. 27 se plantea otra ecuación semi-empírica modificada con la incorporación del denominado tiempo de retraso introducido por **Kim y Fassihi, (1997)**, según la expresión:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k(t - t_{ret})^n + b \quad (28)$$

Donde, k es una constante, b es la fracción total del compuesto liberado por el “efecto estallido”, lo que hace referencia a la salida rápida desde el sistema, y t_{ret} es el tiempo de retraso como período de tiempo en el que se percibe nuevamente una cantidad significativa de compuesto liberado una vez ocurrido el efecto estallido.

Otro modelo semi-empírico fue desarrollado por *Peppas y Sahlin*. Este modelo permite conseguir un poco más de información sobre la naturaleza de la difusión del compuesto activo, ya que considera el componente difusional y la contribución por transporte anómalo debido al hinchamiento del polímero o componente de relajación por separado (**Siepmann y Peppas, 2012**). Este modelo se puede expresar como:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad (29)$$

Donde M_t es la cantidad de compuesto liberado a tiempo t , M_∞ la cantidad de compuesto que se liberaría a tiempo infinito, y, por tanto, M_t/M_∞ es la fracción del compuesto que se ha liberado a tiempo t , m es el exponente de difusión fickiano válido para cualquier geometría del sistema de liberación, k_1 la constante correspondiente a la difusión y k_2 es la constante que refleja la relajación del polímero.

El primer término, representa la contribución difusional de *Fick* ($k_1 t^m$) y el segundo término se refiere al Caso II o contribución por relajación del polímero, dado que se asume que son aditivos (**Siepmann y Peppas, 2012**). Entonces, la liberación del soluto desde cualquier sistema polimérico, independientemente de su forma geométrica, puede describirse como la suma de dos mecanismos: la difusión de acuerdo a la *Ley de Fick* y la relajación con consiguiente hinchamiento de la estructura polimérica. Si el polímero no se hincha, la Ec. 29 se transforma en la Ec. 27 siendo $m = n$. La aplicación de la Ec. 29, a sistemas hinchables genera los mismos exponentes difusionales recogidos en la Tabla 2.6.

2.6.2.2 Modelo de Gallagher-Corrigan.

Diferentes autores han propuesto la liberación del fármaco como un proceso de difusión en una matriz simple, que presenta la degradación del polímero en una etapa posterior a la liberación del fármaco. Por otra parte, se ha considerado la liberación del fármaco como dependiente únicamente de la degradación del polímero. Alternativamente, otros autores han combinado estos mecanismos considerando la contribución del “efecto estallido” en la superficie y/o el hinchamiento del polímero para explicar el perfil de liberación. Este concepto del “efecto estallido”, en la etapa inicial del perfil de liberación del compuesto también había sido propuesto por **Kim y Fassihi (1997)**. Además, cabe destacar otros aspectos como el tamaño y cantidad de macromoléculas del principio activo disponibles. En este sentido, ha observado que con una baja cantidad de macromoléculas es probable que el mecanismo dominante sea la degradación del polímero. Mientras que para moléculas de principio activo pequeñas con una gran cantidad disponible predomina el mecanismo difusional en la matriz. Por estas razones, no se ha llegado a un consenso general que permita al formulador predecir cuantitativamente el perfil de liberación probable para un sistema compuesto

activo/polímero dado. Sin embargo, queda claro que el mecanismo de liberación a partir de un polímero específico es conocido por ser altamente dependiente de la característica fisicoquímica del compuesto activo, su cantidad disponible y las variables de preparación implicadas en el proceso de elaboración de la cápsula o dispositivo. De este modo, **Gallagher-Corrigan (2000)** proponen la siguiente expresión matemática:

$$f_t = f_{tmax}(1 - e^{-k_1 t}) + (f_{tmax} - f_B) \left(\frac{e^{k_2 t - k_2 t_{2max}}}{1 + e^{k_2 t - k_2 t_{2max}}} \right) \quad (30)$$

Donde, f_t es la fracción del compuesto liberado en tiempo t , f_{tmax} es la fracción máxima liberada del compuesto durante el proceso, f_B es la fracción del compuesto liberado durante la primera etapa o “efecto estallido”, k_1 es la constante cinética de primer orden (1^{era} etapa de liberación) en unidades t^{-1} , k_2 es la constante cinética de la segunda etapa del proceso de liberación o degradación de la matriz y t_{2max} es el tiempo máximo del ratio de liberación del compuesto.

El modelo de *Gallagher-Corrigan* representa una expresión semi-empírica que describe dos etapas en el proceso de liberación, y es desarrollada considerando que la liberación del compuesto no está limitada químicamente por su interacción con la matriz polimérica (**Balcerzac y Mucha, 2009**).

2.7 Alimentos funcionales.

Las nuevas tendencias tecnológicas se han enfocado en la producción de alimentos funcionales mediante la incorporación de los mismos de compuestos activos tales como vitaminas, aminoácidos, minerales, antioxidantes e incluso células, enzimas y microorganismos probióticos beneficiosos para la salud, y por tanto, de su conservación en los alimentos durante el procesamiento y almacenaje (**Parra-Huertas, 2010**). Este apartado hace una breve reseña de las últimas tendencias en el desarrollo de alimentos funcionales, así como del uso de compuestos bioactivos tales como los polifenoles, debido a sus múltiples beneficios y gran sensibilidad a ser degradados por lo que requieren protección para su aprovechamiento. Finalmente, se destacan las características del extracto natural de Cacao (*Theobroma cacao L.*) como fuente rica en polifenoles y que es empleada en este estudio de encapsulación con alginato para aplicaciones alimentarias.

2.7.1 Tendencias en el desarrollo de alimentos funcionales.

En las últimas décadas, las demandas del consumidor en el ámbito de la producción de alimentos han cambiado considerablemente. La creencia de que los alimentos contribuyen directamente a su salud, no sólo por proporcionar los nutrientes necesarios sino incluso para prevenir enfermedades es cada vez más frecuente. Según la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO), y la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO), varios patrones de la dieta, junto con los hábitos de vida, constituyen los principales factores de riesgo en relación con el desarrollo de enfermedades del corazón, cáncer, diabetes, obesidad, osteoporosis y de tipo periodontal (**WHO, 2003**). En este sentido, los alimentos funcionales juegan un papel importante siendo por ello de gran interés (Figura 2.16). El éxito de los productos funcionales depende no sólo del desarrollo del producto sino de la aceptación del consumidor, y por tanto se deben tener en cuenta factores como: sabor, apariencia, propiedades químicas, estabilidad, propiedad funcional saludable y precio. Por tanto, la industria de los alimentos debe considerar diferentes variables para su desarrollo o rediseño (**Betoret, et al., 2011**).

Las tecnologías tradicionales más empleadas para el procesamiento de alimentos funcionales, han sido: la formulación y mezcla, muy usadas debido a su simplicidad y economía, con la incorporación de compuestos bioactivos para cubrir deficiencias de vitaminas, minerales, entre otros. Por otra parte, la técnica de cultivo y cría de animales, como principal fuente de nutrientes para la vida humana. Seguidamente, se han desarrollado tecnologías específicas para el desarrollo de alimentos funcionales que previenen el deterioro de compuestos fisiológicamente activos, tales como:

- **Microencapsulación:** el desarrollo de una cápsula que permita controlar las interacciones de los compuestos con el medio ambiente, ha facilitado la protección de una amplia gama de materiales de interés biológico. Debido a su versatilidad, esta tecnología está siendo estudiada por diferentes campos como la biomedicina, biofarmacia y recientemente por la industria alimentaria para el suministro de productos nutracéuticos.

- **Películas y recubrimientos comestibles:** se refiere a los revestimientos o envolturas que poseen diferentes alimentos con la finalidad de alargar su vida útil.

- **Impregnación al vacío:** se emplea para introducir solutos en la estructura porosa de los alimentos, lo que modifica su composición sin alterar la integridad del mismo (productos hortofrutícolas).

El desarrollo de los alimentos funcionales representa una oportunidad para obtener nuevos productos, innovadores y versátiles que permitan satisfacer la demanda actual de los consumidores. Aunque las tecnologías más usadas siguen siendo las tradicionales (Figura 2.16). Del año 2000 al 2010 se ha observado una creciente tendencia a las investigaciones y aplicación de tecnologías especiales dirigidas a cubrir necesidades específicas de nutrición y para la prevención de enfermedades que permitan mejorar la calidad de vida (**Betoret et al., 2011**).

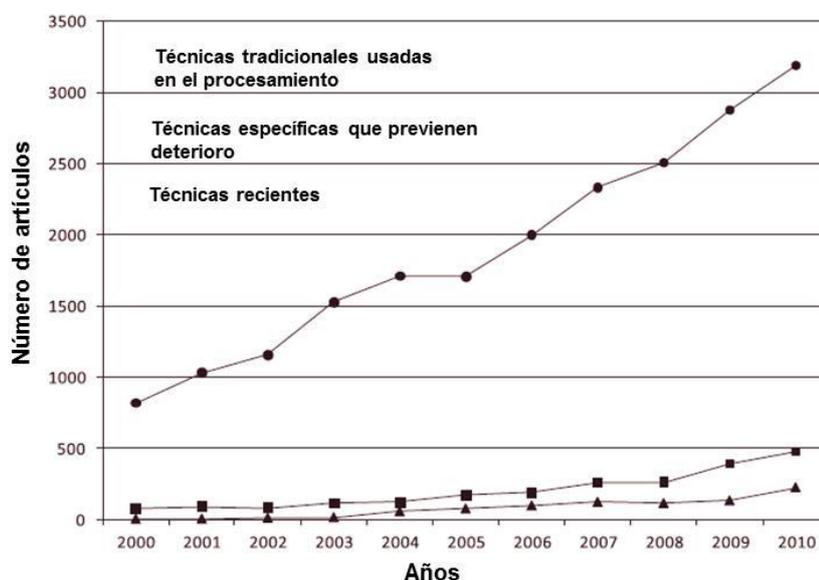


Figura 2.16 Tendencia de los artículos relacionados con alimentos funcionales en el tiempo (**Betoret et al., 2011**).

2.7.2 Compuestos bioactivos: Polifenoles.

Este apartado, describe de forma general las características fisicoquímicas y estructurales, la biodisponibilidad y beneficios de los polifenoles para la salud humana. Además, se analiza de forma específica el extracto de Cacao como fuente de polifenoles, debido a su uso como compuesto activo a encapsular en alginato en este trabajo.

2.7.2.1 *Características fisicoquímicas y estructurales de los polifenoles.*

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas, y por lo general desempeñan diversas funciones de protección frente al ataque de agentes patógeno, así como para la defensa contra la radiación ultravioleta. En los alimentos, los polifenoles pueden contribuir a la amargura, la astringencia, color, sabor, olor y estabilidad oxidativa. Se han identificado más de 8.000 compuestos polifenólicos en diferentes variedades de plantas. Todos los compuestos fenólicos vegetales surgen a partir de un intermediario bioquímico común, la fenilalanina, u otro precursor como el ácido siquímico. Poseen estructura de anillos aromáticos y enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante. Los polifenoles se pueden clasificar en diferentes grupos en función del número de anillos de fenol que contienen, y sobre la base de sus elementos estructurales. Las principales clases de polifenoles son los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (**Bhooshan y Rizvi, 2009**).

- **Ácido Fenólicos:** se dividen en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Éstos representan alrededor de un tercio de los compuestos polifenólicos en nuestra dieta, y se encuentran en material vegetal, particularmente en las frutas ácidas, entre los más comunes, el ácido cafeico, gálico y ferúlico.
- **Flavonoides:** son los polifenoles más abundantes en la dieta, se han identificado más de 4000 variedades de estos, la mayoría responsables de los colores atractivos de las flores, frutas y hojas. Su estructura base puede sufrir muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que son una gran familia de diversos compuestos pero siempre manteniendo las características polifenólicas y solubles en agua. Existen seis clases principales: las chalconas, flavonas, flavanoles, flavandioles, antocianinas y taninos condensados. Otros derivados son los isoflavonoides y neoflavonoides. Las diferencias individuales dentro de cada grupo surgen del número y disposición de los grupos hidroxilos, así como del grado de alquilación. Algunos de los más comunes son: la quercetina, miricetina y catequina. La catequina debido a su estructura posee en su molécula dos centros de quiralidad, por tanto tiene cuatro diastereoisómeros, dos son isómeros de configuración *trans* y se denominan catequina, y los otros dos son de configuración *cis* conocidos como epicatequina (Figura 2.17).

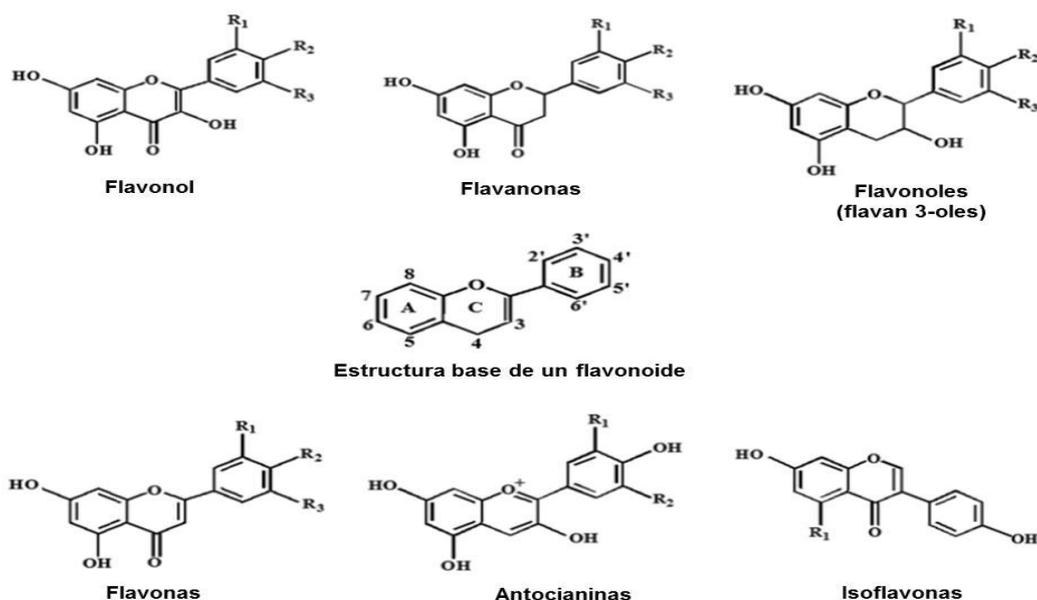


Figura 2.17 Estructura química de la sub-clase de los flavonoides (Bhooshan y Rizvi, 2009).

- **Estilbenos:** son hidrocarburos aromáticos que contienen dos restos fenilos conectados por un puente de carbono metileno, la mayoría de estos actúan en las plantas como fitoalexinas, es decir, como compuestos antimicrobianos que se acumulan y sintetizan sólo en respuesta a una infección o lesión (Ej: el resveratrol).
- **Lignan:** son compuestos difenólicos que se forma por la dimerización de dos residuos de ácido cinámico. Son uno de los dos grupos principales de fitoestrógenos, que son antioxidantes. La otra clase de fitoestrógenos son las isoflavonas.

2.7.2.1.a Extracto de Cacao rico en polifenoles.

La semilla del Cacao, *Theobroma cacao L. (Sterculiaceae)*, almacena sus polifenoles en las células pigmentarias en los cotiledones. Dependiendo de la cantidad de antocianinas, son de color blanco o purpura. La composición de polifenoles consta de tres grupos: los flavanoles o flavan-3-oles (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). Respecto a la distribución específica de compuestos en dichos grupos, se tiene: por encima del 35% (-) epicatequina y en menores cantidades la (+) catequina con solo trazas de (+) galocatequina y (+) epigalocatequina. La fracción de antocianinas está dominada por cianidina-3- α -L-arabinósido y cianidina-3- β -D-galactósido. Y las proantocianidinas son en su

mayoría flavan-3,4 dioles unidos formando dímeros, trímeros u oligómeros con la (-) epicatequina (**Wollgast y Anklan, 2000**).

Las propiedades antioxidantes del cacao se han estudiado ampliamente en los últimos años. Se ha reportado que el consumo de cacao, debido a su contenido de flavanoles, mejora la función endotelial y reduce procesos inflamatorios, efectos que han sido directamente vinculados a la presencia de metabolitos en plasma derivados de las procianidinas. Además, diversos estudios han evidenciado que la biodisponibilidad de los polifenoles del cacao está fuertemente relacionada con el tamaño molecular, al encontrarse una mayor concentración de compuestos polifenólicos de bajo peso molecular en sangre, que por tanto tienen una mejor oportunidad de llegar a los órganos en el cuerpo (**Schinella et al., 2010**).

En general, existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres. Otros autores se refieren a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa, oxidasa y la xantina oxidasa, evitando las reacciones de oxidación, así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa, al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, tales como la catalasa y la superóxido dismutasa. De esta forma, los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de los radicales libres y en la formación de los radicales en sí. (**Morales et al., 2012**).

2.7.2.2 Biodisponibilidad y beneficios de los polifenoles para la salud humana.

La biodisponibilidad es la proporción del alimento que se digiere, absorbe y metaboliza a través de las vías digestivas. La biodisponibilidad de cada polifenol es diferente, tampoco existe una relación entre la cantidad de polifenoles en los alimentos y su biodisponibilidad en el cuerpo humano. Generalmente, las agliconas pueden ser absorbidas por el intestino delgado, sin embargo la mayoría de los que polifenoles están presentes en los alimentos, se encuentran en forma de ésteres, glucósidos o polímeros que no pueden ser absorbidos en su forma nativa. Antes de su absorción, estos compuestos deben ser hidrolizados por enzimas intestinales o la

microflora del colon. Durante este proceso, los polifenoles son modificados, de hecho se conjugan en las células intestinales y más tarde en el hígado. En los alimentos, todos los flavonoides excepto los flavanoles se encuentran en la forma glucosilada. El destino de los glucósidos en el estómago no está claro aún. La mayoría de los glucósidos, probablemente resisten la hidrólisis ácida en el estómago, y por tanto llegan intactos al intestino donde sólo las agliconas y algunos glucósidos pueden ser absorbidos (**Bhooshan y Rizvi, 2009**).

En relación a los beneficios, numerosos estudios han demostrado que el consumo de polifenoles ha limitado la incidencia de enfermedades coronarias del corazón, como la arteriosclerosis. Entre los polifenoles más destacados por producir dicha acción inhibidora se tienen la quercetina y catequinas. También, se han observado efectos antitrombóticos por medio de la inhibición de la agregación plaquetaria, asociada al consumo diario de té negro y vino tinto, por la presencia de resveratrol que inhibe la enzima (ciclooxigenasa) causante de la síntesis del tromboxano y responsable de las trombosis. Por otra parte, se ha encontrado que muchos polifenoles como la quercetina, catequinas, isoflavonas, lignanos, flavanonas, resveratrol y ácido elágico poseen propiedades anticancerígenas, especialmente como protectores y reductores de tumores o de su crecimiento. Asimismo, se ha demostrado un efecto antidiabético al inhibir la absorción de la glucosa en el intestino, en estudios específicos con (+) catequina, (-) epicatequina, (-) epicatequingalato e isoflavonas. Otros estudios presentan beneficios en enfermedades neurológicas como el Alzheimer y el Parkinson, causadas por el estrés oxidativo (**Bhooshan y Rizvi, 2009**).

2.7.2.3 Uso de antioxidantes naturales en alimentos.

Las oxidaciones lipídicas ocurren en presencia de oxígeno (aire), luz o metales, por ello se añaden a los alimentos agentes inhibidores que retarden este proceso o lo eviten completamente. Frecuentemente se emplean productos químicos sintéticos debido a su fácil acceso, economía, gran calidad y capacidad antioxidante. Aunque la legislación aprueba su uso como aditivos alimentarios para alargar la vida útil de los productos se requieren pruebas más complejas que garanticen su completa seguridad. En este sentido, la tendencia en las últimas décadas, ha sido incorporar compuestos de origen natural con miras a sustituir los antioxidantes

sintéticos por compuestos más seguros con la misma función protectora. Entre algunas fuentes naturales de compuestos inhibidores de la oxidación, se tienen: aceites y semillas oleaginosas (tocoferoles, fosfolípidos); el salvado de avena y arroz (compuestos derivados de la lignina); especias, hierbas, té y cacao (compuestos polifenólicos) y proteínas e hidrolizados (aminoácidos) (**Pocorný, 1991**).

En los últimos años, ha habido un interés creciente por el desarrollo de envases activos que mejoren la seguridad alimentaria y su vida útil. Principalmente, se han desarrollado embalajes con compuestos activos alimentarios que permitan la eliminación del oxígeno, la humedad por absorción, el dióxido de carbono o la generación de etanol, con la incorporación en algunos casos de un sistema de protección microbiano (antioxidantes y agentes antimicrobianos), considerando materiales biodegradables y compuestos naturales (**Wang et al., 2013**).

Por otra parte, se ha investigado ampliamente la actividad antimicrobiana de los polifenoles, entre los que han recibido mayor atención, se tienen los flavan-3-oles, flavonoles y taninos. Respecto a los flavan-3-oles, se conoce la actividad antibacteriana de las catequinas, cuando se demostró que estos compuestos, en gran parte presentes en el té oolong y verde (*Camellia sinensis*), fueron capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de varias especies bacterianas, tales como *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Campilobacter jejuni*, *Clostridium perfringes*, y *Escherichia coli*. En lo que se refiere a los flavonoles, se ha demostrado una notable actividad contra varias bacterias Gram-positivas, tales como *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Actinomyces naeslundii* (**Daglia, 2012**).

En este sentido, los polifenoles obtenidos de fuentes naturales prometen ser aditivos alimentarios altamente beneficiosos para la industria alimentaria que pueden sustituir a los sintéticos existentes.

2.8 Análisis Sensorial.

Este apartado describe aspectos generales del análisis sensorial como técnica de evaluación de la percepción de las características organolépticas de los alimentos (color, sabor, olor, textura) cuando el analizador es el ser humano. Las posibles pruebas empleadas de tipo analíticas o afectivas, que permiten evaluar sensorialmente factores muy específicos de un alimento con la finalidad de conocer su aceptación o rechazo, preferencia o nivel de agrado en caso de introducir un

nuevo producto o que haya sido modificado respecto a su formulación original. Por otra parte, se describe la técnica de análisis del perfil de textura con la finalidad de obtener características mecánicas como: dureza, elasticidad, gomosidad, cohesividad y masticabilidad, propias de la aplicación de un esfuerzo sobre el alimento que simula el proceso de masticación. El presente estudio evalúa la aplicación de los encapsulados con el extracto de cacao en un alimento. En este sentido, es importante determinar la aceptación o rechazo del alimento funcional por el consumidor, así como cuantificar las propiedades texturales del producto a objeto de evaluar su variación en el tiempo durante el almacenamiento, lo que sería indicativo de una cierta degradación.

2.8.1 Aspectos generales.

La calidad sensorial de un alimento, no es una característica propia de este, sino el resultado de la interacción alimento-hombre, por tanto podría decirse que es una sensación humana provocada por sus sentidos (gusto, olfato y vista) produciendo diferentes sensaciones: color, forma, tamaño, aroma, textura y sabor. Bajo estas consideraciones, es importante la planificación correcta del análisis sensorial incluyendo aspectos de tipo: ambiental, práctico (relacionado con las muestras), informativos y humanos. En tal sentido, los aspectos ambientales se relacionan directamente con factores externos que pueden influir sobre el evaluador, por tanto, se requiere un entorno cómodo y confortable tanto para la preparación de las muestras como para su evaluación. Mientras que, los aspectos prácticos se relacionan con la muestra que se evalúa, y se refieren a su uniformidad, presentación, efecto contraste (posición en que se asigna cada muestra), efecto de convergencia (cuando se evalúan más de dos al mismo tiempo), preparación de las muestras, temperatura de las muestras, codificación, tamaño y cantidad suficiente para que se pueda realizar la evaluación, y empleo de utensilios inertes que no aporten ni sabor ni olor al producto. Los aspectos informativos consisten en suministrar toda la información al evaluador sobre tiempo para el análisis, posibilidad o no de probar la muestra varias veces, horario y fecha del análisis, uso de agente enjuagante para eliminar sabor residual entre muestras (agua, galletas neutras, pan), diluyente o vehículo en caso de alimentos que no se consumen solos (Ej. mayonesa), resaltar el periodo de degustación entre una muestra y otra (15-30

segundos) e informaciones adicionales necesarias para evitar interferencias. Y finalmente, considerar que los participantes son seres humanos (aspectos humanos) sensibles tanto desde el punto de vista psicológico como el fisiológico, por tanto deben ser preparados a fin de que emitan juicios exactos y confiables. Se distinguen dos tipos de jueces: los analíticos y los afectivos. Los tipo analíticos se caracterizan por presentar una sensibilidad sensorial específica para uno o varios productos tomando en cuenta aspectos como la edad, sexo, carácter y responsabilidad, afinidad por la muestra y disponibilidad. Por el contrario, los tipo afectivo son individuos escogidos al azar (no entrenados) y representativos de la población a la cual se estima que está dirigido el producto. La finalidad de aplicar una prueba sensorial con este tipo de evaluador es conocer la aceptación, preferencia o nivel de agrado de un producto (**Espinosa-Manfugás, 2007**).

2.8.2 Métodos de Evaluación Sensorial.

Cualquiera que sea la prueba que se vaya a emplear, es necesario que los participantes comprendan la necesidad de efectuar la misma de la manera lo más objetiva posible, que demuestren su capacidad de seguir instrucciones y una ejecución correcta. Las pruebas que pueden ser utilizadas, se dividen en: pruebas afectivas, pruebas discriminativas y descriptivas (**Lawless y Hildegarde, 2010**).

2.8.2.1 Pruebas Afectivas.

Se realizan con individuos o jueces no entrenados, se requieren un mínimo de 100 jueces escogidos de manera aleatoria con la finalidad de simular consumidores habituales o potenciales del producto que se evalúa. Los resultados permiten evaluar la aceptación o rechazo, preferencia o nivel de agrado de uno o más productos, por medio de un cuestionario simple, claro y conciso para evitar fatiga y confusión en los jueces. Los tipos de pruebas se clasifican en pruebas de preferencia, pruebas de aceptación y pruebas escalares.

2.8.2.2 Pruebas Discriminativas.

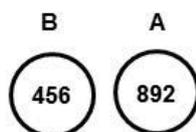
Se realizan en condiciones controladas con individuos o jueces entrenados. Son las pruebas sensoriales más sencillas y utilizadas con gran utilidad práctica, se

limitan simplemente a responder si existe alguna diferencia perceptible entre dos productos. Su análisis se fundamenta en frecuencia y proporciones estadísticas (respuestas correctas o incorrectas), por lo que sus resultados permiten inferir si un grupo de personas ha sido capaz de identificar un producto correctamente de una serie de similares o tipo control. Las pruebas más comunes son: comparación apareada simple, dúo-trío, triangular, ordenamiento y comparación múltiple. A continuación se describen los métodos más usados y se muestran ejemplos en la Figura 2.18:

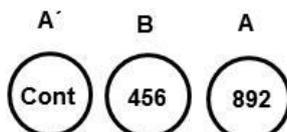
- **Apareada simple:** permite evaluar simultáneamente dos muestras con el objeto de determinar si existe diferencia perceptible entre ellas. Es una prueba fácil de realizar y el agotamiento del juez es relativamente bajo. Se requieren entre 100 a 200 jueces y se emplea la tabla de significancia para pruebas de dos muestras; de acuerdo al nivel de significancia y número de jueces participantes se verifica el número mínimo de respuestas correctas para que haya diferencia significativa entre muestras.
- **Dúo-Trío:** se muestra al juez una muestra control o referencia y dos muestras codificadas, de las cuales una es igual a la muestra control. El par debe estar dispuesto aleatoriamente, de forma que el juez identifique cuál es igual a la referencia. Aunque la prueba es sencilla, requiere un esfuerzo mayor por parte del evaluador y mayor tiempo de preparación respecto a la tipo pareada. En esta prueba, la posibilidad de responder correctamente por efectos del azar es del 50%, por tanto si el valor de respuestas correctas excede este porcentaje, se puede afirmar que se ha identificado la muestra control. Requiere de 30 a 100 jueces, se debe fijar desde el inicio con qué nivel de confianza se desea trabajar para hacer uso de las tablas estadísticas.
- **Prueba Triangular:** consiste en presentar tres muestras simultáneamente, dos de ellas iguales y una diferente; el juez tiene que identificar la muestra diferente. Al igual que las pruebas anteriores, se requiere aleatoriedad en la presentación de las muestras debiéndose ofrecer si es necesario las seis combinaciones posibles, en las cuales las posiciones de las muestras son diferentes. Requiere entre 15 a 30 jueces y tiene la ventaja de que la probabilidad de respuestas por efectos del azar se reduce con respecto a los dos tipos anteriores, pasando a ser del 33%, por esto en

la práctica es de mayor utilidad. Igualmente, se debe seleccionar un nivel de significancia para determinar el número mínimo de respuestas correctas.

Pareada: ¿Cuál muestra es más dulce?



Dúo-Trio: Escoge la muestra que es igual a la control



Triangular: Escoge la muestra con mayor diferencia

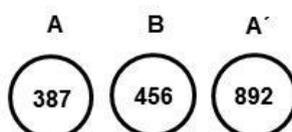


Figura 2.18 Ejemplo de pruebas discriminatorias (Lawless y Hildegarde, 2010).

2.8.2.3 Pruebas Descriptivas.

Las pruebas descriptivas en general son más complejas ya que son los jueces quienes establecen los descriptores que definen las diferentes características o atributos sensoriales de un producto, y a través de ellos cuantifican las diferencias existentes entre varios productos. Requieren un menor número de jueces entrenados, entre 5 y 10, y un procesamiento más laborioso de los resultados. Los componentes del análisis descriptivo se basan en la intensidad de un estímulo, orden de aparición, la identificación de la característica y la impresión general del producto. Para llevar a cabo las pruebas se requieren escalas que permitan su medición tales como: escalas de categoría, escalas de líneas y escalas de estimación de magnitud. Entre los tipos de pruebas, se tienen: el perfil de sabor, perfil de textura, cuantitativo, tiempo y libre (Espinosa-Manfugás, 2007).

2.8.3 Análisis de Perfil de Textura (TPA).

Considerando que la textura es principalmente un atributo sensorial, su estudio tradicionalmente se ha fundamentado en la percepción general desde el

punto de vista sensorial de un grupo de personas. Sin embargo, al referirse a un análisis de perfil de textura se hace referencia un método de tipo instrumental para su cuantificación. Según **Bourne y Szczesniak (2003)**, el análisis de perfil de textura (TPA) implica la compresión de un bocado de alimento dos o más veces mediante un movimiento alternativo que simula la acción de la mandíbula. La curva de fuerza-tiempo resultante se utiliza entonces para cuantificar un número de parámetros de textura que se correlacionan bien con los resultados de la evaluación sensorial (**Otegbayo et al., 2007**).

2.8.3.1 Aspectos generales del TPA.

La medición de la textura sensorial se percibe principalmente por el tacto (lo táctil sentido), aunque los ojos y los oídos pueden proporcionar información sobre algunos importantes componentes de perfil de textura total de un producto. Tradicionalmente, se han empleado para la evaluación de la textura métodos sensoriales que puede parecer que carecen de precisión en las investigaciones científicas debido a la variabilidad en la percepción de persona a persona, gustos o disgustos, efecto de la hora y día en que se realizan, entre otros. Sin embargo, su gran importancia en la determinación de la calidad de alimentos existentes, modificados o nuevos productos ha conducido al desarrollo de nuevos métodos de análisis de tipo instrumental que se correlacionen con los tradicionales (**Bourne, 2002**).

En este sentido, los fundamentos del análisis moderno de la textura sensorial se han construido gracias a las propuestas hechas por **Szczesniak (1963)** en la “General Foods Corporation” actual Kraft Foods, a través del denominado método de “Análisis de Perfil de Textura”, que mide el parámetro “textura” objetivamente a través de la imitación del proceso de masticación. El TPA propuesto por *Szczesniak*, viene descrito por una unidad compuesta de una placa de apoyo, un brazo flexible unido a un calibrador de tensión y un émbolo que actúa sobre la muestra, por lo general una pieza equivalente al tamaño de un trozo común para morder, el cual comprime dos veces mediante un movimiento de vaivén que imita la acción de la mandíbula. El medidor de tensión detecta la fuerza generada, que es grabada en un registrador de banda. La curva obtenida se representa por un gráfico de fuerza como función del tiempo. Su interpretación se basa en la clasificación de los parámetros

mecánicos de la textura. La curva proporciona siete parámetros texturales, cinco medidos y dos calculados a partir de los medidos. Estos parámetros corresponden a: dureza, cohesividad, elasticidad, adherencia, fragilidad, masticabilidad, gomosidad y la viscosidad (Pons y Fiszman, 1996). En la Figura 2.19, se tiene una curva típica de perfil de textura, donde se señalan los factores de medición que permiten definir los parámetros texturales.

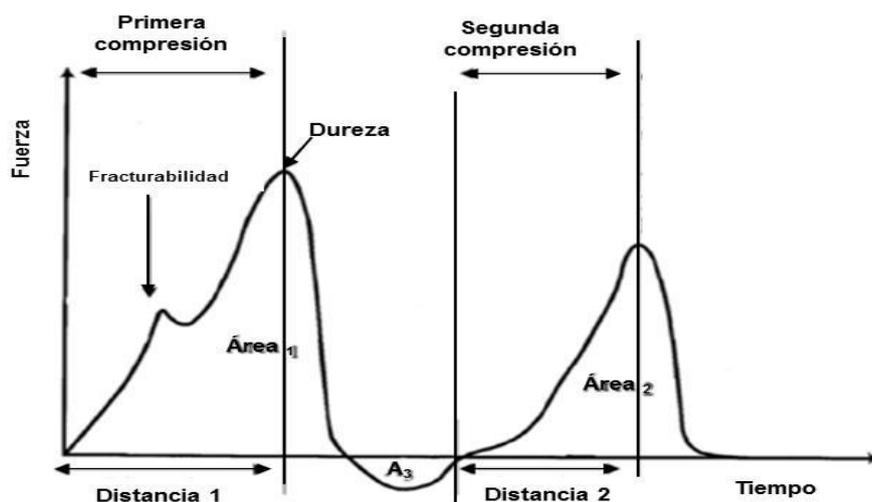


Figura 2.19 Típica curva de un análisis de perfil de textura instrumental. Obtenida de www.texturetechnologies.com, http://128.121.92.221/texture_profile_analysis.html".

Donde, Distancia 1 representa el tiempo de recorrido de la primera compresión, Distancia 2 es el tiempo de recorrido de la segunda compresión, A_1 y A_2 son las áreas bajo las curvas para la primera y segunda compresión respectivamente. Dureza, es la fuerza máxima de la primera compresión (N), Fracturabilidad, es el punto de inflexión que se puede presentar en la primera compresión y A_3 corresponde a la adhesividad.

Las definiciones de los parámetros texturales, vienen dadas a continuación (Pons y Fiszman, 1996):

- **Dureza:** es la fuerza máxima de la primera compresión (primer bocado), representado por el pico del primer ciclo de compresión.
- **Elasticidad:** se calcula mediante la relación de la distancia dada por la segunda compresión respecto a la distancia de la primera compresión ($\text{Distancia } 2 / \text{Distancia } 1$). También conocido como índice de elasticidad, al representar la recuperación de la muestra durante el tiempo que transcurre entre el final de la

primera mordedura y el inicio de la segunda. Un alto índice de elasticidad representa una textura gomosa mientras que un bajo índice hace referencia a un producto quebradizo.

- **Cohesividad:** se calcula como un ratio entre el área de la segunda compresión respecto al área de la primera compresión ($\text{Área}_2/\text{Área}_1$). Se define como una relación de trabajo dada por los dos ciclos de compresión, y sirve como indicador de la viscoelasticidad de la muestra. Un valor próximo a 1 indica total elasticidad, mientras un valor próximo a cero indica que la muestra no se recupera en absoluto. Esto puede ser relacionado con la fuerza de los enlaces internos que componen el cuerpo de la muestra.
- **Gomosidad:** es el producto de la dureza por la cohesividad expresada en unidades de fuerza (N), y simula la energía requerida para desintegrar un alimento semi-sólido con objeto de ser deglutido. En una evaluación sensorial tradicional, se evalúa por la cantidad de movimiento necesario antes de que el alimento se desintegre.
- **Masticabilidad:** es el producto de la gomosidad por la elasticidad expresada en unidades de fuerza (N) y sólo es aplicable a productos sólidos. Se relaciona con la energía requerida para masticar un producto hasta un estado adecuado para la deglución, e íntimamente vinculado a los parámetros primarios de dureza, cohesividad y elasticidad.
- **Adhesividad:** dada por el área de fuerza negativa al final del primer ciclo de compresión, que representa el trabajo necesario para tirar del émbolo cierta distancia de la muestra. Es decir, el trabajo necesario para superar las fuerzas de atracción entre la superficie de la muestra y la superficie de otros materiales con los que el alimento entra en contacto, por lo que la adherencia se relaciona con las propiedades superficiales.
- **Fracturabilidad:** originalmente conocido con el término fragilidad, se define como la fuerza dada por la primera ruptura significativa en la curva y del material. La existencia de una ruptura es un fenómeno visible relacionado con la macroestructura de la muestra y debe ser identificado como un cambio en la inflexión de la curva.

2.8.3.2 Consideraciones para realizar un TPA.

Las condiciones de trabajo reportadas por diversas investigaciones son diferentes, haciendo que los resultados sean imposibles de comparar. Estas diferencias vienen dadas por las condiciones experimentales tales como: forma y tamaño de la muestra, relación de compresión y tamaño de la sonda empleada frente a la muestra, grado de deformación, velocidad, número de ciclos de compresión y repeticiones por valores medios. Por ello es importante definir estos aspectos a fin de tomar consideraciones al momento de diseñar un estudio mediante el uso de TPA (**Pons y Fiszman, 1996**).

- **Forma y tamaño de la muestra:** en general es recomendable disponer la muestra en moldes de diámetro y altura estándar, o la reducción de la muestra mediante cortes específicos que proporcionen tamaños estándar como cubos o cilindros.
- **Tamaño de la sonda empleada frente a la muestra:** la relación entre el tamaño de la muestra y el tamaño de la unidad de compresión o sonda ciertamente determina las magnitudes de los resultados. Así, cuando la sonda es más grande que la muestra, las fuerzas registradas son en gran parte debido a la compresión uniaxial. En caso contrario, las fuerzas se derivan en gran parte de la punción, una combinación de compresión y cizalla.
- **Grado de deformación:** su elección dependerá de la finalidad de la prueba. Si se trata de imitar el proceso de masticación altamente destructivo en la boca, los valores de deformación para romper la muestra deben alcanzar entre 70-80%. Sin embargo, en trabajos recientes se han aplicado niveles de deformación entre el 20-30%, en cuyo caso las muestras no se rompen pero es posible obtener información valiosa sobre los parámetros más importantes (dureza, elasticidad, cohesividad y sus derivados).
- **Velocidad:** las velocidades de compresión más utilizadas están comprendidas entre 10 y 250 mm/min, y dependen de los límites del instrumento empleado. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que el aumento de la velocidad también incrementa la fuerza requerida para lograr una compresión. De hecho, estos estudios han establecido que el aumento de la velocidad de compresión conduce a un aumento en la dureza, al observar el comportamiento de la dureza como función de la velocidad de compresión entre 0,02 mm/s hasta 100 mm/s, mostrando una relación logarítmica entre ellos (**Rosentahl, 2010**).

- **Número de ciclos de compresión:** teniendo en cuenta las características de los equipos utilizados, en algunos casos puede programarse un tiempo entre ciclos de compresión. En caso de que un periodo de tiempo pueda ser seleccionado, debe especificarse en las condiciones de prueba, ya que la cantidad de tiempo entre ciclos se relaciona claramente con los parámetros dados por un TPA.
- **Efecto de la lubricación:** el efecto de fricción entre las placas y la superficie de la muestra puede contribuir a un valor de dureza mucho mayor al esperado. Para obtener información real sobre las propiedades mecánicas de los alimentos, los resultados deben ser reproducibles, y los parámetros que describen los materiales deben ser independientes de las condiciones de la prueba o dimensiones de la muestra. Lo que significa que las curvas de fuerza-tiempo dependen tanto de la geometría de la muestra, como del área de contacto entre la muestra y las placas. Por tanto, es conveniente para evitar este tipo de efectos de fricción, la realización de experimentos preliminares utilizando aceite mineral o vegetal entre la muestra y las placas a objeto de detectar si los resultados obtenidos pueden ser influenciados por este factor o no.

2.8.4 Ensayo de Resistencia.

Es un ensayo técnico para determinar la resistencia de un material o su deformación ante un esfuerzo de compresión. En este sentido, todo material sometido a un esfuerzo experimenta una deformación, el cual desaparece cuando también lo hace la fuerza que lo originó. Este comportamiento se cumple mientras la fuerza de compresión no supere un determinado valor denominado resistencia o límite de cedencia, y se admite que, por debajo de este valor, el único mecanismo por el que se produce la deformación es la variación en la distancia de enlace entre átomos, iones o moléculas, conservando en todos los casos las mismas posiciones de equilibrio, este comportamiento es definido como *deformación elástica*. Mientras que, se define *deformación plástica* a la deformación permanente que existe después de retirar la fuerza que lo originó (Núñez *et al.*, 2012).

La textura puede considerarse como un manifiesto de las propiedades mecánicas de un alimento y, por tanto, un atributo importante de calidad que influye en la preferencia del consumidor, procesamiento y manipulación de alimentos, y que por ello puede tomarse como un índice de deterioro. Es por todo esto que existe

interés por tratar de medir la textura a través de métodos cuantitativos. El ensayo de resistencia es una prueba fundamental que ha sido aplicada en la industria alimentaria con la finalidad de medir la firmeza o consistencia de un producto a través del comportamiento de éste cuando la muestra es comprimida por una sonda u otro dispositivo hasta alcanzar el límite de cedencia o comúnmente conocida como fuerza o límite de fluencia. En este sentido, constituye también un método de medición de la textura, ya que puede relacionarse en la práctica con la percepción de textura del alimento entre los dedos o con una cuchara, siendo ésta una prueba de impresión no destructiva. Asimismo ocurre cuando un alimento es llevado a la boca y se obtiene una sensación (impresión no destructiva), seguidamente es separada por la lengua contra el paladar causando su rompimiento (impresión destructiva) (Peng y Regenstein, 2007).

A partir del ensayo de resistencia, se pueden obtener cinco tipos de curvas fuerza-distancia, tal como se muestra en la Figura 2.20.

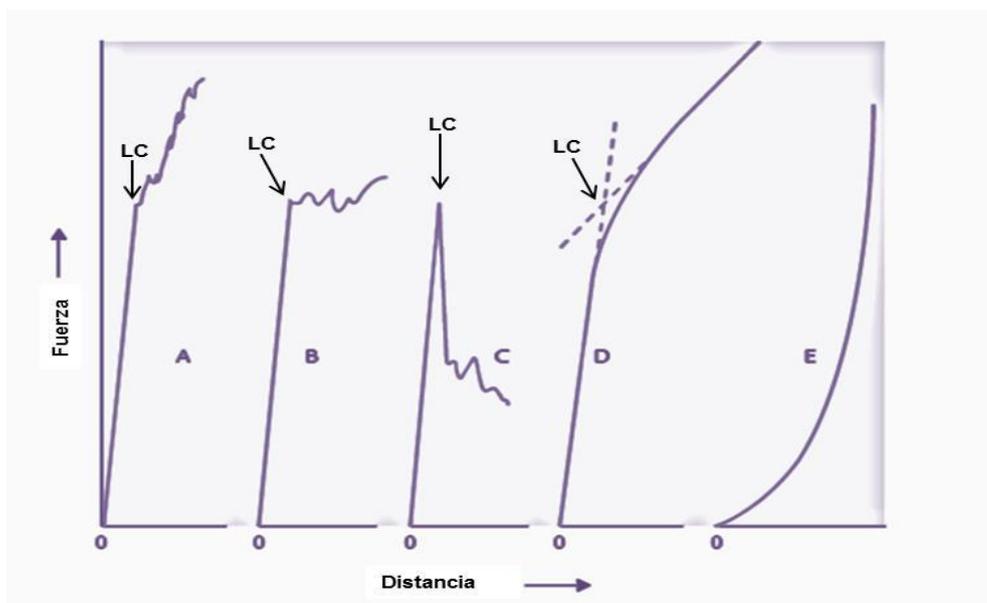


Figura 2.20 Representación de cinco tipos de curvas de fuerza-distancia. LC: límite de cedencia. Tipos básicos de tendencias con: aumento continuo de la fuerza, A; fuerza casi constante, B; disminución de la fuerza, C; cambio gradual de la pendiente donde LC no está claramente definido e inexistencia del LC, E (Peng y Regenstein, 2007).

En los tipos A, B, y C ocurre un rápido aumento inicial de la fuerza para una corta distancia de movimiento. Durante esta etapa, se lleva a cabo una deformación del material tipo plástica, es decir, donde no ocurre una deformación permanente de la estructura, la cual no es de gran importancia en la prueba. Esta etapa termina abruptamente, cuando la sonda causa un aplastamiento irreversible de la muestra,

evento representado en la curva por el repentino cambio en la pendiente. Este cambio representa la mencionada fuerza máxima o límite de cedencia, siendo el punto de mayor interés en la prueba. Se puede observar que las curvas después del límite de cedencia pueden presentar tres tipos básicos de tendencia: A, un aumento continuo de la fuerza. B, una fuerza casi constante y C, una disminución de la fuerza. En la curva D el LC no está claramente delineado, sino que ocurre un cambio gradual en la pendiente (comportamiento asociado a algunas pastas de almidón, coberturas y espumas). Por el contrario, la curva de tipo E, encontrada para algunas pastas de almidón; no muestra la existencia de un límite de cedencia, comportándose esencialmente como un líquido viscoso y, por tanto, siendo una representación no adecuada para éste tipo de ensayo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se describen los materiales, equipos, técnicas y procedimientos experimentales utilizados para la preparación de los diferentes encapsulados de alginato cálcico.

3.1 Materiales.

A continuación se detallan los materiales utilizados en este trabajo, tanto los reactivos como equipos.

3.1.1 Reactivos para la caracterización del alginato de sodio.

- **Alginato de sodio** para la preparación de los geles (Panreac).
- **Ácido algínico** (Sigma Aldrich).
- **Alginato de sodio** como patrón de referencia (Solé Graells).
- **Agua deuterada** 99,9 %D (Euriso-top).
- **Azúcar blanca** de uso comercial (Azucarera).
- **Dextranos** (*Leuconostoc mesenteroides*) grado analítico con distribución estrecha de peso molecular (Sigma Aldrich).
- **Nitrato de sodio** (NaNO_3) $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich).
- **Agua milliQ.**

3.1.2 Reactivos para la preparación de los geles de alginato.

- **Alginato de sodio** (Panreac).
- **Sales de calcio**, las cuales se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Características de las sales de calcio.

Sal	Fórmula	Peso Molecular (g/mol)	Distribuidor
Carbonato de calcio 98,5-100%	CaCO_3	100,09	Panreac
Citrato de calcio 99%	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Ca}_3\text{O}_{14}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	570,50	Sigma Aldrich
Hidróxido de calcio 90%	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	74,09	Sigma Aldrich
Cloruro de calcio $\geq 96\%$	CaCl_2	110,99	Sigma Aldrich

- **Aceite de girasol** refinado (El Corte Inglés distribuido por Aceites del Sur Coosur, S.A).
- **Ácido acético glacial** (CH₃COOH) 99,5 % (Panreac).
- **Hidróxido de sodio** (NaOH) ≥ 98 % en forma de lentejas (Sigma Aldrich).
- **Ácido clorhídrico** concentrado (HCl) 37 % (Panreac).
- **Agua milliQ.**

3.1.3 Reactivos para las emulsiones.

Las emulsiones preparadas para la obtención de las microesferas de alginato de calcio, se formaron a partir de una fase acuosa y una fase oleosa. La fase acuosa constituida por solución de alginato sódico y una solución de carbonato o citrato de calcio, una fase oleosa conformada por aceite vegetal y tensioactivo. Los tensioactivos utilizados se muestran en la Tabla 3.2, todos suministrados por Sigma Aldrich a excepción del Polirricinoleato de Poliglicerol (PGPR) gentilmente suministrado por Lansenor Emul, S.L..

Tabla 3.2 Características de los tensioactivos.

Familia	Nombre común	Nombre	Fórmula	HLB
Ester de sorbitol	Span 80	Monooleato de sorbitán	C ₂₄ H ₄₄ O ₆	4,6
	Span 85	Trioleato de sorbitán	C ₆₀ H ₁₀₈ O ₈	1,8
Ester de sorbitol etoxilados	Tween 20	Monolaureato de polioxietileno sorbitán	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	16,7
	Tween 80	Monooleato de polioxietileno sorbitán	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	15,0
Esteres de grasas de glicerina	PGPR	Polirricinoleato de poliglicerol (1,2,3-propanotriol, homopolémero-12-hidroxi-9-octadecenoato)	H(C ₁₈ H ₃₂ O ₂) _n OH	1,5±0,5

3.1.4 Reactivos para la caracterización y cuantificación del principio activo utilizado en los encapsulados.

- **Extracto natural de Cacao** (*Theobroma cacao L.*) en polvo suministrado gentilmente por la facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.
- **Ácido gálico** (3,4,5-Trihidroxibenzóico ácido) 97,5–102,5% (Sigma Aldrich).

- **(+) Catequina hidratada** ≥ 96 % (Sigma Aldrich).
- **(-) Epicatequina** ≥ 90 % (Sigma Aldrich).
- **Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu**, 2 N (Sigma Aldrich).
- **Carbonato de sodio** (NaCO_3) ≥ 99 % (Sigma Aldrich).
- **Agua milliQ.**

3.1.5 Reactivos para la preparación de las gelatinas.

- **Gelatina neutra** en polvo (Kraft Foods Portugal).
- **Fructosa** tipo Diet Rádisson (Pagesa).
- **Colorantes vegetales** (Vahiné Food McCormick España S.A.).
- **Aroma natural de frambuesa** (Scrap Cooking Carambelle).
- **Frambuesa natural liofilizada** en polvo (Sosa Ingredients, S.L.).
- **Aceite de oliva** formato spray (Carbonell).
- **Tostadas ligeras**, Santiveri.
- **Agua mineral** (Font Vella).

3.1.6 Otros reactivos.

- **Triptona de soja agar**, Oxoid.
- **Sabouraud Dextrosa agar con Cloranfenicol**, Oxoid.

3.2 Equipos.

Los equipos utilizados se detallan a continuación:

- Balanza COBOS modelo AX 200, capacidad de 200 g y precisión de 0,1 mg.
- Ultra-Turrax modelo T25 Básico IKA WERKE.
- Homogenizador de Ultrasonido modelo HD2070 Sonoplus Bendelin, con sonda de titanio de 20 kHz de frecuencia y 21 W de poder.
- Minireactor compacto con agitación mecánica y calefacción modelo HME-R/100 ml, rango temperaturas entre 30-300 °C y velocidad de agitación entre 100-700 rpm, Trallero y Schlee.
- Varilla de agitación con palas en forma de áncora de vidrio con diámetro de 6 cm, Trallero y Schlee.
- Agitador modelo RCT Básico IKA de 0-2500 rpm.

- Baño termostático modelo Tectron 200, Selecta.
- Placa calefactora modelo ETS-DS IKA, 0-310 °C y 0-1500 rpm.
- Microscopio óptico modelo B600 OPTIKA, con Cámara digital adaptada modelo Moticam 2300 de 3.0 Mpixel, Software Motic Images Plus 2.0 ML.
- Agitador tipo vórtex modelo REAX top, HEIDOLPH.
- Microscopio electrónico de barrido (SEM), Hitachi TM-1000.
- Microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo Quanta 200, FEI Co.
- Mastersizer 2000 APA (Malvern Instruments, MA), analizador de partículas entre 0,02-2000 µm, unidad de dispersión de líquidos HYDRO 2000SM.
- Medidor de pH/Ion meter-ISE, Prolab 3000, Schott Instruments. Electrodo selectivo del ión Calcio modelo CA 60 ISE y electrodo de pH Blue line.
- Centrífuga con control electrónico modelo Mixtasel-BL, Selecta.
- Reómetro RS300, HAAKE dotado de un baño termostático modelo F6 y recipiente HAAKE modelo C25. Sensores placa-placa rugosa de titanio diámetros de 20 mm y 35 mm.
- Reómetro Modular MARS III, HAKKE. Baño termostático modelo F6 y recipiente HAAKE modelo C25. Sensores placa-placa rugosa diámetros 20 mm y 35 mm, placa-placa lisa diámetros 35 mm y 60 mm.
- Estufa de vacío serie VD WTB modelo VD-23, Binder.
- Horno J.P. modelo Prebatem, Selecta.
- Refractómetro manual ABBE, Labolan con baño termostático modelo ECO ET S/G series, Lauda.
- Turbiscan™ Clásico modelo MA2000 marca TURBISOFT.
- Espectrofotómetro modelo Perkin Elmer UV/VIS, Lambda 20.
- Liofilizador modelo LyoQuest-55, Telstar.
- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear modelo DMX-500 (500 MHz), Bruker.
- Calibrador digital Pie de rey, Topcraft GT-DC-02.
- Cromatógrafo de ultra resolución (UPLC) Acquity, sistema cromatográfico Waters Milford, MA. Columna C18 (50x1 mm diámetro interno) BEH y software Empower Pro 2.
- Cromatógrafo con módulo de separación tipo Waters 2695, Alliance con un detector de índice de refracción modelo Waters 2414. Columnas de hidrogel

(7,8x300 mm) de 2000 y 1000 Å conectadas en serie, para cromatografía de exclusión por tamaño.

- Calorímetro diferencial de barrido modelo 822e, Mettler Toledo.
- Difractómetro X'pert PRO MPD, objetivo CuK α con radiación de rayos X de 1,54 Å, 45 kV y 40 mA.

3.3 Técnicas de análisis y caracterización.

Este apartado describe las técnicas de análisis y caracterización utilizadas a través de los diferentes métodos de preparación empleados para la realización del presente trabajo.

3.3.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La resonancia magnética nuclear es un fenómeno físico basado en las propiedades mecánico-cuánticas de los núcleos atómicos. Para el tratamiento del espectro se empleó el programa MestreNova v.8.1.2 y, para la determinación de las fracciones molares el protocolo de cálculo descrito en el método ASTM International F 2259-03.

3.3.2 Cromatografía de exclusión por tamaño (CET).

La cromatografía de exclusión por tamaños, está basada en la utilización de fases estacionarias constituidas por un material, principalmente orgánico, muy poroso y teóricamente inerte que permite la discriminación de los solutos según su tamaño molecular. En el caso de los polímeros, se utiliza ampliamente debido a su capacidad para proporcionar buenos resultados respecto a la distribución de sus masas molares. La técnica consta de una fase estacionaria con pequeñas partículas poliméricas inertes, altamente entrecruzadas que contiene una red de poros de diferentes tamaños en los que pueden difundir las moléculas de soluto y disolvente, y una fase móvil conformada por un buen disolvente con el polímero a caracterizar.

3.3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Es una técnica termoanalítica en la que la diferencia de calor entre una muestra y una referencia es medida como una función de la temperatura. El principio

básico subyacente a esta técnica es que, cuando la muestra experimenta una transformación física, se necesitará que fluya más o menos calor a la muestra que a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. El comportamiento térmico (termograma) es de gran utilidad para predecir comportamientos esperados de un material, identificar compuestos, medir la estabilidad, entre otros.

3.3.4 Difracción de rayos X (DRX).

Al radiar un haz de rayos X enfocado a la muestra y con un ángulo específico de incidencia, estos difractan de diversas formas dependiendo de la estructura cristalina de la muestra obteniéndose un patrón de difracción. La técnica permite identificar una sustancia al comparar el patrón de difracción de la muestra con una base de datos de patrones conocidos, ya que cada patrón de difracción es único.

3.3.5 Refractometría.

La técnica consiste en medir el índice de refracción (IR) de un líquido, con objeto de determinar su composición si se trata de una disolución o de su pureza si es un compuesto único. El principio de medición se fundamenta en el cambio de dirección que sufre el haz de luz al pasar por un medio a otro de distinta densidad, este cambio de dirección se denomina *refracción*.

3.3.6 Espectrofotometría UV-VIS.

La técnica se basa en la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema en función de la longitud de onda de la radiación. De manera que, permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia. La espectrofotometría UV-VIS utiliza haces de radiación del espectro electromagnético, en el rango UV de 80 a 400 nm y para la luz visible de 400 a 700 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar los materiales en un amplio espectro.

3.3.7 Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC).

La técnica de cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC), es una avanzada técnica de cromatografía de líquidos, en el cual hay una estrecha columna con partículas muy pequeñas (1,7 μm) y fases móviles que operan a muy altas presiones.

3.3.8 Microscopía óptica.

La microscopía es el conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visible los objetos de estudio que por su tamaño están fuera del rango de resolución del ojo normal. La microscopía clásica, consiste en hacer pasar un haz de luz visible de una fuente a través de los lentes ópticos simples o múltiples para lograr una vista ampliada de la muestra. La imagen resultante puede ser detectada directamente por el ojo humano, impresa en una placa fotográfica o mostrada digitalmente.

3.3.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La microscopía electrónica de barrido, conocida por sus siglas en inglés, SEM, Scanning Electron Microscope. Se basa en el principio de la microscopía óptica en el que un haz de luz se sustituye por un haz de electrones. El equipo cuenta con un dispositivo que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con diferentes detectores que recogen los electrones generados de la interacción con la superficie para crear una imagen que refleja las características superficiales de la misma. La técnica se caracteriza por tener una elevada resolución que permite obtener imágenes con apariencia tridimensional. La muestra (salvo que ya sea conductora) se recubre generalmente por una capa muy fina de oro o carbón, lo que le otorga propiedades conductoras. La técnica de preparación de las muestras se denomina “sputtering” o pulverización catódica.

3.3.10 Técnica de dispersión múltiple de luz.

La estabilidad de las emulsiones, se determinó con un equipo denominado Turbiscan que combina técnicas de dispersión múltiple de luz y analizadores ópticos. El equipo está constituido por una celda de medida destinada a contener un tubo cilíndrico de vidrio borosilicado de fondo plano, una fuente luminosa ($\lambda=850\text{ nm}$) que

se desplaza verticalmente realizando un barrido de aproximadamente 65 mm de altura a lo largo del tubo con un sistema de detección óptica equipado con dos detectores sincronizados: un detector de luz transmitida situado en el eje de la fuente (0°) y un detector de retrodifusión (Back Scattering, BS) que mide la luz dispersada a un ángulo de 135° . La adquisición de datos se realiza a través de un barrido a una razón de 1 captación/ $40\mu\text{m}$ que permite obtener valores de transmisión y BS relativos. A partir de los datos de transmisión y BS en función del tiempo, se pueden describir los mecanismos de desestabilización de sistemas dispersos.

3.3.11 Difracción de luz láser.

Los equipos de difracción de luz láser se basan en principios ópticos para la medición del tamaño de partículas. Un haz de láseres (466 nm azul y 630 nm roja) atraviesa la zona de la muestra, en donde se colocan las partículas en suspensión, el haz es dispersado en un ángulo dependiente del tamaño de la partícula con la que interacciona. Cuando una partícula difracta la luz, la misma produce una intensidad característica a un ángulo de difracción que se relaciona con el diámetro de la partícula. El espectro de difracción láser de las partículas es asociado a una dada distribución de tamaños. El instrumento mide el diámetro equivalente de una partícula con un dado volumen, la distribución que se obtiene, es la cantidad en volumen de partículas de un dado tamaño, respecto al volumen total de partículas. La unidad de dispersión de líquidos, consiste en un agitador de hélice con el que se consigue un flujo constante de partículas a través de la celda por donde pasa el haz. El control de la dilución se realiza mediante el ajuste de la obscuración y el ajuste de nivel de turbidez. La turbidez se utiliza para controlar la concentración de partículas que atraviesa la celda de medida evitando así fenómenos de dispersión múltiple.

3.3.12 Análisis del perfil de textura (TPA).

El análisis del perfil de textura permite evaluar de forma objetiva las propiedades mecánicas de un producto, ofreciendo la obtención simultánea de varios parámetros. El TPA se realiza mediante un ciclo de doble compresión con un tiempo de espera entre el final de la primera compresión y el inicio de la segunda. Para el ensayo se utiliza un sensor que permita detectar la fuerza normal aplicada durante el recorrido de compresión, para ello el software es programado para mover

el sensor a una velocidad específica hasta alcanzar una fuerza de 0,01 N. En el software de un Texturómetro se establece la altura de la muestra y la velocidad de compresión requerida en función del porcentaje de deformación que se desea aplicar. Una vez que el sensor alcanza la fuerza programada se da inicio al ensayo, el registro proporcionado tras el ciclo de doble compresión se conoce como curva TPA, donde se representa la fuerza en función del tiempo.

3.3.13 Ensayo de Resistencia (ER).

Es una prueba en donde la muestra es comprimida por una sonda u otro tipo de dispositivo hasta alcanzar una fuerza máxima o límite de cedencia provocando una deformación tipo plástica o permanente. Para ello el software es programado para mover el sensor a una velocidad específica y constante hasta ocasionar el aplastamiento irreversible de la muestra, de esta forma se obtienen datos de fuerza en función de la distancia.

3.4 Métodos de preparación.

En este apartado se detallan los procedimientos experimentales utilizados para la realización de este trabajo.

3.4.1 Caracterización del alginato de sodio.

3.4.1.1 Determinación de la estructura química y peso molecular.

Los valores de composición química dados por la razón de sus monómeros constituyentes el ácido manurónico (*M*) y el ácido gulurónico (*G*), definida por la razón *M/G*, y su secuencia monomérica han sido convenientemente determinados por la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), para una muestra no hidrolizada de alginato de sodio preparada a partir de 20 mg de la sal de alginato en 1 ml de agua deuterada. La muestra se homogenizó en un vial aplicando sonicación y agitación vigorosa de manera alternada cada 30 min durante 4 horas, con la finalidad de garantizar una completa disolución. La muestra se colocó en un tubo de 5 mm especial para RMN y se analizó en un espectrómetro siguiendo el protocolo propuesto por **Santi et al. (2008)**.

Para la determinación del peso molecular promedio del alginato sódico, se empleó la técnica de cromatografía de exclusión por tamaño (CET) mediante el protocolo propuesto por **Sen (2011)** con algunas modificaciones. Para la construcción del calibrado universal, se utilizaron patrones de Dextrano entre 80900 y 1360000 Da. Se pesaron 2 mg de cada patrón por mililitro de agua milliQ en viales de 1,5 ml para HPLC, agitados vigorosamente en un Vortex hasta completa disolución. La muestra del polímero de concentración 2 mg/ml se preparó siguiendo el mismo procedimiento de homogenización (sonicación y agitación) utilizado para la preparación de la muestra analizada por RMN, esta se eluyó con una solución filtrada de NaNO₃ a 0,1 M con un flujo de 0,6 ml/min y temperatura constantes de 30 °C a través de las columnas de hidrogel de 2000 y 1000 Å conectadas en serie. Los patrones se analizaron uno a uno, iniciando con dextrano de menor a mayor peso molecular, y finalizando con la muestra problema de alginato sódico. Los datos obtenidos, se procesaron empleando el software Empower para determinar el peso molecular promedio del polímero en estudio.

3.4.1.2 *Determinación de otros compuestos.*

Para la identificación de otros compuestos presentes en el alginato sódico, se utilizaron las técnicas DSC, DRX y Refractometría.

3.4.1.2.a *Análisis por DSC.*

Se analizaron los diferentes lotes de alginato de sodio suministrados (Panreac) destinados para la preparación de los geles. Se pesaron muestras de entre 7,3 y 9,5 mg de alginato sódico y colocaron en crisoles de aluminio de 40 µl. Una vez colocada la muestra en el equipo, se realizó un barrido de temperatura desde 30° hasta 300 °C a una velocidad de 10 °C/min bajo un atmósfera inerte de N₂ a 50 ml/min y utilizando como blanco una muestra de Indio. También, se analizaron muestras de 3,6 mg de ácido algínico a objeto de identificar su posible presencia y 7,3 de alginato de sodio (Solé Graell) con el fin de comparar los termogramas obtenidos entre alginatos y los existentes en literatura.

3.4.1.2.b *Análisis por DRX.*

Se pesaron 0,1 mg de alginato de sodio (Panreac) y ácido algínico. Las muestras se colocaron directamente en un difractor tipo XPERT-PRO con un objetivo CuK_α con radiación de rayos X de 1,54 Å, 45 kV y 40 mA. Los espectros obtenidos se compararon con la finalidad de identificar la presencia del ácido algínico en la muestra de alginato sódico. Asimismo, se comparó el espectro de la muestra problema con una base de datos de patrones conocidos a fin de identificar la presencia de otros compuestos.

3.4.2.1.c *Análisis por Refractometría.*

Se preparó una curva de calibrado a partir de una solución acuosa de alginato sódico 2% p/p como patrón de referencia (Solé Graells) con un contenido de azúcar comercial que varió desde 0% hasta 16% p/p. El alginato de sodio (muestra problema/Panreac) empleado para la preparación de los geles, se analizó preparando igualmente una solución acuosa con 2% p/p del polímero. Se consideró el índice de refracción, IR, del alginato sódico (IR=1,3355) de Solé Graell como patrón de referencia para la construcción del calibrado.

3.4.2 Preparación de los geles de alginato.

3.4.2.1 *Geles preparados por el mecanismo de gelificación externa.*

Para caracterizar los geles de alginato preparados a partir del mecanismo de gelificación externa (GE), se realizaron una serie de experimentos para observar la influencia de la concentración de calcio sobre las propiedades reológicas de los geles. Inicialmente, se preparó una solución acuosa de alginato sódico 2% p/p debidamente homogenizada con un Ultra-turrax, almacenada durante 24 horas para eliminar las burbujas de aire y garantizar su completa hidratación. A continuación, se prepararon geles a partir de 4 g de solución de alginato sódico 2% p/p y 1 g de solución acuosa de CaCl_2 con concentraciones de 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,5; 0,65; 0,75; 0,9; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5; 10 y 15% p/p de calcio. Las muestras, se colocaron en viales de boca ancha a 25 °C y dejaron 24 horas en reacción para garantizar una gelificación completa. Los geles formados, se cortaron a 2 mm de la superficie y analizaron en el reómetro aplicando ensayos oscilatorios para todas las concentraciones, el aspecto de los geles obtenidos se muestran en la Figura 3.1.

Para realizar el análisis comparativo de la influencia de la concentración de calcio sobre las propiedades reológicas de los geles preparados por el mecanismo de GE y de los geles preparados por el mecanismo de gelificación interna (GI), se expresa la concentración de calcio como una relación de los moles de Ca^{+2}/g alginato para efectos del análisis y comparación de sus características viscoelásticas.



Figura 3.1 Aspecto de los geles de alginato cálcico preparados por GE con diferentes concentraciones de calcio a partir de soluciones acuosas de CaCl_2 a 25 °C.

3.4.2.1.a *Determinación mínima de calcio e influencia del pH.*

Para determinar la cantidad mínima de calcio se prepararon geles por GE para diferentes concentraciones de calcio a partir de 4 g de solución de alginato sódico 2% p/p y 1 g de solución acuosa de CaCl_2 con concentraciones de 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,5; 0,65; 0,75; 0,9; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5; 10 y 15% p/p de calcio en un vial de boca ancha a 25 °C, tras 24 horas de reacción se realizaron los ensayos oscilatorios a cada uno de los geles para todo el rango de concentración de calcio. Estos geles se cortaron a 2 mm desde la superficie (espesor) para todos los ensayos. Una vez conocida la cantidad mínima de calcio, se seleccionó un valor superior a la cantidad mínima requerida a fin de asegurar la completa formación del gel. A continuación, se realizaron una serie de experimentos para observar la influencia del pH sobre las propiedades reológicas de los geles. Se partió de 4 g de solución de alginato al 2% p/p y 1 g de solución acuosa de CaCl_2 , a estas soluciones de CaCl_2 se ajustó el pH entre valores de 0,5 y 13 por medio de la adición de HCl o NaOH. Cada muestra con pH diferente adicionada a la solución de alginato, se

homogenizó y dejó reaccionar durante 24 horas en viales de boca ancha en un baño a 25 °C.

3.4.2.2 *Geles preparados por el mecanismo de gelificación interna.*

Para caracterizar los geles de alginato preparados a partir del mecanismo de gelificación interna (GI), se realizaron una serie de experimentos para observar la influencia de la fuente de calcio y su concentración en las propiedades reológicas de los geles. Se preparó una solución acuosa de alginato sódico 2% p/p siguiendo el mismo procedimiento de homogenización, hidratación y eliminación del aire durante 24 horas. Por otra parte, se prepararon soluciones acuosas con las sales de carbonato e hidróxido de calcio a concentraciones de 0,05; 0,15; 0,25 y 0,5 M, y con citrato cálcico a concentraciones de 0,02; 0,05; 0,08 y 0,17 M. Para formar los geles, se partió de una mezcla compuesta por 20 ml de solución acuosa de alginato 2% p/p y 1 ml de solución de la sal cálcica (carbonato, hidróxido o citrato) para cada muestra según el tipo de sal y concentración. La mezcla alginato/sal se colocó cuidadosamente en el interior de una jeringa plástica con capacidad de 60 ml a fin de moldear el gel a una forma cilíndrica. A continuación, se adicionó sobre la fase acuosa 50 ml de aceite de girasol con 80 μ l de ácido acético glacial previamente disuelto. En la Figura 3.2 se observa el aspecto de las muestras en el interior de la jeringa y de los geles una vez formados. Las muestras se taparon con film plástico y dejaron en reacción durante 24 horas en un baño a 25 °C. Los geles cilíndricos se cortaron a 2 mm de distancia de la interfase (alginato/aceite) con un espesor de 2 mm para ser analizados en el reómetro.

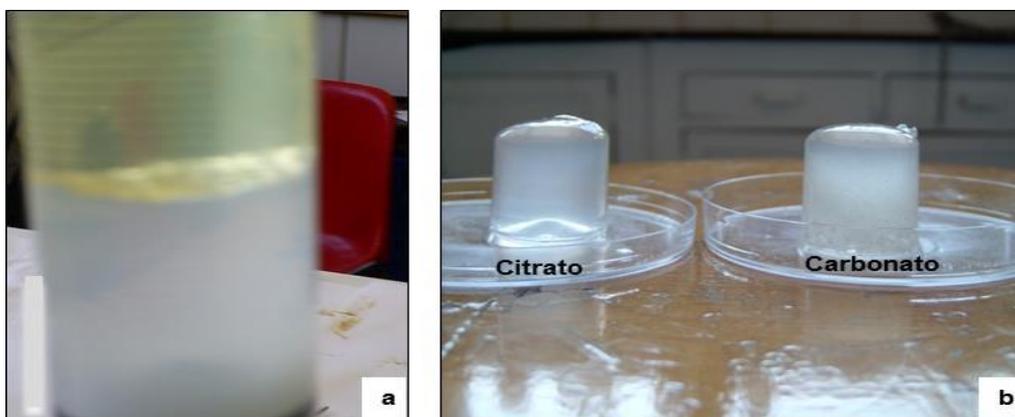


Figura 3.2 Muestras preparadas por gelificación interna. Formación y moldeo del gel en jeringas plásticas, a; Geles a partir de citrato cálcico 0,05 M y Geles a partir de carbonato cálcico 0,05 M, b.

3.4.2.2.a *Geles preparados con citrato de calcio.*

Se prepararon geles con citrato cálcico utilizando el mecanismo de GI a partir de 20 ml de solución de alginato sódico 2% p/p y 1 ml de solución de citrato cálcico con diferentes concentraciones (0,02; 0,05; 0,08 y 0,17 M), la mezcla alginato/sal se colocó en la jeringa y sobre ésta la fase oleosa compuesta por 50 ml de aceite vegetal y 80 μ l de acético, tal como explica el apartado anterior. Los geles enteros de forma cilíndrica se cortaron a 2 mm de distancia desde la interfase (alginato/aceite) y sucesivamente hasta los 20 mm manteniendo un espesor de 2 mm. Los geles se analizaron a fin de determinar la influencia de la concentración de calcio con la distancia desde la interfase en las propiedades reológicas de los mismos. En la Figura 3.3, se muestra el aspecto de los geles obtenidos.

Por otra parte, se realizaron experimentos para observar la influencia de la concentración del ácido acético en las características reológicas de los geles preparados con diferentes concentraciones de calcio. Para la preparación de las muestras, se partió de 4 g de solución de alginato 2% p/p, 1 g de la solución acuosa de citrato cálcico con diferentes concentraciones (0,02; 0,05; 0,08 y 0,17 M) y 1 g de solución acuosa de ácido acético a $4,02 \cdot 10^{-3}$ M; $9,42 \cdot 10^{-5}$ M y $6,36 \cdot 10^{-6}$ M en viales de boca ancha a 25 °C. Éstas se agitaron moderadamente hasta homogenizar y dejaron 24 horas en reposo para garantizar una completa reacción, los geles obtenidos se cortaron a 2 mm de la superficie y analizaron utilizando el reómetro.

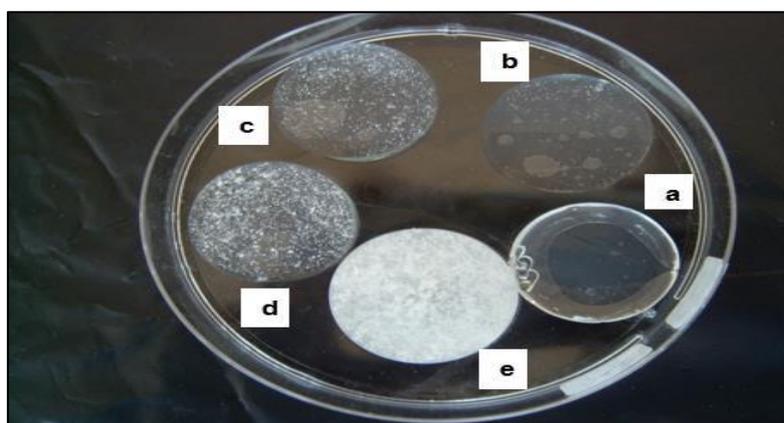


Figura 3.3 Geles de alginato cálcico preparados por GI en jeringas a partir de diferentes concentraciones de citrato cálcico. Soluciones acuosas de citrato cálcico: 0,02 M, a; 0,05 M, b; 0,08 M, c; 0,17 M, d y e. Muestras cortadas a 2 mm desde la interfase (alginato/aceite).

3.4.2.2.b *Liberación del calcio total.*

Se realizaron experimentos para observar el tiempo de liberación de los iones calcio a partir de una solución acuosa de citrato cálcico de 0,05 M. Todas las muestras se prepararon con 10 ml de solución de citrato y 80 μ l de ácido acético, se agitaron vigorosamente y dejaron reaccionar con diferentes tiempos en un vial. Las mediciones de la concentración del ion calcio, se realizaron cada 2 min hasta completar 30 min, las muestras se filtraron y analizaron por medio de un electrodo selectivo de calcio. Se consideró inicialmente, el calcio libre presente en la solución de citrato, es decir, sin la adición del agente acidificante de liberación como referencia a tiempo cero.

3.4.2.3 Caracterización de los geles de alginato por ensayos reológicos.

Los geles formados tanto por GI para las diferentes sales de calcio utilizadas y concentraciones, como los geles obtenidos por GE, se caracterizaron aplicando ensayos oscilatorios en un Reómetro RS300 HAAKE con un sensor de diámetro 20 mm y placa de diámetro 35 mm rugosos para evitar deslizamiento de la muestra, con un espacio entre sensor-placa de 1 mm y una temperatura de 25 °C controlado por un baño termostático. En primer lugar, se determinó el esfuerzo al que se debe trabajar dentro de un rango de viscoelasticidad lineal, en el cual no hay destrucción de estructura y en donde la respuesta viscoelástica no depende del esfuerzo aplicado porque el esfuerzo y la deformación obtenida son proporcionales. Para ello, antes de cada experimento se realizaron ensayos preliminares de barridos oscilatorios a una frecuencia intermedia de trabajo, 1 Hz, y esfuerzos crecientes para determinar el rango donde la respuesta no dependa del esfuerzo. De este modo, se pudo conocer el intervalo de esfuerzo correspondiente a la zona lineal para dicha frecuencia, en el cual G^* permanecía constante, como una línea horizontal, independiente del esfuerzo aplicado. Seguidamente, se realizaron los ensayos de barrido de frecuencia y, con un intervalo de frecuencia fijado entre 0,01 y 10 Hz, se eligió un esfuerzo en este caso de 20 Pa, que a su vez aseguraba la permanencia en el rango lineal para ambos extremos de frecuencia.

3.4.3 Preparación de las microesferas de alginato en emulsión.

3.4.3.1 *Formación de microesferas en emulsión con diferentes sales de calcio.*

Se prepararon microesferas de alginato utilizando el método en emulsión por GI propuesto por **Poncelet (2001)**, con algunas modificaciones. Se partió de 20 ml de solución de alginato sódico 2% p/p homogenizada, hidratada y sin burbujas de aire, a la cual adicionó 1 ml de una solución acuosa con sal cálcica de carbonato (CaCO_3) o citrato ($\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) de concentraciones 0,05 M o 0,15 M. La mezcla alginato/sal cálcica (fase dispersa) se dispersó en 40 ml de aceite vegetal con disolución previa de 5% p/p de tensioactivo Span 80 (S80) respecto al aceite directamente en un minireactor de 100 ml a 25 °C y 250 rpm. Para favorecer la formación de la emulsión agua en aceite (W/O), la fase dispersa se suministró gota a gota de forma controlada con una jeringa bajo agitación constante, una vez adicionada toda la fase acuosa se mantuvo la agitación durante 15 min. A continuación, se indujo la gelificación de las gotas de alginato sódico en emulsión con la adición controlada de una mezcla compuesta por 10 ml de aceite vegetal y 80 μl de ácido acético glacial previamente disuelto. Las microesferas formadas después de 15 min de reacción, se separaron de la fase oleosa con la adición de 100 ml de solución acuosa de CaCl_2 de concentración 0,05 M con un contenido de 10% p/p de Tween 20 (T20) bajo agitación moderada durante 15 minutos, con el fin de romper la emulsión y favorecer la partición completa de las microesferas hacia la fase acuosa. Finalmente, el aceite se descartó, las microesferas se filtraron por gravedad en un tamiz de 0,45 micras y lavaron gentilmente con la solución $\text{CaCl}_2/\text{T20}$. La Figura 3.4, muestra el aspecto de las microesferas obtenidas con las sales de calcio empleadas al ser observadas al microscopio óptico.

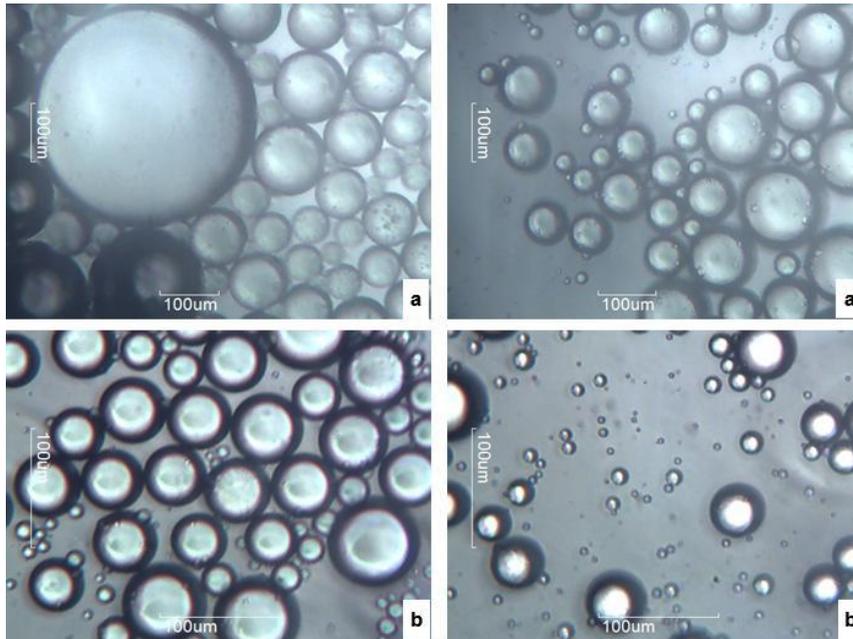


Figura 3.4 Microesferas preparadas en emulsión por GI con distintas sales de calcio. Microesferas preparadas con CaCO_3 (10X), a; Microesferas preparadas con citrato cálcico (20X), b. Soluciones cálcicas de concentración 0,05 M. Observaciones por microscopía óptica con objetivos 10X y 20X.

Para determinar la influencia de la concentración de calcio y las diferentes sales de calcio utilizadas en la preparación de las microsferas de alginato sobre el tamaño y morfología de éstas, una parte de las microsferas obtenidas se dispersaron en agua para ser observadas por microscopía óptica. Para cada muestra, se realizaron suficientes fotografías a fin de estimar la distribución de tamaño mediante la medición de 300 diámetros de microsferas por muestra. Otras microsferas, se secaron en una estufa de vacío a 40 °C, 300 mbar durante 40 min y analizaron directamente por SEM en un Hitachi TM - 1000 con un voltaje de aceleración de 15 kV para observar su morfología.

3.4.3.2 Estabilidad de las emulsiones.

3.4.3.2.a Determinación de la estabilidad de las emulsiones para diferentes tensioactivos y concentraciones.

Las emulsiones W/O, se prepararon para 10 g de emulsión total constituida por 1 ml de solución de la sal cálcica, seleccionada según los resultados obtenidos en el estudio de preparación de las microsferas en emulsión por GI con las diferentes sales de calcio, en 20% p/p de solución acuosa de alginato sódico 2% p/p. En este sentido, se mantuvo una relación de fase dispersa y fase continua de 20:80 para todas las emulsiones estudiadas. Por pesada se colocó en un tubo el aceite

vegetal y gota a gota la cantidad correspondiente del tensioactivo para cada concentración estudiada (2, 5 y 10% p/p) aplicando agitación constante con un Vórtex a 25 °C. A continuación, una vez pesada la cantidad concreta de solución de alginato y adicionada la solución de sal cálcica, la mezcla homogenizada se añadió gota a gota en la fase oleosa agitando entre cada adición. Se emplearon para el estudio de estabilidad, los tensioactivos S80, Span 85 (S85), Polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) y una mezcla de S80 y Tween 80 (S80=51 y T80=49). El Vórtex se utilizó a una velocidad media para todas las emulsiones preparadas, a fin de evitar la formación de espumas. Una vez formada la emulsión, se pasó cuidadosamente a un tubo apto para el análisis de dispersión de luz y colocó en el Turbiscan. Las mediciones se realizaron de forma continua durante 14 min a una temperatura de 25 °C, no se consideraron tiempos mayores ya que una vez formada la emulsión esta es utilizada inmediatamente para la obtención de microesferas de alginato por gelificación de las gotas a través de una reacción química en el proceso de emulsificación por GI. A partir de los perfiles obtenidos, se consideró seleccionar dos zonas diferentes a lo largo del tubo con el fin de comparar la estabilidad de las emulsiones W/O mediante la adopción de los valores medios de Back Scattering (BS) teniendo en cuenta puntos específicos del análisis a los 20-25 mm y 50-55 mm de longitud del tubo siguiendo el protocolo propuesto por **Márquez et al, 2010**. Para determinar la cinética de desestabilización de las emulsiones, se representó el porcentaje de coalescencia (%C) usando la siguiente ecuación:

$$\%C = \left[\frac{(BS_{in} - BS_f)}{BS_{in}} \right] \times 100 \quad (31)$$

Donde el BS_{in} es el valor inicial a tiempo cero, y BS_f es el valor final obtenido pasado el tiempo de estudio. Las mediciones se realizaron por duplicado a fin de expresar los valores medios \pm la desviación estándar (DE).

3.4.3.2.b *Distribución de tamaño de las microesferas y su correlación con el tamaño de gota de las emulsiones.*

Siguiendo el protocolo descrito en la preparación de las emulsiones para el estudio de estabilidad (apartado 3.4.3.2.a), se realizaron otros experimentos utilizando los mismos tensioactivos S80, S85, S80-T80 y PGPR para la preparación de las emulsiones pero esta vez para la formación de las microesferas. Para ello, se

utilizó solamente la concentración intermedia de tensioactivo (5% p/p) y la sal de calcio seleccionada a fin de observar la influencia del tipo tensioactivo en la distribución de tamaño de las microesferas. Para inducir la gelificación de las gotas de la fase dispersa en la emulsión, se adicionó el ácido acético a la fase oleosa.

Por otra parte, una vez identificado y seleccionado el tensioactivo que proporciona el tamaño de microesferas más adecuado según los objetivos planteados en este estudio, se realizaron una serie de nuevos experimentos aplicando el mismo protocolo de preparación de las microesferas pero utilizando específicamente el tensioactivo y la fuente de calcio seleccionada con la finalidad de determinar la existencia de alguna correlación entre la distribución del tamaño gota de la emulsión y las microesferas obtenidas con el sistema seleccionado. Para ello, primeramente, se realizó el procedimiento de preparación de la emulsión (sin la adición del ácido acético en la fase oleosa) a fin de estudiar el tamaño de gota de la fase dispersa en emulsión. A continuación, se realizó nuevamente el ensayo de preparación de la emulsión pero adicionando el acético a la fase oleosa para así inducir la gelificación de las gotas y poder analizar la distribución de tamaño de las microesferas obtenidas por microscopía óptica. Para este estudio de correlación entre el tamaño de gota y las microesferas se establecieron dos concentraciones diferentes del tensioactivo seleccionado (2% y 5% p/p).

3.4.3.3 Preparación de microesferas en emulsión con el principio activo a encapsular: diseño experimental completo.

Se realizó un diseño experimental compuesto 2^3 para observar la influencia de las variables de composición y otro diseño experimental compuesto 2^2 para determinar la influencia de las variables de preparación en el tamaño y polidispersidad de las microesferas, así como el porcentaje de retención del compuesto activo encapsulado en las microesferas luego de ser separadas de la emulsión. Para ello, se establecieron como factores las siguientes variables:

- **Variabes de composición:** concentración de tensioactivo (4-15% p/p) respecto al aceite, cantidad de fase dispersa (15-40% p/p) utilizada en la emulsión y concentración de CaCl_2 (0,03-0,1M) en la solución acuosa con 10% p/p de T20 para el lavado y separación de las microesferas obtenidas en emulsión ($\text{CaCl}_2/\text{T20}$).

- **Variables de preparación:** velocidad de agitación (250-600 rpm) y velocidad de centrifugación (2000-3800 rpm) para la separación de las microesferas.

Se partió de una fase dispersa constituida por solución de alginato sódico al 2% p/p con 1% p/p de extracto de cacao, esta se preparó mediante homogenización a 10000 rpm con posterior sonicación durante 20 min. La solución alginato/cacao se almacenó durante 24 horas bajo refrigeración y protección de la luz para asegurar su completa hidratación y desaireación. El procedimiento estándar para todas las variables de composición se estableció a 25 °C, velocidad de agitación de 250 rpm y centrifugación 4000 rpm durante 10 min para la separación de las microesferas. A partir de una fase dispersa constituida por solución alginato/cacao (27,5% p/p) se adicionó la cantidad correspondiente de citrato cálcico a 0,05 M (6,2% p/p respecto a la fase dispersa), una vez homogenizada durante 5 min se dispersó gota a gota con una jeringa en 40 ml de aceite vegetal con 9,5% p/p del tensioactivo seleccionado respecto al aceite previamente disuelto (fase oleosa). La emulsión W/O se preparó bajo agitación constante durante 15 min en un minireactor. La gelificación de las gotas se inició al adicionar los 10 ml restantes de aceite vegetal junto con 80 µl de ácido acético disueltos en el mismo, agitando durante 15 min más. Las microesferas pregelificadas se separaron de la fase oleosa adicionando 100 ml de solución acuosa a 0,07 M CaCl₂/T20 bajo agitación moderada durante 15 min con la finalidad de continuar el proceso de gelificación, mejorar la retención del principio activo y favorecer la separación de las fases. Las microesferas se separaron por centrifugación, descartando la fase oleosa y reservando la fase acuosa para la cuantificación de los polifenoles presentes en la solución de separación. Las microesferas alginato/cacao se redispersaron en agua para su análisis de distribución de tamaño por difracción laser. Del mismo modo, se aplicó el procedimiento descrito anteriormente (condiciones del punto central del diseño) para la preparación de las microesferas pero considerando las condiciones de composición de cada uno de los ensayos que conforman el diseño experimental compuesto 2³.

Por otra parte, se realizó el estudio de la influencia de las variables de preparación a través de un diseño experimental compuesto 2², para ello se tomaron las condiciones de composición del punto central del diseño experimental 2³ descrito anteriormente. La preparación de la emulsión W/O se realizó siguiendo el protocolo

anterior pero utilizando los parámetros planteados para las variables de preparación (velocidad de agitación y centrifugación) en el diseño 2^2 para cada uno de sus ensayos constituyentes. La Figura 3.5, muestra la separación de las fases y las microesferas obtenidas con el cacao encapsulado luego del proceso de centrifugación.

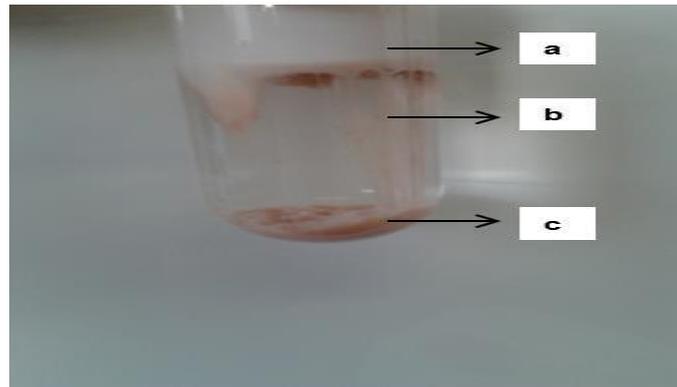


Figura 3.5. Separación de las microesferas de alginato/cacao de la emulsión por centrifugación. Fase oleosa, a; Fase acuosa, b y Microesferas de alginato/cacao, c.

3.4.3.3.a Caracterización del extracto de cacao como principio activo a encapsular.

✓ *Análisis de los polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteau.*

Se utilizó como principio activo de encapsulación extracto natural de Cacao (*Theobroma cacao L.*) suministrado gentilmente por la facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Para la cuantificar los polifenoles totales se utilizó el protocolo propuesto por **Erkan et al., (2008)** que emplea el método de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como compuesto fenólico de referencia. En primer lugar, se realizó una recta de calibrado a partir del patrón de referencia. A continuación, se preparó una solución madre a partir de 250 mg del extracto en 50 ml de agua miliQ, la muestra se protegió de la luz y sonicó durante 4 horas. Seguidamente, se realizó una dilución 1:5, de esta se tomó una alícuota de 250 μ l y adicionó un 12% v/v de solución de NaCO_3 de concentración 20% p/p, luego agregó un 4% v/v del indicador Folin a 2 N y completó con agua miliQ hasta 10 ml, se agitó vigorosamente y dejó reaccionar durante 1 hora debidamente protegidas de la luz en recipientes de vidrio de color ámbar. En análisis de absorbancia de las muestras se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin a una longitud de onda de 765 nm.

✓ *Cuantificación de los polifenoles por UPLC.*

Se caracterizó el extracto de cacao con la cuantificación de algunos de sus polifenoles principales, tales como la (+) catequina y (-) epicatequina mediante un Cromatógrafo para líquidos de ultra resolución (UPLC) Acquity siguiendo el protocolo descrito por **Serra-Cayuela, et al. 2013**. En primer lugar, se realizaron los calibrados con patrones de (+) catequina y (-) epicatequina. A continuación, se preparó una solución madre con 250 mg de extracto en 50 ml de una solución etanol-agua (50:50), la cual se sonicó y seguidamente diluyó 1:5. Se empleó una fase móvil con solución de acetonitrilo/agua/ácido fórmico (2:97:1) y otra con una solución agua/ácido fórmico/acetonitrilo (80:19:1). Todas las muestras se filtraron antes de su inyección utilizando un filtro de 0,22 µm, luego se inyectó 5 µl de la muestra. Los datos fueron adquiridos con el software Empower Pro 2. Los cromatogramas se monitorizaron a 284 nm.

3.4.3.3.b *Análisis de tamaño de las microesferas por difracción laser.*

Para la medición del tamaño y polidispersidad de las microesferas de alginato con el principio activo se utilizó un Mastersizer 2000 equipado con una unidad de dispersión Hydro 2000SM. Las muestras fueron colocadas en agua destilada y dispersadas a una velocidad de 1500 rpm mediante la unidad de líquidos. Las mediciones se realizaron considerando un IR para el alginato de 1,336 y para el agua de 1,333. El software del equipo genera el diámetro medio del volumen equivalente (D[4,3]) en µm, así como una representación de la distribución de porcentajes volumen frente a los diámetros de las microesferas. Asimismo, el software reporta otra variable respuesta denominada SPAN, factor de polidispersidad o amplitud de la distribución de tamaño referido a la variabilidad del tamaño de las partículas presentes en la muestra. Esta variable puede ser expresada matemáticamente como la diferencia de los diámetros medio de volúmenes acumulados para el 90% y 10% de las partículas en la muestra, en relación al diámetro medio de volumen acumulado para el 50% de las partículas de la muestra $[(D_{90}-D_{10}) / D_{50}]$. Los cuales corresponde al diámetro medio de volúmenes acumulados a un 10%, 50% y 90% respectivamente.

3.4.3.3.c *Determinación del contenido de polifenoles totales en las microesferas.*

El contenido total de polifenoles retenidos en las microesferas de alginato fue analizado por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu explicado en el apartado 3.4.3.3.a con algunas modificaciones. Para determinar la cantidad de fenoles totales iniciales en la fase dispersa (alginato/cacao) se tomó 1 ml (diluido 1:1000), a éste se adicionó la cantidad correspondiente a un 12% v/v de solución NaCO₃ de concentración 20% p/p, un 4% v/v de Folin a 1 N (diluido 1:1 respecto a su condición estándar) y el resto en agua miliQ hasta completar 10 ml, se agitó vigorosamente y dejó en reposo durante 2 horas a temperatura ambiente. Siguiendo el mismo procedimiento de preparación, se tomó una alícuota de 1 ml (diluido 1:100) de la solución acuosa de separación (sobrenadante) reservada y analizó el contenido de polifenoles presentes. Pasado el tiempo de reacción se midió la absorbancia a 765 nm para cada muestra. Este protocolo se aplicó para cada uno de los ensayos del diseño experimental completo referidos al diseño 2³ (variables de composición) y al diseño 2² (variables de preparación). A fin de determinar la eficiencia de encapsulación de los polifenoles totales retenidos por las microesferas, se expresó el porcentaje de retención de polifenoles como la diferencia de concentración de los polifenoles iniciales presentes en la fase dispersa (alginato/cacao) respecto a los polifenoles presentes en el sobrenadante, según la siguiente expresión matemática:

$$\%Retención = \left[\frac{(C_i - C_f)}{C_i} \right] \times 100 \quad (32)$$

Donde C_i es la concentración inicial en mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g extracto seco de cacao presente en la fase dispersa y C_f es la concentración final en mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g extracto seco de cacao presente en el sobrenadante. Las mediciones se realizaron al menos por duplicado para expresarlo como el valor medio \pm DE.

Por otra parte, se prepararon blancos para cada ensayo con la finalidad de eliminar cualquier interferencia durante las mediciones de absorbancia, considerando tanto la presencia del T20 en la solución de separación utilizada como de posibles restos de pequeñas gotas de emulsión. Para ello, cada ensayo se realizó nuevamente sin la incorporación del extracto de cacao en la fase dispersa. Todas las muestras fueron debidamente filtradas.

3.4.3.3.d *Análisis de la viscosidad de la fase dispersa.*

Se preparó la fase dispersa a partir de la solución de alginato sódico al 2% p/p con 1% p/p de extracto de cacao y adicionó la solución de citrato cálcico a 0,05 M (6,2% p/p respecto a la fase dispersa), homogenizó y realizaron una serie de análisis de viscosidad estacionaria en función del gradiente y a dos tiempos a partir de la preparación de esta fase. Para ello, se utilizó un Reómetro Modular Mars III con sensor y placa rugosa de diámetro 35 mm a temperatura controlada de 25 °C. Se preparó y observó el comportamiento de la fase dispersa utilizada en el diseño experimental completo según las condiciones dadas para el punto central del diseño 2^3 (apartado 3.4.3.3). A continuación, se realizó nuevamente el mismo estudio para la fase dispersa a pH neutro (fase dispersa neutralizada con NaOH 6 M entre 6,5 y 6,8 de pH).

3.4.3.4 *Preparación de microesferas en emulsión con el principio activo y fase dispersa a pH neutro: diseño fraccionado.*

Se realizó un diseño fraccionado 2^{3-1} factorial utilizando como fase dispersa la solución de alginato 2%/cacao 1% p/p a pH neutro, la preparación de las microesferas de alginato con el extracto de cacao a encapsular se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito para el diseño experimental completo (apartado 3.4.3.3) referido al diseño 2^3 para las variables de composición: concentración de tensioactivo (4-15% p/p), cantidad de fase dispersa (15-40% p/p) y concentración de CaCl_2 (0,03-0,1 M) en la solución acuosa de lavado con 10% p/p T20 para la separación de las microesferas obtenidas. Para ello, se estableció una velocidad de agitación de 250 rpm a 25 °C y una velocidad de centrifugación 4000 rpm durante 10 min para la separación de las microesferas. A fin de observar el efecto de la fase dispersa con extracto de cacao neutralizada sobre la distribución de tamaño y polidispersidad de las microesferas, así como en el porcentaje de retención de los polifenoles (%Ret).

3.4.3.5 *Preparación de las microesferas con un principio activo puro a encapsular: diseño fraccionado.*

Se estableció un diseño fraccionado 2^{3-1} factorial utilizando como compuesto activo fenólico puro la (+) catequina. Para la preparación de las microesferas con

catequina se partió de una fase dispersa compuesta por una solución de catequina 1000 ppm con 2% p/p de alginato sódico, ésta se homogenizó, sonicó durante 10 min y controló el pH, finalmente se dejó hidratar y desairear durante 24 horas. Se plantearon como factores de entrada la cantidad de fase dispersa (15-40% p/p), concentración del tensioactivo (4-15% p/p) respecto al aceite y velocidad de agitación (250-600 rpm), y como variables de salida la distribución de tamaño o diámetro medio del volumen ($D[4,3]$) de las microesferas, la polidispersidad o factor SPAN y el %Ret del compuesto puro en las microesferas. El procedimiento estándar de preparación de las microesferas (condiciones del punto central diseño 2^{3-1}) se realizó a partir de la fase dispersa constituida por la solución alginato/catequina (27,5% p/p) y citrato cálcico a 0,05 M (6,2% p/p respecto a la fase dispersa), una vez homogenizada durante 5 min se dispersó gota a gota con una jeringa en 40 ml de aceite vegetal con 9,5% p/p del tensioactivo seleccionado y utilizado en el diseño experimental completo previamente disuelto (fase oleosa). La emulsión W/O se preparó bajo agitación constante a 425 rpm durante 15 min en un minireactor a 25 °C. La gelificación de las gotas se inició al adicionar los 10 ml restantes de aceite vegetal junto con 80 µl de ácido acético disueltos en el mismo, agitando durante 15 min más. Las microesferas pregelificadas se separaron de la fase oleosa adicionando 100 ml de solución acuosa a 0,07 M CaCl_2 con 10% p/p de T20 bajo agitación moderada durante 15 min para completar la formación del gel y favorecer la partición de las fases, la mezcla microesferas/emulsión se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min, posteriormente la fase oleosa se descartó y la fase acuosa fue reservada para la cuantificación de la catequina presente en la solución de separación y, finalmente las microesferas se redispersaron en agua para la medición de sus tamaños por difracción laser. Este protocolo se realizó para todos los ensayos del diseño, utilizando siempre la misma concentración $\text{CaCl}_2/\text{T20}$ para la solución acuosa de lavado y las mismas condiciones de centrifugación para la separación de las microesferas.

Los diferentes diseños experimentales estudiados y sus resultados se procesaron con el Statgraphics Plus (versión 5.1 Estadísticos Gráficos Corporation, Rockville, EE.UU., 2000). Todos los datos se analizaron empleando un ANOVA, donde se consideraron significativas las respuestas con $p < 0,05$. Las medidas se realizaron por duplicado y expresaron como valores medios \pm DE.

3.4.3.6 *Análisis térmico de las microesferas de alginato con el principio activo encapsulado.*

A fin de estudiar el comportamiento térmico de las microesferas obtenidas en emulsión por GI se realizó un análisis térmico mediante DSC. Para ello, se tomaron muestras de microesferas de alginato con y sin el extracto de cacao preparadas en emulsión siguiendo el protocolo descrito anteriormente y específicamente para las condiciones del punto central en el diseño fraccionado a pH neutro con extracto de cacao (apartado 3.4.3.4). Una vez preparadas las microesferas con y sin el extracto de cacao, éstas se separaron y congelaron en un baño con nieve carbónica y acetona para posteriormente ser liofilizadas. Se utilizó un liofilizador marca LyoQuest a una temperatura de -51 °C y 0,1 mbar durante 18 horas. Las microesferas liofilizadas se analizaron por DSC, para ello se pesaron muestras entre 3,8 y 4,4 mg las cuales se colocaron en crisoles de aluminio con una capacidad de 40 µl. Una vez la muestra en el equipo, se realizó el análisis térmico aplicando un barrido de calentamiento desde 30° hasta 300 °C con una velocidad de 10 °C/min bajo una atmósfera inerte de N₂ a 50 ml/min.

3.4.4 Preparación de las esferas por extrusión.

3.4.4.1 *Esferas preparadas por el mecanismo de gelificación externa.*

Se prepararon esferas de alginato de calcio por extrusión a través del mecanismo de GE, a fin de observar su morfología, tamaño y textura. Se realizaron una serie de experimentos utilizando soluciones de alginato 2%/cacao 1% o 3% p/p. Las soluciones acuosas de alginato sódico al 2% p/p y extracto de cacao 1% p/p, y las soluciones con alginato 2% p/p y extracto de cacao 3% p/p, se homogenizaron, sonicaron, desairearon y almacenaron. A continuación, se ajustó el pH entre 6,7 y 6,9 adicionando unas gotas de solución 6 M de NaOH. Para ello, se partió de 20 ml de solución de alginato 2%/cacao 1% p/p o 20 ml de solución de alginato 2%/cacao 3% p/p, la cual se goteó con una jeringa sin aguja (50 ml BD Plastipak-2 mm de tubo de diámetro interno) durante 5 min por control manual en 80 ml de un baño gelificante compuesto por solución acuosa de CaCl₂ a diferentes concentraciones (0,002 M o 0,005 M CaCl₂ respectivamente). Las esferas formadas se mantuvieron en el baño de calcio durante 15 min bajo agitación moderada para garantizar su completa gelificación. A continuación, se filtraron a través de un colador tipo cuchara

de acero inoxidable para esferificaciones y lavaron con agua. Algunas esferas se reservaron a fin de analizar sus propiedades mecánicas, otras esferas para medir su diámetro medio número-longitud y otras más para observar su morfología. En la Figura 3.6, se muestra el aspecto de las esferas preparadas por GE.



Figura 3.6 Esferas de alginato/cacao preparadas por extrusión y gelificación externa.

3.4.4.2 *Esferas preparadas por el mecanismo de gelificación interna.*

Se partió de 20 ml de solución 2% alginato/cacao 1% p/p o 20 ml de solución 2% alginato/cacao 3% p/p neutralizada, la que se mezcló con 1000 μ l de solución de citrato cálcico ($\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) de concentración 0,05 M o 500 μ l de solución de citrato cálcico a 0,25 M. Las mezclas de alginato 2%/cacao 1%/citrato cálcico o alginato 2%/cacao 3%/citrato cálcico a baja y alta concentración de calcio se gotearon usando una jeringa sin aguja (50 ml BD Plastipak-2 mm de tubo de diámetro interno) durante 5 min por control manual en 40 ml de aceite vegetal con 80 μ l de ácido acético previamente disuelto para inducir la gelificación de las gotas. Las esferas formadas por extrusión para cada muestra, se mantuvieron en el baño oleoso acidificado durante 15 min bajo agitación moderada para asegurar su completa gelificación. Luego, se filtraron a través de un colador tipo cuchara y lavaron con agua. Algunas esferas se reservaron a fin de analizar sus propiedades mecánicas, otras esferas para medir su diámetro medio número-longitud y otras más para observar su estructura interna. En la Figura 3.7, se muestra el aspecto de las esferas preparadas por GI.



Figura 3.7 Esferas de alginato/cacao preparadas por extrusión y gelificación interna.

3.4.4.3 *Caracterización de las esferas: morfología, tamaño y textura.*

Las esferas obtenidas por extrusión a partir de las soluciones de alginato con diferentes concentraciones de extracto de cacao y sal de calcio, se caracterizaron según su morfología (estructura interna), tamaño (diámetro) y propiedades mecánicas (textura) tanto para las esferas preparadas por GE como las esferas preparadas por GI. En primer lugar, se tomaron 15 esferas de forma aleatoria para cada muestra y midieron sus diámetros utilizando un calibrador digital (Topcraft GT-CC-02). Los valores de los diámetros se expresaron en base a la longitud media \pm DE, éstos valores se analizaron empleando el software estadístico Statgraphics Plus (versión 5.1 Estadísticos Gráficos Corporation, Rockville, EE.UU., 2000). Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando la prueba t de Student con un nivel de significación establecido para $p < 0,05$.

Por otra parte, se tomaron un par de esferas para ser analizadas por SEM con un Quanta 200 microscopio, con el fin de determinar su morfología. Para ello, las esferas fueron congeladas con nitrógeno líquido y liofilizadas utilizando un LyoQuest-55 a $-51\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,1\text{ mbar}$ y $-0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la placa de calentamiento durante 18 horas. Una vez secas, las esferas de alginato/cacao se pegaron a una cinta adhesiva y recubrieron con 40 nm de oro utilizando la técnica de pulverización en un Joel JFC-100. Finalmente, las esferas enteras y partidas a mitad se examinaron por SEM con un voltaje de aceleración entre $7,0$ y 20 kV y un detector de Everhard-Thornley (ETD).

El análisis de la textura se llevó a cabo en un reómetro modular MARS III HAAKE programado para realizar mediciones con la fuerza normal (F). La

experimentación se realizó siguiendo el protocolo de Análisis de perfil de textura (TPA) propuesto por **Deladino et al., 2008** con algunas modificaciones referidas a la velocidad de compresión y según los resultados dados de porcentaje de deformación más adecuado en el trabajo realizado por **Wang et al., 2005** que garantiza una recuperación completa en las esferas de alginato después de un proceso de compresión, así como las limitaciones de trabajo del instrumento. Todos los TPA se realizaron en una cápsula Petri de vidrio (100 mm diámetro x 15 mm de altura), la que se llenó completamente con las esferas de alginato/cacao obtenidas por extrusión y las diferentes técnicas de gelificación según las formulaciones, utilizando un sensor de diámetro 35 mm rugoso a una velocidad de compresión de 0,025 mm/s, un 17% de deformación y una temperatura controlada a $5 \pm 0,5$ °C. A partir de las curvas dadas por el análisis de textura representado por un perfil de fuerza en función del tiempo, se midieron directamente algunas propiedades mecánicas como dureza, elasticidad y cohesividad, mientras otras fueron calculadas tales como gomosidad y masticabilidad. Con el fin de obtener resultados representativos de la textura de las esferas, los experimentos se realizaron por triplicado y expresaron como un valor medio \pm desviación estándar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) empleando el software Statgraphics Plus (versión 5.1 Estadística Graphics Corporation, Rockville, EE.UU., 2000). Todos los análisis estadísticos, se aplicaron considerando un nivel de significancia establecido para $p < 0,05$.

En la Figura 3.8, se muestran las esferas de alginato/cacao colocadas en la cápsula Petri para la realización del TPA mediante el uso del Reómetro.



Figura 3.8 Esferas preparadas por extrusión para el análisis de textura.

3.4.5 Métodos de determinación de la liberación del principio activo.

Con el fin de estudiar el mecanismo de liberación de los polifenoles desde los encapsulados, se prepararon microesferas de alginato/cacao en emulsión por GI y esferas por extrusión con el extracto de cacao empleando ambos mecanismos de gelificación, las cuales redispersaron en una solución acuosa para determinar el proceso de liberación del principio activo en el tiempo. Por otra parte, a partir de las esferas de alginato/cacao se estudió la influencia de la concentración de calcio en la liberación de los polifenoles al analizar la difusión del principio activo desde geles de alginato con el extracto de cacao hacia una base de gelatina neutra.

3.4.5.1 Liberación desde las microesferas.

Se prepararon microesferas de alginato/cacao en emulsión por GI tal como indica el protocolo en el apartado 3.4.3.4 para las condiciones dadas por el punto central del diseño fraccionado a pH neutro. Una vez separadas las microesferas por centrifugación y descartada la fase oleosa, la fase acuosa se reservó para utilizar esta como parte del medio de redispersión de las microesferas, a objeto de considerar la concentración de polifenoles liberados durante el proceso de separación. En este sentido, se prepararon microesferas para ser redispersadas en 50, 75, 100, 125, 150 y 200 ml de disolución acuosa constituida por el medio de separación reservado y, en los casos necesarios, parte de solución acuosa constituida por CaCl_2 a 0,05 M y 10% p/p de T20 para completar el volumen del medio. Cada una de las muestras se agitaron continuamente a 400 rpm (IKA Modelo ECA básico), se tomaron alícuotas del medio pasados 10 min, luego cada 5 min hasta completar 1 hora, después de 4 horas y finalmente a las 24 horas. Las alícuotas se analizaron para determinar el contenido de polifenoles totales liberados desde las microesferas con el tiempo, para ello se siguió el procedimiento de análisis espectrofotométrico de los polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (apartado 3.4.3.3.a). Todas las muestras fueron protegidas de la luz hasta su análisis. El medio acuoso CaCl_2 /T20 utilizado se consideró en la preparación de los blancos para todas las mediciones a fin de eliminar cualquier interferencia. Los resultados se expresaron como porcentaje de polifenoles totales liberados con el tiempo, teniendo en cuenta la cantidad de fenoles totales presentes inicialmente en

la fase dispersa (alginato/cacao) y la concentración en solución de los polifenoles liberados desde las microesferas.

$$\%CTF_{liberado} = \frac{C_{sol}}{C_i} \times 100 \quad (33)$$

Donde $\%CTF_{liberado}$ es el porcentaje o contenido total fenólico liberado desde las microesferas en el tiempo de estudio, C_{sol} es la concentración en solución de polifenoles totales liberados expresado en mg EAG/g extracto cacao y C_i es la concentración inicial de polifenoles presentes en la solución de alginato/cacao (fase dispersa) expresado en mg EAG/g extracto cacao. El estudio de todos los modelos de ajuste se realizó a través del software Matlab v.7.9.0, The Mathworks, Inc. Natick, MA. USA.

3.4.5.2 Liberación desde las esferas.

Se realizaron una serie de experimentos según el protocolo descrito en el apartado 3.4.4.1 para la preparación de esferas por extrusión con el mecanismo de GE. En este caso se partió de 20 ml de solución de alginato al 2%/cacao 1% p/p o 20 ml de solución de alginato al 2%/cacao 3% p/p, la cual se goteó directamente en 100, 150, 200, 250 y 300 ml de solución acuosa de CaCl_2 a 0,002 M (bajo calcio) o 0,005 M (alto calcio) respectivamente, actuando como baño gelificante para el estudio con diferentes concentraciones de calcio y a su vez como medio de liberación del principio activo. Las esferas formadas se mantuvieron en el baño gelificante durante 10 min bajo agitación moderada, y luego se tomaron las alícuotas pasados los 10 min y sucesivamente cada 10 min hasta completar 1 hora, tras 4 horas y finalmente a las 24 horas. Todas las alícuotas fueron analizadas para determinar el contenido de polifenoles totales liberados desde las esferas con el tiempo, mediante el análisis espectrofotométrico del método de Folin-Ciocalteu y utilizando para los cálculos la ecuación 33.

Por otra parte, se prepararon esferas por extrusión con el mecanismo de GI (apartado 3.4.4.2) a fin de estudiar la liberación de los polifenoles desde las esferas utilizando diferentes cantidades de extracto de cacao y concentraciones de calcio. Se partió de 20 ml de alginato al 2%/cacao 1% p/p o 20 ml de alginato al 2%/cacao 3% p/p con la adición de 1000 μl de solución de citrato cálcico a 0,05 M (bajo calcio) o 500 μl de solución de citrato cálcico a 0,25 M (alto calcio). Una vez extruida la

mezcla alginato/cacao/citrato en el baño oleoso acidificado, se dejaron gelificar durante 10 min, separaron con una cuchara coladora, lavaron y suspendieron en 100, 150, 200, 250 y 300 ml de solución de CaCl_2 a 0,001 M con agitación moderada. Se tomaron alícuotas de la solución acuosa de acuerdo con el volumen del medio, inicialmente pasados 10 min y sucesivamente cada 10 min hasta completar 1 hora, después de 4 horas y finalmente a las 24 horas.

El estudio de todos los modelos de ajuste se realizó a través del software Matlab v.7.9.0, The Mathworks, Inc. Natick, MA. USA.

3.4.5.3 *Liberación de los polifenoles desde geles de alginato/cacao con diferentes concentraciones de calcio en gelatina.*

Con el fin de estudiar la influencia de la concentración de calcio en la liberación de los polifenoles se prepararon geles de alginato/cacao por el mecanismo de gelificación interna sobre una base de gelatina neutra que sirvió de referencia para evaluar el contenido de polifenoles difundidos desde el gel alginato/cacao formado hacia la gelatina con la evolución del tiempo. Se partió de 12 g de una solución de alginato 2%/cacao 3% p/p a la que adicionó 600 μl de solución de citrato cálcico a 0,05 M (baja concentración de calcio) o 600 μl de citrato cálcico a 0,25 M (alta concentración de calcio). Cada muestra se preparó en un cilindro de plástico colocando 30 ml de gelatina neutra en la parte inferior (preparada como indica las instrucciones del producto), una vez gelificada por refrigeración, se colocó la mezcla homogenizada de alginato/cacao/citrato cálcico sobre ésta y adicionó 80 μl de ácido acético para inducir la formación del gel. Todas las muestras fueron protegidas de la luz y reservadas en refrigeración hasta su análisis. Se realizaron varias muestras de alginato/cacao utilizando bajas y altas concentraciones de calcio a fin de realizar mediciones a las 5, 16, 21 y 38 horas de iniciado el proceso de gelificación. Los geles formados (alginato/cacao y gelatina) se separaron y, se realizó un corte en la superficie de la gelatina de 1 mm de espesor, el cual se eliminó para evitar las posibles interferencias provocadas por el contacto directo de la gelatina con el gel alginato/cacao. A continuación, se realizó un nuevo corte a la gelatina con un espesor de 5 mm, ésta se fundió a 35 °C y analizó por el método de Folin-Ciocalteu a fin de determinar los polifenoles totales difundidos hacia la gelatina a las 5, 16, 21 y 38 horas. Se prepararon blancos a partir de gelatina neutra con la finalidad de eliminar interferencias.

Por otra parte, se prepararon geles siguiendo el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior pero colocando la gelatina y la mezcla alginato/cacao/citrato cálcico en un tubo para mediciones de dispersión de luz (Turbiscan). Se consideraron las mismas concentraciones pero utilizó la mitad de las cantidades de cada material debido a las limitaciones del volumen del tubo. El estudio de liberación de polifenoles desde el gel de alginato/cacao con diferente concentración de calcio hacia la gelatina neutra se analizó por mediciones de dispersión de luz utilizando el Turbiscan MA2000. Las mediciones se realizaron a las 5, 16, 21 y 38 horas para cada muestra mediante un escaneo a lo largo del tubo, dando valores de BS como una función del tiempo y la longitud del tubo.

3.4.6 Preparación y análisis de gelatinas para la aplicación de un alimento funcional.

Con el fin de estudiar y evaluar la aplicación de un producto alimentario funcional, se prepararon gelatinas enriquecidas con la incorporación de las esferas de alginato/cacao o encapsulados. Para llevar a cabo el estudio se aplicaron técnicas de análisis sensorial, en primer lugar, una prueba de tipo analítica empleando como analizador al ser humano con miras a evaluar la aceptación o rechazo del producto según las características organolépticas percibidas. A continuación, un análisis instrumental de las propiedades mecánicas de diferentes tipos de gelatinas con y sin la incorporación de los encapsulados y la influencia de estos sobre la textura con la evolución del tiempo de almacenamiento.

3.4.6.1 Preparación de las gelatinas enriquecidas con los encapsulados.

Se preparó un postre de gelatina enriquecido con esferas de alginato/cacao o encapsulados preparadas por extrusión. Se partió de 20 g de gelatina natural neutra hidratada previamente en 1 L de agua durante 30 min, a continuación se añadió 1 L de agua mineral a punto de ebullición generando un total de 2 litros de gelatina líquida. Una vez disuelta, se agregaron 100 g de fructosa, 8 ml de aroma de frambuesa y 2 ml de colorante amarillo. Esta preparación de gelatina se reservó a temperatura ambiente hasta ser necesaria para la elaboración del postre, y se mantuvo en estado líquido al encontrarse por encima de su temperatura de gelificación. La preparación de los encapsulados se llevó a cabo según los resultados obtenidos en la caracterización las esferas (morfología, tamaño y textura)

preparadas por extrusión con ambos mecanismo de gelificación a objeto de proporcionar los encapsulados o esferas de características más adecuados para su incorporación en un alimento (apartado 3.4.4.3). En este sentido, se prepararon esferas alginato/cacao o cápsulas bioactivas por extrusión con el mecanismo de GI a partir de 20 ml de solución alginato 2%/cacao 3% p/p a pH neutro y 500 μ l de solución de citrato cálcico a 0,25 M (alta concentración de calcio), éstas se gotearon en un baño oleoso acidificado bajo agitación moderada y se mantuvieron allí durante 15 min, se filtraron, lavaron con agua y reservaron bajo refrigeración hasta su uso. Del mismo modo, se prepararon esferas de alginato con frambuesa a partir de 20 ml de una solución acuosa de alginato sódico al 2% p/p y frambuesa entera liofilizada en polvo utilizando la misma cantidad que con el extracto de cacao encapsulado. Esta mezcla se homogenizó y dejó desairear durante 24 horas. A la solución de alginato 2%/frambuesa 3% p/p se le controló el pH y a continuación se adicionaron unas gotas de colorante para conseguir el color natural del extracto de cacao (burdeos). La frambuesa entera liofilizada se utilizó con el fin de obtener esferas con alto contenido de fibra que permitiera la retención de los colorantes. Algunas esferas se colorearon con naranja, otras con verde y el resto con burdeos. Una vez endurecidas las esferas en el baño gelificante durante 15 min, las esferas se colaron con una cuchara de acero para esferificaciones, se lavaron ligeramente con agua y se almacenaron bajo refrigeración hasta su uso. Cada postre de gelatina se preparó con 30 ml de gelatina (endulzada, aromatizada y coloreada) y 30 esferas de alginato conformadas por 10 esferas de cada color, y se introdujeron en un vaso de plástico. En algunos postres de gelatina se incorporaron las esferas de color burdeos (frambuesa), para simular las esferas de alginato/cacao, y en otras se utilizaron las esferas con el extracto de cacao (cápsulas bioactivas) en su lugar. Finalmente, tras 1 día de refrigeración se realizó la evaluación sensorial a las muestras mediante la aplicación de una prueba de tipo discriminatorio. La Figura 3.9 muestra el aspecto final de las gelatinas utilizadas para la cata.

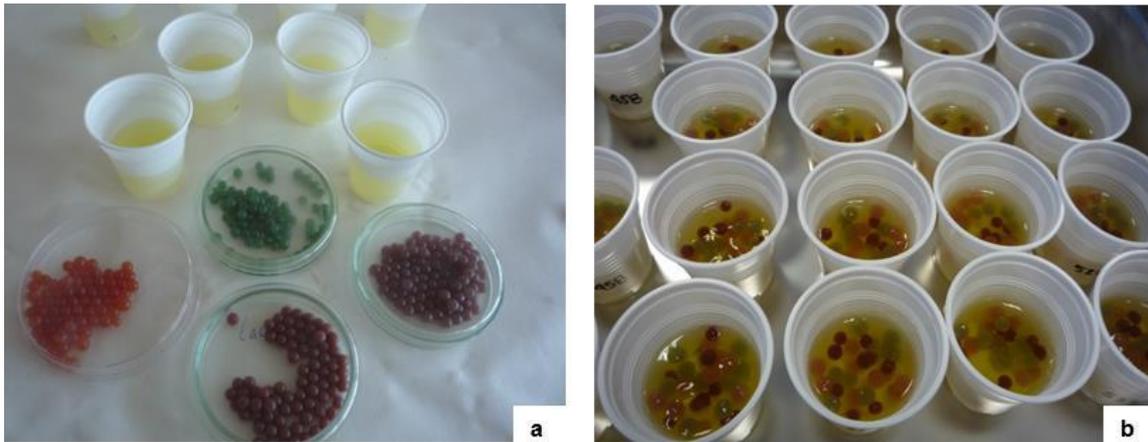


Figura 3.9 Postres de gelatina enriquecidas con los encapsulados preparadas para la evaluación sensorial. Proceso de incorporación de las diferentes esferas, a y Postres de gelatinas presentados para su evaluación sensorial, b.

3.4.6.2 *Evaluación sensorial tipo discriminatorio de postres de gelatina enriquecida con encapsulados de alginato.*

El método de análisis de tipo discriminatorio se implementó a través de una prueba triangular para los postres de gelatina. Para ello, se estableció un grupo de 20 personas de diferentes edades, conformado aleatoriamente por estudiantes y personal del Campus de la Alimentación de la Universidad de Barcelona. Para realizar la prueba triangular se prepararon tres muestras codificadas para cada panelista. Estas tres muestras se presentaron simultáneamente a cada panelista indicando que la degustación debía comenzar de izquierda a derecha, pudiendo probar cada una tantas veces fuese necesario siempre que se respetara el orden de las muestras. Se sugirió beber un poco de agua o comer un trozo de galleta para eliminar posibles interferencias. A los panelistas se les informó que dos muestras eran idénticas y una diferente, por tanto, debían identificar la muestra diferente e indicar su respuesta en el formulario. Las muestras se presentaron en forma aleatoria a fin de no crear tendencias en la decisión con un número posible de combinaciones igual a seis. Las pruebas se realizaron en el Laboratorio de Evaluación Sensorial del Dpto. de Nutrición y Bromatología, iluminado con luces rojas para enmascarar las diferencias de intensidad de color. Las respuestas se procesaron de acuerdo a una tabla de probabilidad estadística con $\alpha=0,05$ (**Mason y Nottingham, 2002**), con la probabilidad de una respuesta correcta por casualidad de un 1/3.

3.4.6.3 *Preparación de las gelatinas con y sin encapsulados.*

Se prepararon diferentes muestras de gelatina en cilindros de plástico previamente lubricados con aceite vegetal para ser analizados a través de un TPA. Cinco tipos de gelatinas fueron preparadas: en tres tipos de gelatinas se incorporaron esferas de alginato tal como se describe a continuación:

.- Gelatinas con esferas de alginato/cacao (GEC): incorporación de esferas alginato 2%/cacao o encapsulados (cantidad de extracto utilizado en la elaboración de los postres enriquecidos) en gelatina natural neutra.

.- Gelatinas con esferas de alginato (GEA): incorporación de esferas de alginato 2% p/p sin el extracto de cacao en gelatina natural neutra.

.- Gelatinas como postre enriquecido (GPE): gelatinas preparadas con la misma formulación de las gelatinas enriquecidas e incorporación de las esferas de alginato 2%/cacao o encapsulados.

Otros dos tipos de gelatinas se prepararon sin encapsulados:

.- Gelatinas con extracto de cacao sin encapsular o libre (GCL): adición directa del extracto de cacao a la gelatina natural neutra.

.- Gelatinas neutras (GN): gelatina natural neutra sin la adición de las esferas de alginato ni el extracto de cacao.

Las esferas de alginato 2%/cacao se prepararon por extrusión aplicando las condiciones de formulación y el mecanismo de gelificación utilizados para la elaboración de los encapsulados incorporados en los postres enriquecidos para su análisis sensorial (apartado 3.4.6.1). Del mismo modo, se prepararon esferas de alginato 2% p/p sin extracto de cacao. Se utilizó gelatina neutra para la preparación de las muestras de GEC y GEA, la cual se elaboró de acuerdo a las instrucciones de preparación del producto, mientras que para las GPE, se incorporó a la preparación de la gelatina natural neutra el endulzante (fructosa), colorante y aromatizante, ingredientes utilizados para la elaboración de las gelatinas enriquecidas como postre, para ello se mantuvieron las proporciones indicadas en el apartado 3.4.6.1. Para cada muestra de gelatina se utilizaron 15 ml de gelatina y 15 esferas de alginato 2% p/p sin cacao o esferas de alginato 2%/cacao (encapsulados) según el tipo de gelatina (GEA, GEC o GPE).

Para la preparación de las GCL se adicionó directamente extracto de cacao a la gelatina neutra (sin encapsular), se consideró la concentración de cacao utilizada para la preparación de las esferas alginato/cacao. Al no observarse gelificación y la formación de un precipitado se duplicó la concentración de gelatina en la preparación. En este sentido, la GN se realizó considerando el doble de concentración de gelatina para ser comparada con la GCL. Se finalizó, colocando una capa delgada de aceite vegetal sobre la superficie de todas las muestras en cada cilindro para evitar la evaporación de agua durante su almacenamiento. Todas las muestras fueron protegidas de la luz y se mantuvieron refrigeradas. Se prepararon las muestras necesarias para un plan de análisis de 27 días de almacenamiento.

3.4.6.4 Análisis instrumental de las propiedades texturales de las gelatinas con y sin encapsulados.

Para llevar a cabo el análisis instrumental de textura a los diferentes tipos de gelatinas con el tiempo de almacenamiento se utilizó un Reómetro modular MARS III HAAKE programado para realizar mediciones con la fuerza normal. El TPA se realizó con un sensor de 35 mm y una placa de 60 mm lisos, una velocidad de 0,025 mm/s y 17% de deformación durante los ciclos de compresión. A partir de las curvas de TPA se midieron las propiedades mecánicas dureza, cohesión y elasticidad, y se calcularon gomosidad y masticabilidad. Por otra parte, el ensayo de resistencia (ER) se realizó con un sensor de 20 mm y una placa de 35 mm rugosos para evitar deslizamientos de la muestra a una velocidad de compresión de 0,025 mm/s constante y un 70% de deformación.

El ensayo de resistencia aplicado a las gelatinas se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por **Zhou y Regestein (2007)** con algunas modificaciones dadas las limitaciones del equipo. Los ensayos de TPA y ER se realizaron periódicamente según la planificación durante los 27 días de almacenamiento, éstos se realizaron al menos por triplicado para la GEC. La superficie de la muestra se lubricó con aceite vegetal en aerosol antes de cada ensayo. Durante el análisis instrumental de las propiedades texturales la temperatura se mantuvo a $5 \pm 0,5$ °C a fin de simular las condiciones de refrigeración de las gelatinas. Las gelatinas en forma cilíndrica se cortaron con un espesor de 10 mm desde su superficie.

3.4.6.5 *Análisis del principio activo en las gelatinas y su evolución con el tiempo.*

A fin de evaluar la presencia de los polifenoles en las gelatinas, se analizó la concentración de los fenoles totales en las gelatinas con los encapsulados (GEC) y en las gelatinas con extracto de cacao libre (GCL) y su evolución con el tiempo de almacenamiento. Para ello, se prepararon las gelatinas necesarias para cada tipo de muestra considerando los 27 días de almacenamiento. Éstas se fundieron a 35 °C, en el caso de las GEC se extrajeron los encapsulados o esferas, una vez líquidas se tomaron alícuotas y analizaron por el método de Folin-Ciocalteu agregando un 12% v/v de solución NaCO₃ de concentración 20% p/p, un 4% v/v de reactivo de Folin 2 N y agua MilliQ hasta completar 10 ml. Se agitaron vigorosamente y dejaron reaccionar durante 1 hora, a continuación se filtraron y procedió a la medición de su absorbancia a 765 nm. Para eliminar interferencias se consideró en el blanco la presencia de gelatina natural neutra. El contenido de fenoles totales fue expresado como mg EAG/ml de solución con extracto de cacao. Las mediciones se realizaron al menos por triplicado para expresar el valor medio \pm DE.

3.4.6.6 *Análisis microbiológico.*

Se realizó el ensayo por siembra directa con el fin de determinar la presencia de microorganismo en las muestras de gelatinas. Para el crecimiento de una amplia variedad de organismos se preparó un medio con 40 g de agar/soja/triptona en 1 litro de agua milliQ a ebullición y agitó hasta su disolución completa. El medio se esterilizó en un horno a 140 °C durante 3 horas (Horno Selecta) y colocó en placas de Petri estériles (100x15 mm), se tapó y se dejó enfriar hasta su completa gelificación. Para el aislamiento de hongos y levaduras se preparó un medio de pH ácido con 65 g de agar/dextrosa/Sabouraud en 1 litro de agua milliQ a ebullición, una vez disuelto se esterilizó aplicando las condiciones mencionadas anteriormente. A continuación, se adicionó una solución de antibiótico (100 mg de cloranfenicol) en el agar esterilizado, se homogenizó y esterilizó de nuevo. La mezcla se colocó en placas de Petri estériles, taparon y dejaron enfriar. Se analizaron las GN, GEC y GCL almacenadas hasta el último día de experimentación (Día 27). En este sentido, cada muestra se inoculó empleando un bastoncillo de algodón sobre la superficie de cada medio haciendo movimientos en zig-zag. Todas las muestras se incubaron a

37 °C durante 72 horas. Se empleó la observación directa para evaluar la presencia de microorganismos en estas muestras.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización del Alginato de sodio.

La caracterización del alginato de sodio se llevó a cabo para determinar su composición química (estructura y peso molecular) y presencia de otros compuestos, a fin de identificar las características específicas del polisacárido usado como materia prima para la preparación de los encapsulados estudiados en este trabajo. Considerando que el alginato comercial varía en composición y peso molecular según su origen y formulación del proveedor, y debido a la importancia que tiene ésta sobre las características del gel formado es imprescindible su caracterización.

4.1.1 Determinación de la composición química.

El análisis de la estructura química del alginato de sodio utilizado para la preparación de los diferentes encapsulados, se realizó por RMN para una muestra no hidrolizada de alginato de sodio (Panreac) tal como se explica en el apartado 3.4.1.1. A partir de ésta técnica se determinó el ratio de sus monómeros (M/G) y la frecuencia de los bloques constituyentes.

4.1.1.1 Estructura química: Resonancia magnética nuclear.

El espectro resultante se procesó con el programa MestreNova v. 8.1.2 (Apéndice 9.1-Figura 9.1). Los resultados de las fracciones molares dados por los valores de las integraciones (deconvolución de los picos) y los cálculos realizados a partir del protocolo descrito en el método de l'ASTM International se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Composición y frecuencia de bloques del alginato de sodio.

Frecuencias de bloques mónadas, díadas y tríadas (F)	Fracciones molares de F	Longitud media de los bloques (N)	Valores de N
F_G	0,41	N_G	2,55
F_M	0,59	N_M	3,64
F_{GG}	0,25	$N_{G>1}$	3,04
F_{MM}	0,43		
F_{GM}	0,16		
F_{GGG}	0,13		
F_{MGM}	0,04		
F_{GGM}	0,12		
Ratio M/G	1,43	58,85% M y 41,15% G	

Monómeros: ácido α -L-gulurónico, G y ácido β -D-manurónico, M; Frecuencia de bloques, F; Frecuencia mónada de G, F_G ; Frecuencia mónada de M, F_M ; Frecuencia díada de GG, F_{GG} ; Frecuencia díada de MM, F_{MM} ; Frecuencia díada bloques alternados de GM, F_{GM} ; Frecuencia tríada de GGG, F_{GGG} ; Frecuencia tríada de bloques alternados de MGM o GGM, F_{MGM} o F_{GGM} ; Longitud media de los bloques, N; Longitud media de los bloques-G, N_G ; Longitud media de los bloques-M, N_M ; Longitud media de los bloques-G mayores de 1, $N_{G>1}$.

Estos resultados indican que la estructura polimérica del alginato sódico se encuentra conformada por diferentes bloques constituidos principalmente por un 58,85% de fracciones del ácido β -D-manurónico y un 41,15% por fracciones del ácido α -L-gulurónico. La cadena polimérica posee una distribución de bloques heterogénea conformada de manera aleatoria entre frecuencias mónadas (F_M y F_G), díadas (F_{MM} , F_{GG} y F_{GM}) y tríadas (F_{GGG} , F_{MGM} y F_{GGM}) como ejemplo se tiene la estructura mostrada en la Figura 2.1. Se ha demostrado que las propiedades de los alginatos dependen de la proporción relativa de estos tres tipos de bloques: M, G y alternados MG (**Smidsrod y Draget, 1996**). Por otra parte, a partir de estos valores se puede calcular la longitud media de los bloques, observándose que $N_{G>1}$ es superior a la unidad lo que puede ser un indicativo de correlación con el poder gelificante en caso que se estuviesen empleando diferentes fuentes de alginato (**Draget, 2000**). En tal sentido, los valores de la longitud media de los bloques-G ($N_G=2,55$) y la longitud media de los bloques-M ($N_M=3,64$), así como las fracciones molares o proporciones de los bloques-G ($F_G=0,41$) y bloques-M ($F_M=0,59$) indican las propiedades químicas y físicas de las moléculas de alginato, sugiriendo que existe una contribución equilibrada por parte de los bloques-G quienes proveen la capacidad de formación del gel, y los bloques-M así como de las unidades

alternadas (MG) quienes proporcionan flexibilidad a las cadenas de los ácidos urónicos.

En este trabajo la preparación de los diferentes encapsulados se realizó a partir de una misma fuente de alginato de sodio, es decir, empleando alginato de sodio de iguales características y suministrado por un mismo proveedor.

4.1.1.2 *Peso molecular: Cromatografía de exclusión por tamaños.*

De acuerdo a la curva de calibrado realizado con Dextranos de pesos moleculares desde 80900 hasta 1360000 Da y a partir de la ecuación de ajuste de tercer orden ($R^2 = 0,99$), mostrada en el Apéndice 9.1-Figura 9.3, y la información dada por el cromatograma del alginato sódico (Panreac) se procesaron los datos utilizando el software Empower para el cálculo del peso molecular promedio (M_w) del alginato de sodio en 1750 kDa y el peso molecular numérico promedio (M_n) en 668 kDa (Figura 4.1). La literatura señala que un alto peso molecular hace al alginato susceptible a degradación polimérica debido a cambios bruscos de pH. Por otra parte, su poder espesante se hace mayor lo que podría dificultar su manipulación.

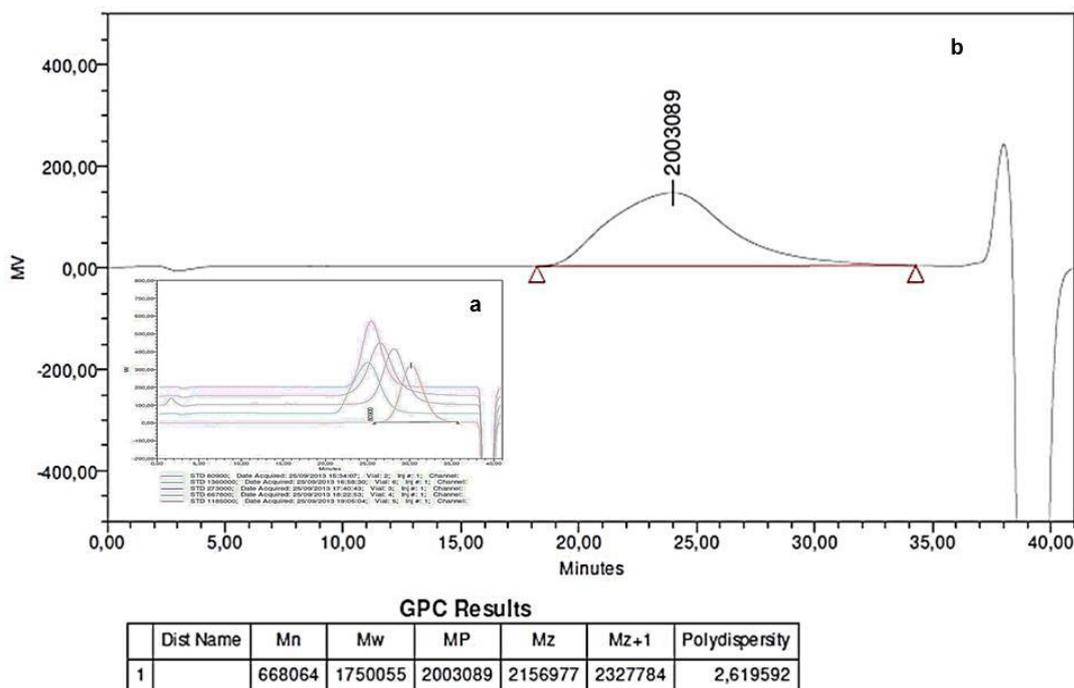


Figura 4.1 Cromatograma del alginato sódico obtenido por CET. Cromatogramas del calibrado con Dextranos de pesos moleculares entre 80900 y 1360000 Da, a; Cromatograma del alginato sódico (Panreac) en solución acuosa 2 mg/ml, b. Peso molecular promedio, M_w ; Peso molecular numérico promedio, M_n . Siglas en inglés para la Cromatografía de Permeación de gel, GPC o Cromatografía de Exclusión por Tamaño, CET.

Según **Draget (2000)** la relación M_w/M_n conocida como *Índice de polidispersidad* (IP) permite inferir si la muestra está conformada por una mezcla de productos de diferentes pesos moleculares (amplia distribución) para obtener una muestra de cierto peso molecular (IP > 2) o se ha producido una degradación del polímero durante su proceso de producción o incluso de la materia prima antes de su extracción (IP < 2). La muestra de alginato de sodio utilizada presenta un IP igual a 2,62 lo que sugiere una amplia distribución de sus pesos moleculares, por tanto, la muestra de alginato de sodio es producto de una mezcla de diferentes tipos durante el proceso de manufacturación, el cual es un método muy común por parte de los fabricantes a fin de suministrar un producto de viscosidad específica. En tal sentido, dicho resultado representa una característica de composición significativa a tomar en cuenta durante el estudio de caracterización de sus geles y preparación de los encapsulados.

4.1.2 Determinación de otros compuestos.

Se realizó un estudio del comportamiento térmico por DSC de diferentes muestras de lotes de alginato sódico (Panreac) y alginato sódico (Solé Graell), los termogramas para cada muestra se obtuvieron a través de un barrido de temperaturas entre 30° y 300 °C a una velocidad de 10 °C/min bajo un atmósfera inerte de N₂ (apartado 3.4.1.2.a). A fin de determinar similitudes o diferencias se compararon los termogramas anteriores con los señalados por la literatura. Por otra parte, la técnica de difracción de rayos X se empleó para identificar la presencia de otro compuesto en la muestra y una vez conocido se cuantificó por Refractometría.

4.1.2.1 Comparación entre termogramas de alginatos.

Los termogramas obtenidos del análisis de los tres lotes de alginato de sodio suministrados por Panreac presentaron curvas calorimétricas similares, por tanto, en la Figura 4.2 se representa su valor medio de las muestras de alginato sódico analizado de los diferentes lotes (Apéndice 9.1) el cual se compara con el termograma resultante del análisis del alginato sódico suministrado por Solé Graell.

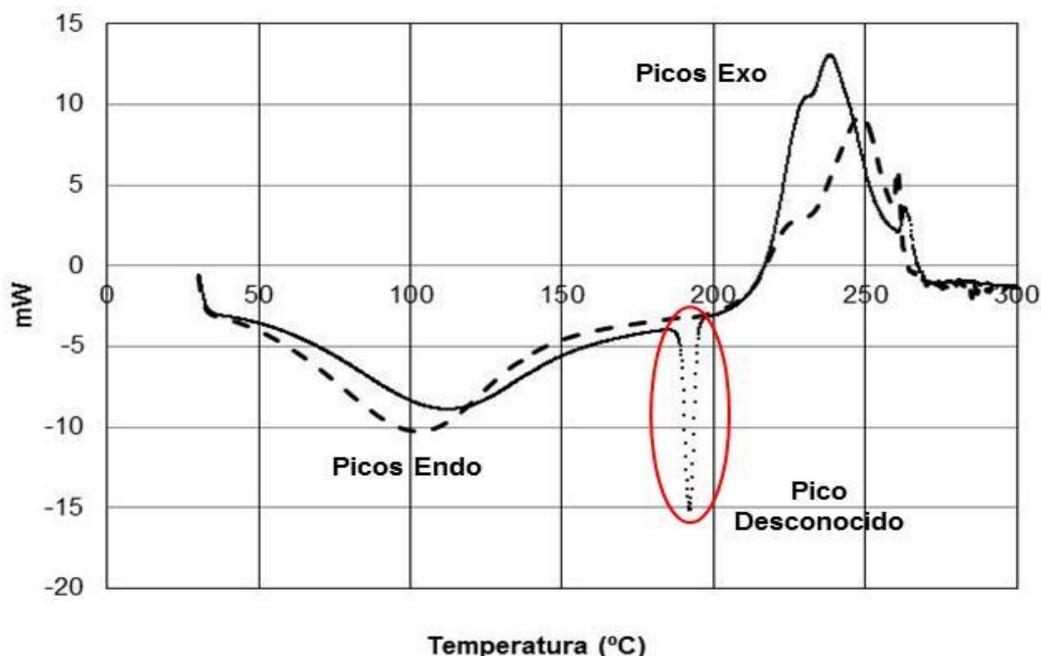


Figura 4.2 Termogramas de alginato de sodio. Panreac, - - - - Solé Graell. Picos: Endo (endotérmico) 108,34° y 102,29 °C; Exo (exotérmico) 239,08° y 248,83 °C de Panreac y Solé Graell respectivamente. Pico desconocido: 191 °C correspondiente a las muestras de Panreac.

Puede observarse en la Figura 4.2 un segundo pico endotérmico a los 191 °C correspondiente al alginato de sodio suministrado por Panreac, comportamiento prácticamente imperceptible para el caso de la muestra de Solé Graell, que puede ser apreciado con más detalle en el Apéndice 9.1-Figura 9.6. Según investigaciones hechas por **Soares et al., (2004)** el alginato de sodio analizado en una atmósfera de N₂ a 10 °C/min presenta un pico endotérmico ancho que sugiere un proceso de deshidratación alrededor de los 92,6 °C seguido de un pico exotérmico alrededor de los 250,6 °C lo cual se atribuye a un proceso de descomposición del polímero. Este comportamiento térmico es bastante similar en ambas muestras de alginato, sin embargo la literatura no destaca la presencia de un segundo pico endotérmico tal como se aprecia para la muestra de Panreac. En tal sentido, podría tratarse de la presencia de un compuesto diferente al observarse dos picos de fusión (endotérmicos) distintos. No obstante, aunque tengan picos de fusión diferentes, podrían ser polimorfos de la misma sustancia y tener un comportamiento similar. Por ello, es importante realizar una mejor caracterización que permita su identificación.

4.1.2.2 Identificación del compuesto: Difracción de rayos X.

Los resultados del espectro obtenido por DRX del alginato de sodio muestran la presencia de un compuesto cristalino representado por los picos sobresalientes (azul) en el espectro de color rojo. Se contrastó este espectro con la base de datos y el resultante del análisis de una muestra de ácido algínico donde se pudo observar una clara correspondencia de los picos sobresalientes con el patrón de difracción identificado como Sacarosa (Figura 4.3).

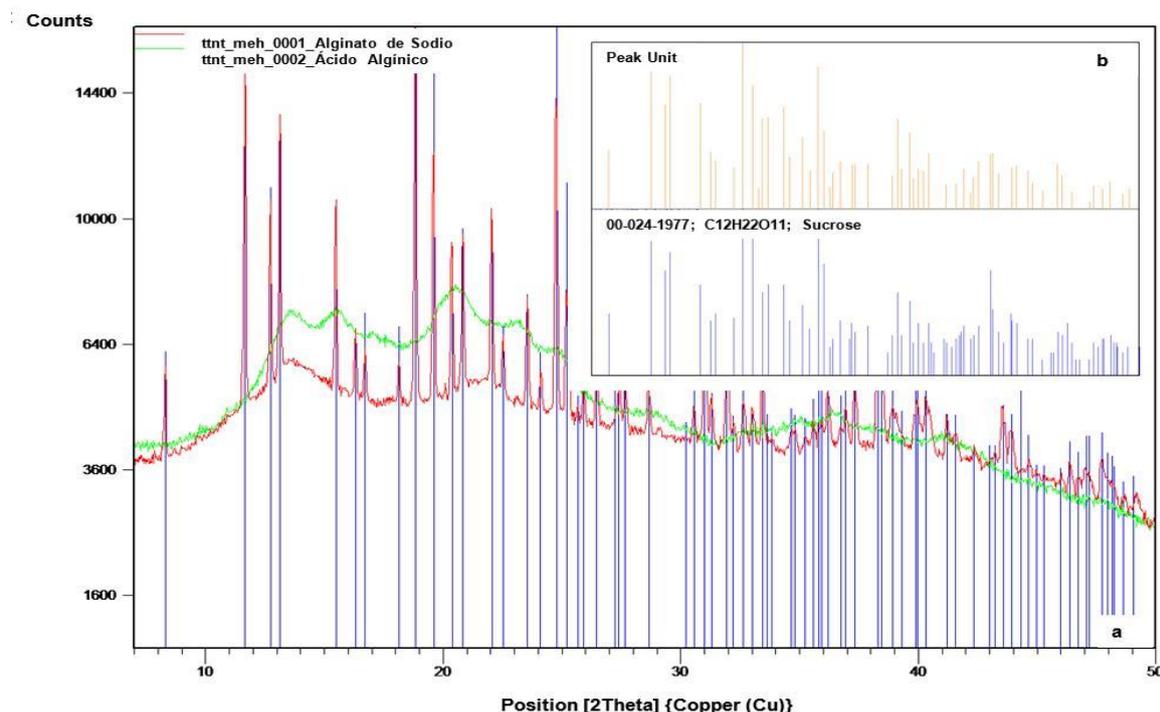


Figura 4.3 Espectros de difracción con rayos X. Superposición de espectros del Alginato de sodio (rojo), Ácido algínico (verde) y Sacarosa (azul), a; Comparación del patrón de difracción de los picos sobresalientes (azul) con la base de datos, b.

4.1.2.3 Cuantificación del compuesto: Refractometría.

Considerando la similitud del espectro obtenido por DSC para el alginato sódico suministrado por Solé Graell con los referenciados en la literatura (**Soares et al., 2004**), se tomó este como patrón (índice de refracción, $IR=1,3355$) para la elaboración de la curva de calibrado con sacarosa por análisis refractométrico. Las mediciones del IR de varias disoluciones de alginato de sodio al 2% p/p (Solé Graell) con diferentes concentraciones de sacarosa comercial (desde 0% a 16% p/p) se realizaron en un refractómetro Abbe. A partir de la ecuación $[IR = (0,0014 \cdot \%Sacarosa) + 1,3355]$ resultante de la recta de calibrado (Apéndice 9.1-

Figura 9.7), se cuantificó la cantidad de sacarosa presente en una muestra de solución de alginato de sodio (Panreac/muestra problema) al 2% p/p, el IR de la muestra de alginato sódico fue de 1,3368. Por tanto, se obtuvo como resultado un 0,93% p/p de sacarosa presente en el alginato de sodio suministrado por Panreac y utilizado para la preparación de los geles de alginato cálcico en el presente trabajo.

4.2 Caracterización reológica de los geles de alginato obtenidos con diferentes sales de calcio y mecanismos de gelificación.

La realización de experimentación previa fue necesaria a fin de determinar las características viscoelásticas de los geles de alginato preparados con diferentes fuentes de calcio, distintas concentraciones de la sal de calcio y mecanismos de gelificación.

4.2.1 Influencia de la concentración de calcio en los geles preparados por gelificación externa.

En la Figura 4.4 se muestran los valores promedios del módulo de almacenamiento (G') a frecuencia de 1 Hz para los geles preparados por gelificación externa (GE) a partir de soluciones acuosas de CaCl_2 para las relaciones $0,1 \cdot 10^{-3}$; $0,4 \cdot 10^{-3}$; $0,6 \cdot 10^{-3}$ y $1,2 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato, los datos obtenidos de G' para todas las frecuencias, 0,01 a 10 Hz, se presentan en el Apéndice 9.2 (Tabla 9.1).

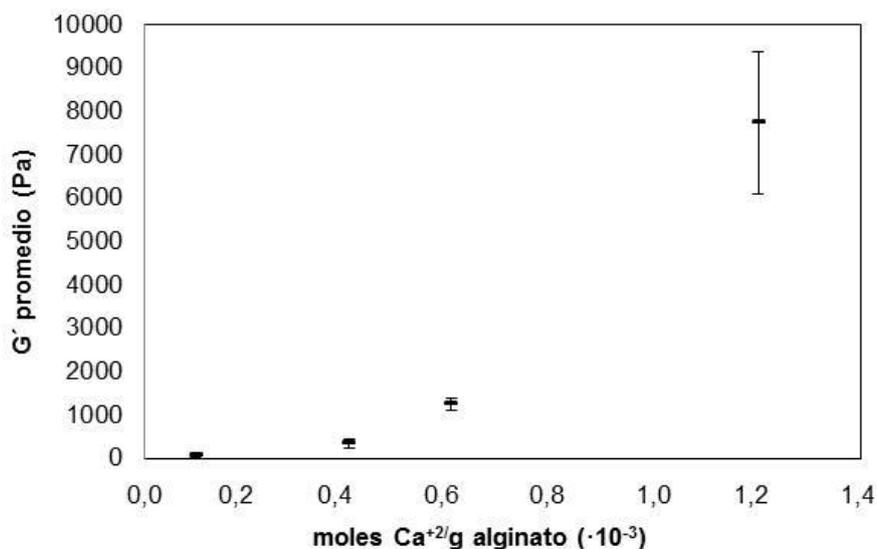


Figura 4.4 Propiedades reológicas de geles de alginato con diferentes concentraciones de calcio preparados por gelificación externa. Solución de alginato sódico 2% p/p; Concentraciones de calcio, - $0,1 \cdot 10^{-3}$; $0,4 \cdot 10^{-3}$; $0,6 \cdot 10^{-3}$ y $1,2 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato; Valor medio del Módulo de almacenamiento, G' (\pm desviación estándar) a frecuencia de 1 Hz y 25 °C.

Los geles preparados por gelificación externa a partir de una solución de alginato sódico 2% p/p y diferentes concentraciones de calcio, se cortaron a 2 mm desde su superficie (espesor) y analizaron por ensayos reológicos. Se puede observar que los valores de G' se incrementan progresivamente al aumentar la concentración de calcio en estos geles. Para la mayor concentración de calcio utilizada ($1,2 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato) se tiene un valor de G' considerablemente superior a los obtenidos con las menores concentraciones de calcio ($0,1$ - $0,6 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato), esto se atribuye a la formación de un gel más reticulado debido a la mayor cantidad de iones calcio disponibles en la solución de CaCl_2 que permiten la formación de mayores puntos de gelificación y, por tanto, confieren al gel una estructura más compacto (**Draget, 2000**). Por otra parte, los geles se observaron completamente transparentes y homogéneos para todas las concentraciones de calcio estudiadas.

4.2.1.1 Concentración mínima de calcio requerida para la gelificación.

Se realizó la prueba de barrido de frecuencia en los geles preparados por gelificación externa a partir de una solución de alginato de sodio al 2% p/p y diferentes concentraciones de calcio, $[\text{Ca}^{+2}]$, a partir de una solución acuosa de CaCl_2 como se explica en el apartado 3.4.2.1.a, la cual permitió determinar la

cantidad mínima de calcio requerida para que se produjera una gelificación adecuada. Tomando en consideración que en un gel adecuadamente formado las moléculas de alginato se unen en una red tridimensional que se extiende a toda la masa de gel formada, en un gel existen todos los tiempos de relajación, y por tanto, como consecuencia la respuesta viscoelástica de un gel es independiente de la frecuencia. En tal sentido, el punto de gelificación se puede determinar si una variable viscoelástica, por ejemplo, el módulo complejo (G^*) se representa gráficamente frente a la $[Ca^{+2}]$ para cada frecuencia de prueba. En la Figura 4.5 se observa que el punto en el que todas las curvas se unen en el mismo valor representa el valor mínimo de $[Ca^{+2}]$ requerido para la gelificación.

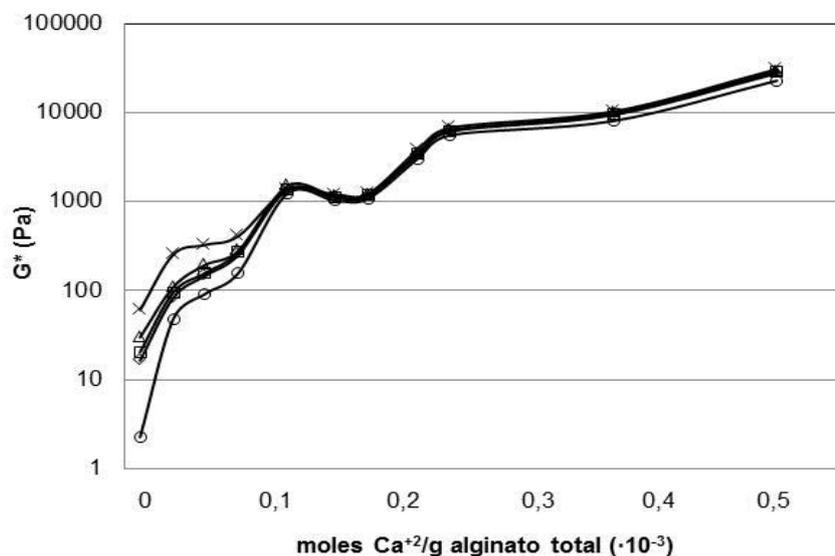


Figura 4.5 Concentración mínima de calcio requerida para la gelificación. Módulo complejo, G^* como función de los moles Ca^{+2}/g alginato total ($\cdot 10^{-3}$) para frecuencias de 0, 0,1; \diamond 1,0; \square 1,5; Δ 2,0 y \times 5,0 Hz. Geles preparados por gelificación externa con alginato de sodio al 2% p/p y 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,5; 0,65; 0,75; 0,9; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5; 10 y 15% p/p de calcio a partir de soluciones acuosas de $CaCl_2$ a 25 °C.

En concentraciones más altas, se observa que todas las curvas coinciden, y el aumento posterior de G^* con la concentración de calcio puede ser atribuido a un fortalecimiento ulterior de los geles debido a la formación de más puntos de conexión entre las moléculas de alginato ya interconectadas (formación de una red más compacta o cerrada). De acuerdo con la Figura 4.5, la gelificación se produce a un valor mínimo de $0,113 \cdot 10^{-3}$ moles de Ca^{+2}/g de alginato. Los valores de G^* para todas las concentraciones de calcio y frecuencias se presentan en el Apéndice 9.2 (Tabla 9.2).

4.2.1.2 *Influencia del pH en las propiedades reológicas del gel.*

Con el fin de evaluar la influencia del pH en la formación de geles de alginato por GE, se prepararon los geles a partir de una solución de alginato sódico 2% p/p y una solución acuosa de CaCl_2 tomando en consideración el valor mínimo de calcio requerido determinado en el apartado anterior para la formación adecuada del gel. En tan sentido, se tomó un valor superior al mínimo requerido e igual $0,18 \cdot 10^{-3}$ moles de Ca^{+2}/g de alginato con la finalidad de garantizar la completa formación del gel. Para ello, se utilizaron varias soluciones de CaCl_2 con diferentes pH, entre valores de 0,5 y 13, por medio de la adición de HCl o NaOH, como se explica en el apartado 3.4.2.1.a. Los valores de G^* obtenidos en el estudio de la influencia del pH en las propiedades reológicas de los geles se presentan en el Apéndice 9.2 (Tabla 9.3) y representaron frente a la frecuencia en la Figura 4.6. A pesar de que puede observarse la independencia de los valores de G^* con la frecuencia, lo que parece indicar que existe un gel adecuadamente formado en el intervalo de estudio (pH 0,5 a 13), cabe resaltar que se obtuvo un gel blanco no homogéneo con partículas sólidas en el interior al utilizar pH por debajo de 4 en la formación de estos geles (Figura 4.7). Este fenómeno se puede atribuir a la precipitación de ácido algínico (Cubero *et al.*, 2002), que produce un aumento en la respuesta viscoelástica debido a la presencia de un material de características diferentes al gel de alginato de calcio. Por lo tanto, no es adecuado trabajar por debajo de este pH.

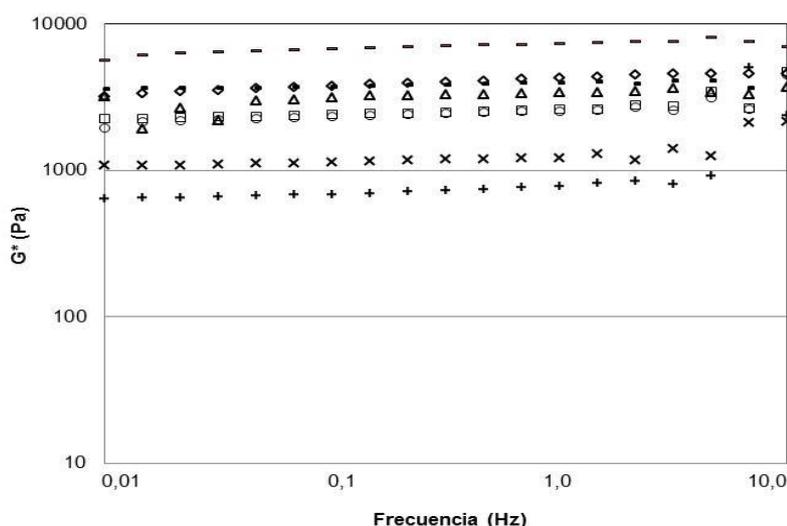


Figura 4.6 Influencia del pH sobre las propiedades reológicas para un barrido de frecuencias en geles preparados por GE con $0,18 \cdot 10^{-3}$ moles de Ca^{+2}/g alginato. Modulo complejo, G^* . Geles preparados con alginato de sodio al 2% p/p, 25 °C. – pH 0,5; \diamond pH 3; - pH 4; \square pH 5; o pH 6; Δ pH 8; x pH 11 y + pH 13.

Por otro lado, para valores de pH iguales a 11 o superiores se observa un descenso del módulo complejo (G^*), probablemente debido a una despolimerización parcial del alginato, de acuerdo a las observaciones hechas por **Cubero** y colaboradores (**2002**) en estudios del gel de alginato con pH superiores a 10.

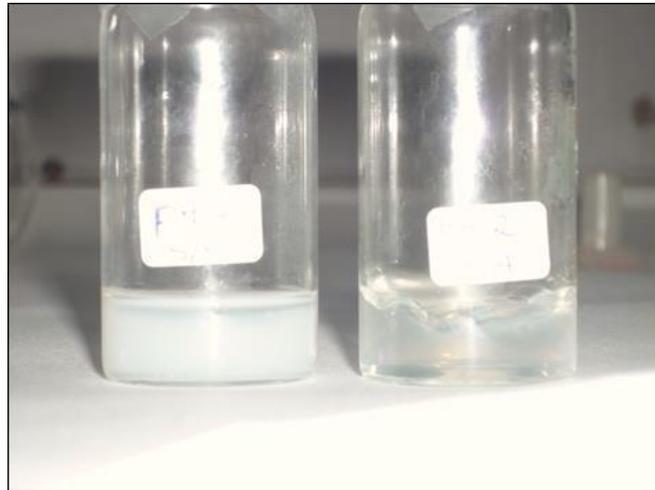


Figura 4.7 Aspecto de los geles por influencia del pH. Formación de un precipitado a pH inferior de 4 correspondiente a la presencia de ácido algínico (izquierda) y gel de alginato a pH superior a 4 (derecha).

4.2.2 Influencia de la fuente de calcio y la concentración en los geles preparados por gelificación interna.

Los geles preparados a partir de una solución de alginato 2% p/p, diferentes sales de calcio (Hidróxido, Carbonato y Citrato) y varias concentraciones ($0,1 \cdot 10^{-3}$; $0,4 \cdot 10^{-3}$; $0,6 \cdot 10^{-3}$ y $1,2 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2} /g alginato), se formaron en jeringas colocando la solución alginato/sal de calcio y sobre ésta el aceite vegetal con ácido acético disuelto para inducir la formación del gel a través de la liberación de los iones calcio dispersos en la solución de alginato sódico. El estudio de la influencia de las diferentes fuentes de calcio y concentraciones se realizó a través de las propiedades reológicas de los geles formados tras 24 horas de reacción. Los geles cilíndricos se cortaron a 2 mm de distancia de la interfase (alginato/aceite), como se explica en el apartado 3.4.2.2. En la Figura 4.8 se muestran los valores del módulo de almacenamiento (G') para las distintas sales de calcio utilizadas en el proceso de preparación de los geles. Para cada muestra el valor medio del G' se representó en función de la variación de la cantidad de calcio (moles de calcio por gramo de alginato de sodio) a 1 Hz de frecuencia. Los datos de los ensayos reológicos

obtenidos por duplicado con su correspondiente desviación estándar (DE), se presentan en el Apéndice 9.2 para cada una de las sales de calcio estudiadas (Tablas 9.4 al 9.6).

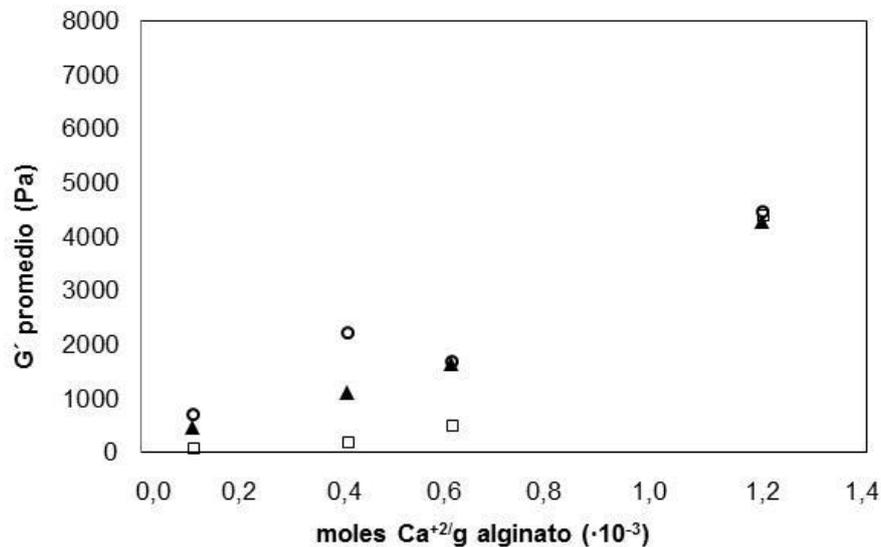


Figura 4.8 Propiedades reológicas de geles de alginato con diferentes sales de calcio y concentraciones preparados por gelificación interna. \circ Hidróxido, \blacktriangle Citrato y \square Carbonato de calcio. $0,1 \cdot 10^{-3}$; $0,4 \cdot 10^{-3}$; $0,6 \cdot 10^{-3}$ y $1,2 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato. Valor medio del módulo de almacenamiento, G' para 1 Hz de frecuencia a 25 °C.

Se observa, en general, cómo al aumentar la concentración del agente entrecruzante (sal de calcio) el valor de G' aumenta, indicando que se ha formado un gel más compacto. Los valores de G' más bajos se obtuvieron al usar el carbonato de calcio y los valores más altos con el hidróxido de calcio. Sin embargo, al utilizar la relación superior de $1,2 \cdot 10^{-3}$ moles de Ca^{+2}/g alginato los valores de G' fueron muy similares para todas las sales de calcio, indicando que las características viscoelásticas de los geles formados para esta concentración son independientes de la fuente de calcio empleada. Por otra parte, cabe destacar que al emplear $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se apreció por observación directa que durante la preparación de la mezcla conformada por solución de alginato/sal de calcio había que gelificaban rápidamente. Una vez transcurridas las 24 horas de reacción, se obtuvo un gel heterogéneo con partes formadas por hilos blancos, zonas de gel transparente y otras aún líquidas. Este factor de heterogeneidad podría explicar la marcada diferencia de los valores de sus módulos de almacenamiento (G') entre las muestras del mismo gel, y por tanto, la diferencia importante observada entre los valores de

las desviaciones estándar resultantes (Figura 4.9) para cada caso de concentración de calcio utilizada en los geles de alginato formados a partir de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ respecto al resto de los geles preparados con las diferentes sales de calcio.

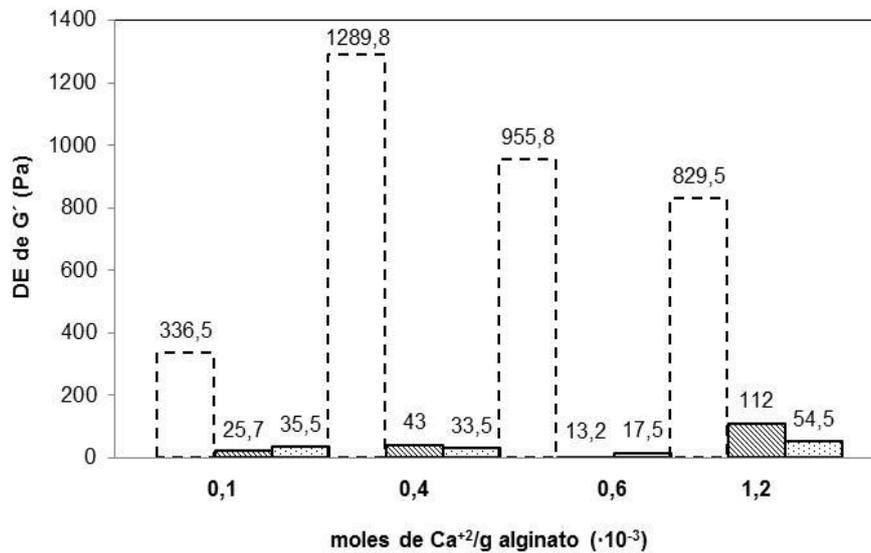


Figura 4.9 Desviaciones estándar de G' en geles de alginato preparados por GI con diferentes sales de calcio y concentraciones. Módulo de almacenamiento, G' ; Desviación estándar, DE. Barras contorno discontinuo, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, barras relleno de tramas a rayas, CaCO_3 y barras relleno de tramas a puntos, Citrato de calcio.

La característica de formación del gel heterogéneo en los geles donde se utilizó $\text{Ca}(\text{OH})_2$ puede atribuirse al producto de solubilidad (K_{ps}) dado por la sal de calcio utilizada, en cuyo caso se tiene que para el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ su producto de solubilidad (K_{ps}) a 25 °C es igual a $5,02 \cdot 10^{-6}$ y, por tanto, mayor respecto al K_{ps} dado a la misma temperatura para el CaCO_3 e igual a $6,0 \cdot 10^{-9}$ (**Generalic, 2013**). En tal sentido, los valores de K_{ps} indican que habría una mayor cantidad de iones calcio solubles disponibles al utilizar como fuente de calcio la sal de hidróxido de calcio, lo que provocaría una reacción prematura y no controlada de gelificación, y con ello, la formación de pequeños trozos de gel antes de iniciar el proceso de gelificación interna para la liberación del calcio insoluble al acidificar el medio. Al no formar un gel homogéneo, esta sal no resulta adecuada.

Respecto a los geles formados con carbonato de calcio se observaron muy transparentes y con presencia de huecos o poros probablemente producto de la liberación de CO_2 durante la reacción de gelificación (**Chan et al., 2002**). Por otro lado, los geles formados a partir de citrato de calcio mostraron la presencia de

puntos blancos al utilizar mayor cantidad de esta sal de calcio, indicando un exceso de la misma, que quedaba precipitada en el seno del gel. Los geles preparados con citrato de calcio parecen ser más compactos que los obtenidos con carbonato de calcio dados los valores de G' mayores para las concentraciones entre $0,1-0,6 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato (Figura 4.8), probablemente debido a la ausencia de poros ya que en este caso no se desprende dióxido de carbono durante el proceso de formación del gel. En todo caso ambos geles muestran una mejor reproducibilidad de los resultados al observarse DE mucho menores y cercanas entre muestras, mientras los valores obtenidos para los geles preparados con hidróxido de calcio fueron muy variables, precisamente debido a que en este caso los geles formados no son homogéneos. Considerando la reproducibilidad de los resultados, los valores de G' y la homogeneidad de los geles formados a partir de citrato de calcio, se realizaron mayores estudios del proceso de formación de este gel por el mecanismo de gelificación interna con citrato como fuente de calcio.

4.2.2.1 Influencia de la concentración de citrato cálcico y la distancia desde la interfase alginato/aceite en el comportamiento reológico de los geles preparados por gelificación interna.

Los geles de alginato formados por el mecanismo de gelificación interna en jeringas se prepararon a partir de solución de alginato 2% p/p y diferentes concentraciones de solución de citrato cálcico (0,02; 0,05; 0,08 y 0,17 M). Una vez homogenizada la mezcla alginato/citrato se colocó en el cilindro y sobre ésta el aceite con el acético disuelto. La muestra se dejó gelificar durante 24 horas a 25 °C, tal como se explica en el apartado 3.4.2.2.a. Los geles cilíndricos formados se cortaron a 2 mm de distancia de la interfase (alginato/aceite), y sucesivamente hasta alcanzar los 20 mm de distancia a la interfase, manteniendo un espesor para cada muestra de 2 mm. El estudio de la influencia de la concentración de calcio en las características del gel en función de la distancia a la interfase se realizó por medio de ensayos reológicos a través de un barrido de frecuencias entre 0,01 y 10 Hz. A continuación, se muestra en la Figura 4.10 el comportamiento del módulo de almacenamiento (G') a frecuencia de 1 Hz de los geles con la distancia a la interfase (alginato/aceite) para diferentes concentraciones de calcio.

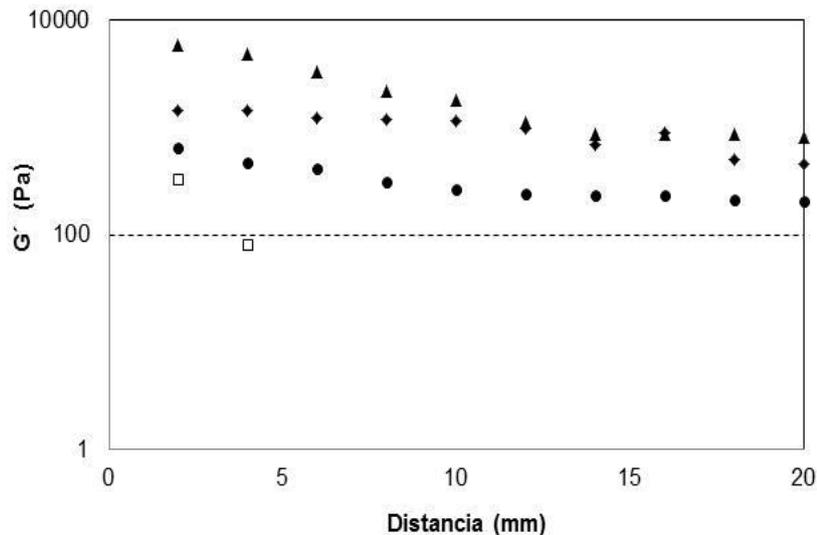


Figura 4.10 Influencia de la concentración de citrato de calcio con la distancia a la interfase alginato/aceite en las propiedades reológicas de sus geles preparados por GI a 25 °C. Geles preparados con □ $0,1 \cdot 10^{-3}$; ● $0,4 \cdot 10^{-3}$; ◆ $0,6 \cdot 10^{-3}$ y ▲ $1,2 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato. Módulo de almacenamiento, G' a frecuencia de 1 Hz.

Puede observarse que los valores de G' disminuyen a medida que nos alejamos de la interfase del gel formado, es decir, de la superficie de contacto solución alginato/sal de calcio con el aceite vegetal acidificado (aceite/acético) para las relaciones de concentración entre $0,4 \cdot 10^{-3}$ y $1,2 \cdot 10^{-3}$ moles de Ca^{+2}/g alginato, mientras que para $0,1 \cdot 10^{-3}$ moles de Ca^{+2}/g alginato sólo fue posible analizar el trozo de gel formado correspondiente a los 4 mm desde la interfase (Figura 4.10). Este aspecto se atribuye a que la cantidad de calcio presente no fue suficiente para garantizar un avance adecuado del proceso de gelificación y, por tanto, para la formación completa del gel de alginato. Considerando que los valores de G' se presentaron muy similares a lo largo del gel para cada muestra estudiada entre las relaciones de concentración utilizadas de $0,4 \cdot 10^{-3}$ y $1,2 \cdot 10^{-3}$ moles de Ca^{+2}/g alginato, se puede decir que a partir de $0,4 \cdot 10^{-3}$ moles de Ca^{+2}/g alginato se tiene suficiente calcio para una gelificación completa, y probablemente con un mayor tiempo de reacción los valores de G' a lo largo del gel aumentarían hasta situarse en valores muy parecidos a los obtenidos cerca de la interfase para cada concentración.

4.2.2.1.a *Influencia de la concentración de acético en las características reológicas de los geles con diferentes concentraciones de calcio.*

En la Figura 4.11 se puede observar la representación del módulo complejo (G^*) a frecuencia de 1 Hz dentro de la zona de viscoelasticidad lineal para los geles preparados por GI. Los geles se formaron a partir de una solución de alginato 2% p/p con diferentes concentraciones de citrato cálcico (0,02; 0,05; 0,08 y 0,17 M) y a la cual adicionó una solución acuosa de ácido acético a diferentes concentraciones ($4,02 \cdot 10^{-3}$, $9,42 \cdot 10^{-5}$ y $6,36 \cdot 10^{-6}$ M) como agente de liberación de los iones calcio presentes en la solución alginato/sal de calcio, tal como se describe en el apartado 3.4.2.2.a. Los valores de G^* mostrados en la Figura 4.11 se presentaron prácticamente independientes de la concentración de ácido, dependiendo fundamentalmente de la cantidad de calcio. Esto pudiera atribuirse a la formación de un complejo sistema acético-citrato que actúa como regulador del pH y, por tanto, el calcio liberado no depende del acético incorporado, y sí de la cantidad de citrato, que determinaría la concentración de calcio que puede ser liberada. A más citrato, más calcio liberado y con esto la formación de un gel más fuerte.

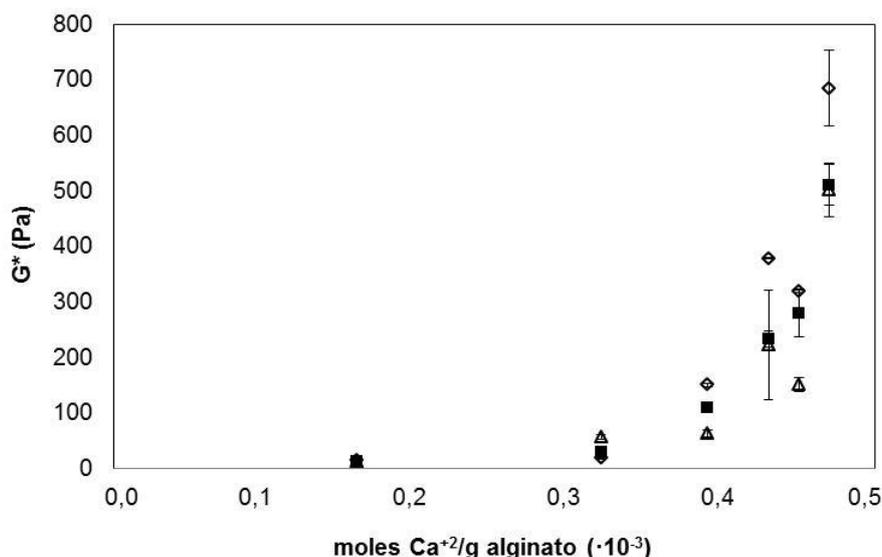


Figura 4.11 Influencia de la concentración del acético en las propiedades reológicas de los geles preparados por GI para diferentes concentraciones de calcio. Soluciones de citrato cálcico a 0,02; 0,05; 0,08 y 0,17 M; Solución acuosa de ácido acético a \diamond $4,02 \cdot 10^{-3}$ M, \triangle $9,42 \cdot 10^{-5}$ M y \blacksquare $6,36 \cdot 10^{-6}$ M; Módulo Complejo, G^* a frecuencia de 1 Hz y 25 °C.

4.2.2.1.b Tiempo de liberación total del calcio.

A fin de determinar el tiempo de liberación total de los iones calcio por el mecanismo de gelificación interna, se prepararon varias soluciones acuosas de citrato cálcico a 0,05 M, a éstas se adicionó la misma cantidad de acético glacial y

una vez homogenizadas se realizaron mediciones para determinar la cantidad de iones calcio presentes en solución para diferentes tiempos cada 2 min hasta completar 30 min. Se puede observar en la Figura 4.12 que al cuantificar la cantidad del ion calcio mediante la utilización de un electrodo selectivo de iones, se detectaron $0,035 \cdot 10^{-7}$ moles de Ca^{+2} disponibles en la solución de citrato a tiempo cero (antes de la adición del acético). A continuación, se pudo apreciar que una vez añadido el agente de liberación de los iones calcio (ácido acético), la liberación de éstos fue muy rápida, pasando con tan solo 2 min de reacción a $3,57 \cdot 10^{-7}$ moles Ca^{+2} , aumentando progresivamente la disponibilidad de los iones calcio en solución hasta los 10 min y, finalmente permaneciendo con un valor prácticamente constante de $4,31 \cdot 10^{-7}$ moles Ca^{+2} desde los 10 min hasta los 30 min de reacción. En tal sentido, puede decirse que la cantidad de calcio disponible en una solución de citrato cálcico de 0,05 M para las condiciones estudiadas y en referencia al valor de los moles de calcio detectados hasta los 30 min, es de apenas un 0,8% de iones calcio sin la adición del acético, la cual puede ser incrementada en un 99,5% con la adición del acético glacial tras 10 min de reacción.

La sal de citrato cálcico no ha sido una fuente de calcio utilizada comúnmente en los estudios de formación de geles de alginato, a diferencia del carbonato de calcio (**Chan et al., 2002, 2006; Choi et al., 2002; Silva et al., 2006; Zhao et al., 2007; Chen y Subidare, 2006, 2007; Funami et al., 2009; Guan et al., 2011**). En el presente estudio, debido a los resultados de viscoelasticidad mostrados y al aspecto visual más homogéneo de los geles observado al utilizar citrato, se puede inferir que la utilización de esta sal de calcio para la formación de geles de alginato por gelificación interna parece ser una fuente alternativa frente a otras empleadas tradicionalmente.

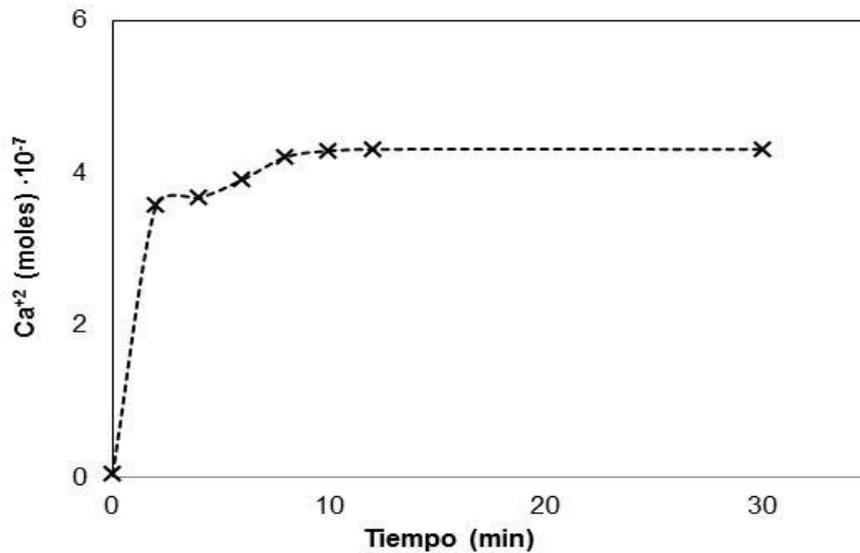


Figura 4.12 Liberación del calcio total en el tiempo. Solución citrato de calcio 0,05 M, 25 °C.

4.2.3 Comparación de las propiedades reológicas entre los geles de alginato obtenidos por gelificación externa y gelificación interna.

Este apartado compara las propiedades viscoelásticas de los geles de alginato cálcico obtenidos a partir de los diferentes mecanismos de gelificación utilizados y la influencia de la concentración de calcio en las características de los mismos. La Figura 4.13 recopila los resultados generados por los ensayos reológicos a frecuencia de 1 Hz en los apartados anteriores para los geles preparados por gelificación externa e interna con diferentes concentraciones de calcio. Se puede observar que, independientemente del mecanismo de gelificación empleado para la formación del gel, las propiedades viscoelásticas de los geles muestran la misma tendencia de variación con la concentración de calcio, al producirse un incremento progresivo de los valores del módulo de almacenamiento (G') con el aumento de la concentración de calcio para todos los casos, lo que indica la formación de un gel cada vez más compacto.

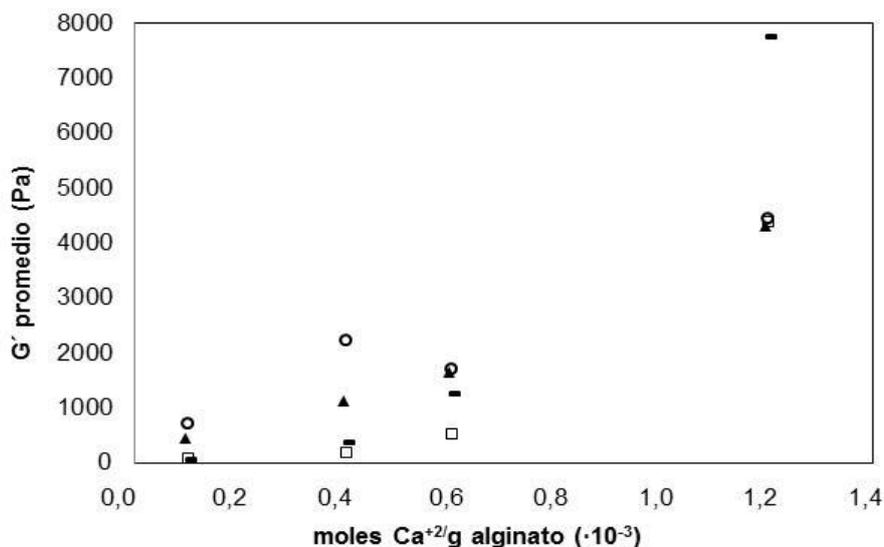


Figura 4.13 Propiedades reológicas de los geles de alginato preparados con diferentes mecanismos de gelificación y concentraciones de calcio a 25 °C. ○ Hidróxido (GI), ▲ Citrato (GI), □ Carbonato (GI) y - Cloruro de calcio (GE). $0,1 \cdot 10^{-3}$; $0,4 \cdot 10^{-3}$; $0,6 \cdot 10^{-3}$ y $1,2 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2} /g alginato. Módulo de almacenamiento, G' a frecuencia de 1 Hz y 25 °C.

Por otra parte, se puede observar que al utilizar las concentraciones entre $0,1$ - $0,6 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2} /g alginato los valores de G' para los geles formados por GE se presentan ligeramente superiores respecto a los geles obtenidos por GI con la sal de CaCO_3 pero con valores de elasticidad menores respecto al resto de los geles preparados por GI a partir de las sales de hidróxido y citrato de calcio. Esta diferencia entre los geles preparados por GE y los geles formados a partir de carbonato cálcico por GI, podría atribuirse a un debilitamiento del gel preparado por GI como consecuencia de la liberación del CO_2 producido durante el proceso de gelificación que provoca la presencia de cavidades en su estructura. Sin embargo, este aspecto se presenta diferente al compararse los resultados de los geles preparados por GE respecto a los geles preparados por GI con las sales de hidróxido y citrato de calcio. En este sentido, los valores de G' muestran que para el rango de concentraciones estudiado entre $0,1 \cdot 10^{-3}$ y $0,6 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2} /g alginato, los geles preparados con citrato cálcico por GI se presentaron más compactos respecto a los obtenidos por GE. Esto podría explicarse debido a la formación de un gel más homogéneo al tenerse la fuente de calcio distribuida en la solución del polímero. En otras palabras, la red del gel formado por GI es más abierta pero más uniforme que la presentada por GE, que presenta una zona externa muy compacta porque tiene mucho calcio y una zona interna mucho menos reticulada porque no todo el calcio ha llegado hasta allí. En el caso de los geles preparados con $\text{Ca}(\text{OH})_2$,

los valores de G' superiores respecto a los obtenidos para los geles por GE, para este mismo rango de concentraciones, puede ser producto de las zonas irregulares observadas en la estructura del gel preparado por GI durante su gelificación, provocando la formación de un gel heterogéneo, probablemente causado por la presencia de una cantidad importante de iones en calcio en la solución de hidróxido cálcico que produjeron una pregelificación de algunas partes del gel, antes de la adición del agente acidificante (acético) para la liberación del calcio insoluble, tal como se explicó en el apartado 4.2.2.

Por otra parte, se puede observar en la Figura 4.13 que al utilizar la mayor concentración de calcio ($1,2 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato) para la preparación de los geles, los valores de G' obtenidos para los geles formados por GI, se presentaron similares entre sí para las diferentes sales de calcio y, por tanto, estos valores de elasticidad parecen indicar que la característica de los geles para esta concentración y condiciones de estudio son independientes del tipo de sal empleada, mientras que el valor de G' para el gel preparado por GE a la misma concentración de calcio se muestra superior (en un 56%) respecto a los valores de G' obtenidos para los geles preparados por GI. Este aspecto que se muestra contrario a los resultados observados para el rango inferior de concentraciones de calcio, podría ser atribuido al tipo de mecanismo de gelificación y método de preparación utilizado para la formación del gel. En este sentido, el gel preparado por GE pudo mostrar un mayor carácter sólido debido a su proceso de formación para esta concentración, en donde inicialmente y debido a una mayor cantidad de iones calcio disponibles en la solución acuosa de CaCl_2 , se pudo formar una superficie de gel en la interfase (alginato/solución CaCl_2) más cerrada que ralentizara la difusión de los iones calcio al interior del polímero como consecuencia de la saturación de ésta con los iones calcio, lo que podría inducir a un mayor entrecruzamiento del gel en la superficie que en el interior del mismo (**Chan et al., 2006**) y, por tanto, provocaría una superficie más compacta de gel y, con ello valores de G' superiores. Mientras que, en los geles preparados por GI la sal de calcio es distribuida en el seno de la solución polimérica, y por tanto, los iones calcio aunque se encuentren también en mayor cantidad dependen para su liberación de la penetración del acético que se difunde desde el aceite hacia el interior de la solución alginato/sal de calcio en donde se produce la formación del gel. Por ello, se forma un gel más homogéneo y compacto en el

interior de su estructura pero de superficie más abierta que proporciona unas características reológicas diferentes.

4.3 Estudio del método de preparación de las microesferas de alginato en emulsión por gelificación interna.

Los estudios previos de preparación de los geles de alginato por gelificación interna a partir de las diferentes fuentes de calcio, permitieron establecer las condiciones iniciales del método de preparación de las microesferas de alginato en emulsión. En tal sentido, se tomaron en cuenta las características reológicas de los geles obtenidos con las sales de carbonato y citrato de calcio ya que los valores de G' presentaron mejor reproducibilidad de los resultados y mostraron un aspecto más homogéneo que los preparados con hidróxido de calcio. Por otra parte, se consideró la utilización del ácido acético glacial sin diluciones debido a su efecto regulador del pH, un tiempo de reacción superior a los 12 min y una concentración de calcio superior al mínimo requerido para garantizar la formación del gel. Con el fin de estudiar el método de preparación de las microesferas en emulsión, se realizaron ensayos preliminares para observar el efecto del tipo de sal de calcio (citrato o carbonato) y su concentración en la distribución de tamaño de partícula y morfología de las microesferas. Una vez seleccionada la fuente de calcio (elegida la sal), se estudia la estabilidad de las emulsiones empleando diferentes tipos de tensioactivos y concentraciones, ya que unas emulsiones más estables facilitarían a priori una formación de microesferas de tamaños más homogéneos. Una vez establecido el mejor sistema se realiza un estudio sistemático del efecto de las variables de composición y preparación en la obtención de microesferas de alginato con el principio activo a encapsular.

4.3.1 Obtención de las microesferas de alginato con diferentes sales de calcio y concentraciones en emulsión por gelificación interna.

Las microesferas de alginato se prepararon a partir de una mezcla de alginato de sodio al 2% p/p y soluciones de carbonato o citrato de calcio a 0,05 M y 0,15 M, como se explica en el apartado 3.4.3.1 según el protocolo propuesto por **Poncelet (2001)** y utilizando un 5% p/p de tensioactivo span 80 respecto al aceite (fase

oleosa). La emulsión W/O se preparó en un minireactor de 100 ml a 250 rpm y 25 °C a través de la adición por goteo manual de la fase dispersa (alginato/sal de calcio) en la fase oleosa (aceite/span 80), una vez formada la emulsión se indujo el proceso de gelificación de las gotas con la adición de otra parte del aceite vegetal con ácido acético disuelto. Se pudo observar que las microesferas obtenidas con la mayor concentración de citrato de calcio (0,15 M) se presentaron amorfas y en su mayoría con tamaños superiores a las 1000 μm (Figura 4.14), probablemente debido a la alta viscosidad de la mezcla de sal/alginato que dificultó una adecuada dispersión en la fase oleosa. Por lo tanto, las microesferas preparadas con 0,15 M de citrato de calcio se descartaron del estudio.

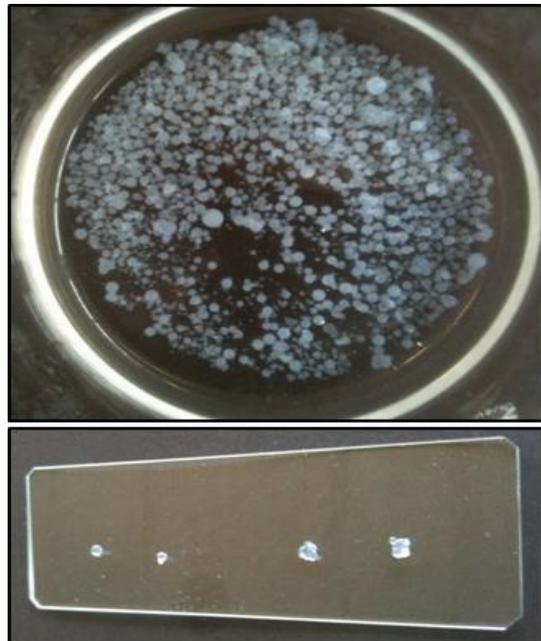


Figura 4.14 Imágenes de las microesferas de alginato preparadas en emulsión por gelificación interna. Solución de alginato al 2% p/p, solución de citrato de calcio a 0,15 M, 25 °C.

La distribución de tamaño de partícula se calculó por frecuencia estadística a partir de la medición de los diámetros de 300 microesferas (Apéndice 9.3) empleando el tipo de frecuencia relativa. De acuerdo con la Figura 4.15, se puede observar que las microesferas de menor tamaño se obtuvieron al utilizar citrato de calcio (0,05 M). Mientras que, las microesferas preparadas con carbonato de calcio se presentaron más grandes y con tamaños muy similares para ambas concentraciones utilizadas. Por otro lado, se ha señalado que las microesferas de hasta 100 micras pueden ser añadidas a una amplia variedad de alimentos sin

cambiar sus propiedades sensoriales (**Augustin, 2003**), y por tanto, sería adecuado los tamaños presentados por las microesferas preparadas con citrato de calcio a 0,05 M para ser añadidas a los alimentos sin que se note su presencia en cuanto a propiedades organolépticas.

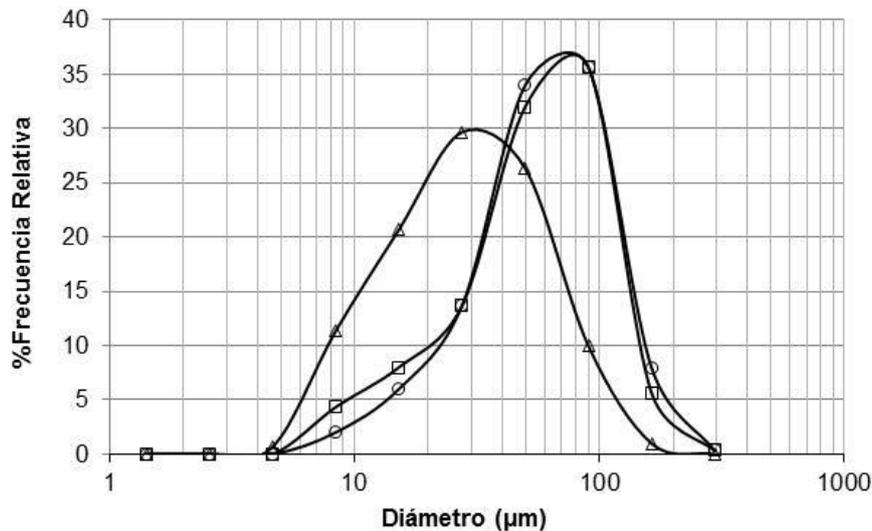


Figura 4.15 Distribución de tamaños de las microesferas de alginato preparadas en emulsión por gelificación interna. Solución de alginato al 2% p/p con diferentes sales de calcio: Δ Citrato 0,05 M; \circ Carbonato 0,05 M y \square Carbonato 0,15 M, 25 °C y 5% p/p tensioactivo S80.

4.3.1.1 Influencia de las diferentes sales de calcio y concentraciones en la distribución de tamaño de las microesferas.

La prueba t de Student se aplicó para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre dos poblaciones mediante el Statgraphics Plus (Version 5.1 Statistical Graphics Corporation, Rockville, USA, 2000). El valor estadístico de la prueba t de Student, $|t_0|$, se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$|t_0| = \frac{|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|}{S_p \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}} \quad (34)$$

Donde \bar{y}_1 y \bar{y}_2 son los valores medios de las poblaciones que deben compararse; S_p es la desviación estándar ponderada de los dos grupos; n_1 y n_2 son los tamaños de las muestras de los grupos.

Al seleccionar un nivel de significación de $\alpha = 0,05$ para un tamaño de muestra de 300 microesferas, se tiene un valor crítico tabulado de $t_{\alpha/2, n_1 + n_2 - 2}$ igual

a 1,960 (Harris, 2003) según la tabla estadística mostrada en el Apéndice 9.3. Los valores estadísticos de $|t_0|$ por debajo de este valor indican que las poblaciones no son significativamente diferentes. Con el fin de poder discernir la existencia o no de una diferencia significativa se analizaron las distribuciones de tamaño de las microesferas para todos los casos por análisis estadístico a través del Statgraphics Plus. En la Figura 4.16 se muestran los ajustes de las distribuciones de las microesferas preparadas con las diferentes sales de calcio y concentraciones a distribuciones de tipo Log-normal.

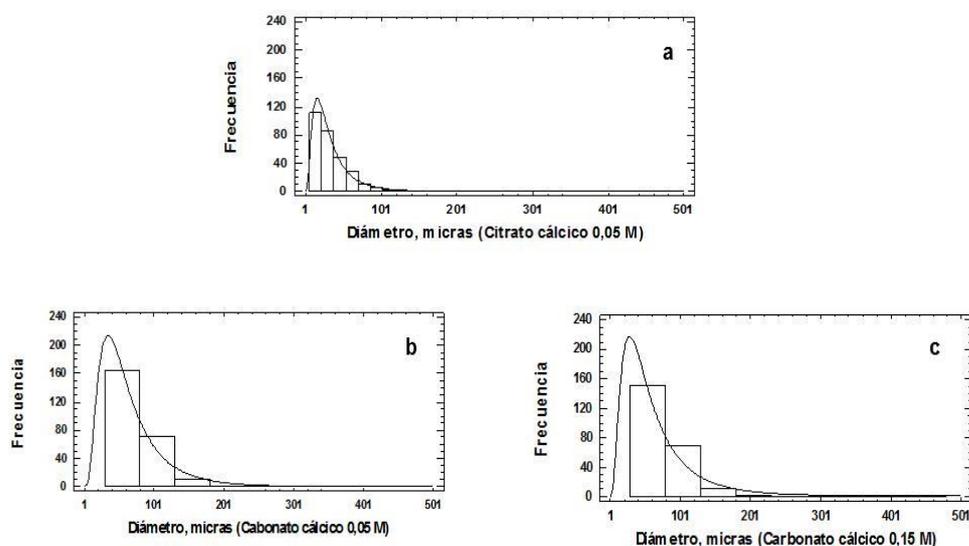


Figura 4.16 Distribución de tamaño de las microesferas preparadas con diferentes sales de calcio y concentraciones. Citrato cálcico a 0,05 M, a; Carbonato cálcico 0,05 M, b y Carbonato cálcico 0,15 M, c para distribuciones de ajuste de tipo Log-normal.

En la Tabla 4.2 se comparan los valores de $|t_0|$ de las poblaciones de $[\text{CaCO}_3] = 0,05$ y $0,15$ M, y las poblaciones de $[\text{CaCO}_3] = 0,05$ M y $[\text{citrato de calcio}] = 0,05$ M. Se puede observar que las poblaciones de las microesferas preparadas con las dos concentraciones de CaCO_3 no tienen una diferencia significativa en sus tamaños, ya que los valores de $|t_0|$ son menores al valor crítico tabulado. Lo cual indica que la distribución del tamaño de las microesferas no se ve afectada por la concentración de calcio dentro del rango de concentración de CaCO_3 utilizado.

Tabla 4.2 Distribución de tamaño de las microesferas para diferentes fuentes y concentraciones de calcio dadas las distribuciones de ajuste de tipo Log-normal.

Distribución de ajuste	Comparación Parámetros	Comparación de la Media para diferentes concentraciones			Comparación de la Media para diferentes sales		
		Carbonato 0,05 M	Carbonato 0,15 M	$ t_0 $	Carbonato 0,05 M	Citrato 0,05 M	$ t_0 $
Distribución Log-normal	Media (μ)	65,66	64,14	0,31	65,66	33,93	6,47
	DE	47,29	53,98		47,49	27,71	

DE: desviación estándar.

Por otro lado, cuando la naturaleza de la sal se cambia de CaCO_3 a citrato de calcio, se observan diferencias estadísticamente significativas, obteniendo tamaños medios sensiblemente menores al utilizar el citrato cálcico. Por ello, se deduce una clara influencia del tipo de fuente calcio sobre la distribución de tamaño de las microesferas.

En estadística descriptiva, un diagrama de caja (Figura 4.17) es una manera conveniente de representar gráficamente los grupos de datos numéricos a través de sus cinco resúmenes de números a fin de analizar su nivel de dispersión, donde: las observaciones más pequeñas se denominan, *menor cuartil*; la mediana, *cuartil medio*; y las observaciones más grandes, *cuartil superior* (Harris, 2003). Los puntos externos se muestran por separado cuando se tienen valores de más de 1,5 veces el rango intercuartil por encima o por debajo de la caja (pequeños cuadrados). Para los puntos externos más distantes, los cuales se encuentran a más de 3,0 veces el rango intercuartil por encima o por debajo de la caja, se utilizan pequeños cuadrados con el signo (+) en su interior. La Figura 4.17 muestra que cuando se utiliza citrato, la mayor parte de las microesferas tienen un diámetro inferior a 100 micras, es decir, el límite para evitar cambios en las propiedades sensoriales de los alimentos a los que se podrían añadir. Además, se tiene una representación más estrecha de la caja, *cuartil medio*, que cuando se utiliza CaCO_3 en su lugar.

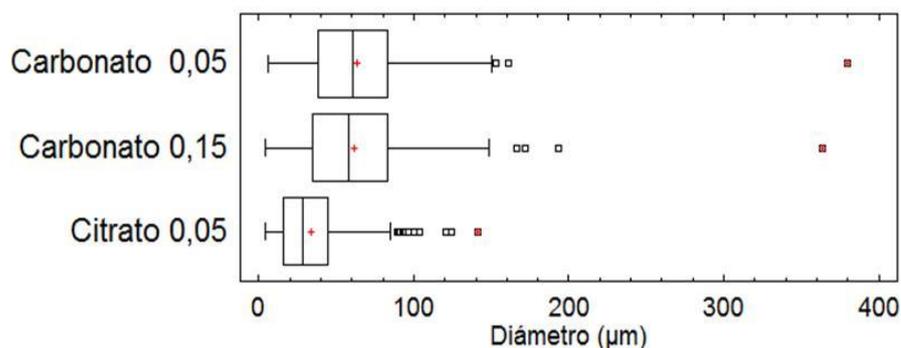


Figura 4.17 Dispersión del tamaño de las microesferas preparadas en emulsión por gelificación interna con diferentes sales de calcio y concentraciones. Solución de alginato 2% p/p, Soluciones de citrato, 0,05 M; carbonato, 0,05 M y carbonato de calcio, 0,15 M, 25 °C.

4.3.1.2 *Influencia de las diferentes sales de calcio y concentraciones en la morfología de las microesferas.*

Tomando en cuenta que la concentración de CaCO_3 no influye sobre la distribución de tamaño de las microesferas en el rango de concentraciones estudiado, y que para el caso de la sal de citrato al utilizar una alta concentración de calcio se producen partículas de gel irregulares y de gran tamaño debido a que la alta viscosidad no permite una emulsificación adecuada, se decide observar la morfología de las microesferas preparadas para una baja concentración de las dos sales de calcio estudiadas, y compararlas entre sí. En la Figura 4.18 se muestran las imágenes realizadas por microscopía óptica a las microesferas de alginato preparadas en emulsión por gelificación interna a partir de soluciones de carbonato y citrato de calcio a 0,05 M. En ambos casos el aspecto es esférico. Sin embargo, las microesferas preparadas con citrato parecen tener una superficie uniforme mientras que las microesferas obtenidas con carbonato tienen un aspecto rugoso.

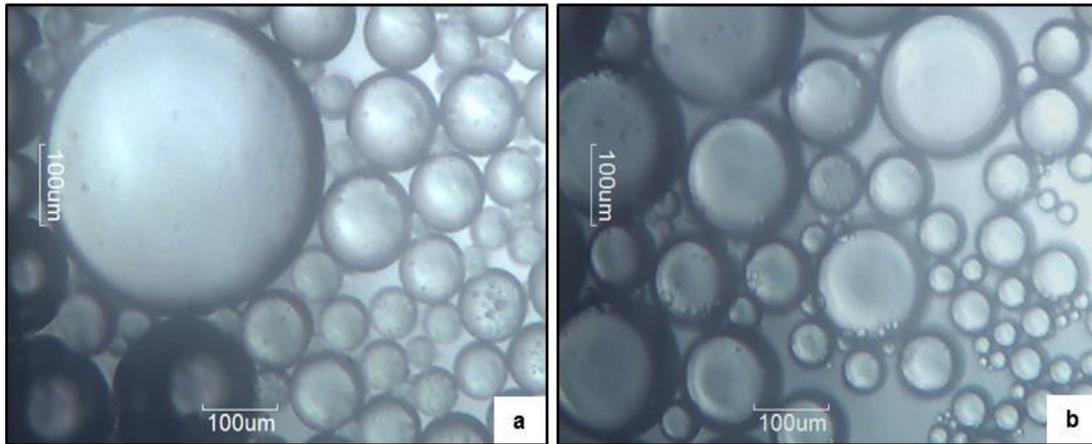


Figura 4.18 Imágenes por microscopía óptica de las microsferas de alginato preparadas en emulsión por gelificación interna. Soluciones de alginato 2% p/p con diferentes sales cálcicas en soluciones acuosas a 0,05 M de Carbonato, a y Citrato de calcio, b.

Esta característica morfológica, se pudo apreciar con más detalle en las imágenes obtenidas por SEM de las microsferas previamente deshidratadas (Figura 4.19). En donde se observa (Figura 4.19a) la presencia de huecos o agujeros en la superficie de las microsferas preparadas con CaCO_3 , lo que podría atribuirse a la liberación de dióxido de carbono durante el proceso de gelificación (Chan *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta la morfología de la superficie de las microsferas obtenidas con CaCO_3 , se infiere que este aspecto podría facilitar la liberación prematura del compuesto activo encapsulado. Por otro lado, se tiene el hecho de que se obtienen esferas más pequeñas cuando se utiliza citrato de calcio, por tanto, esta sal es seleccionada como la fuente de calcio.

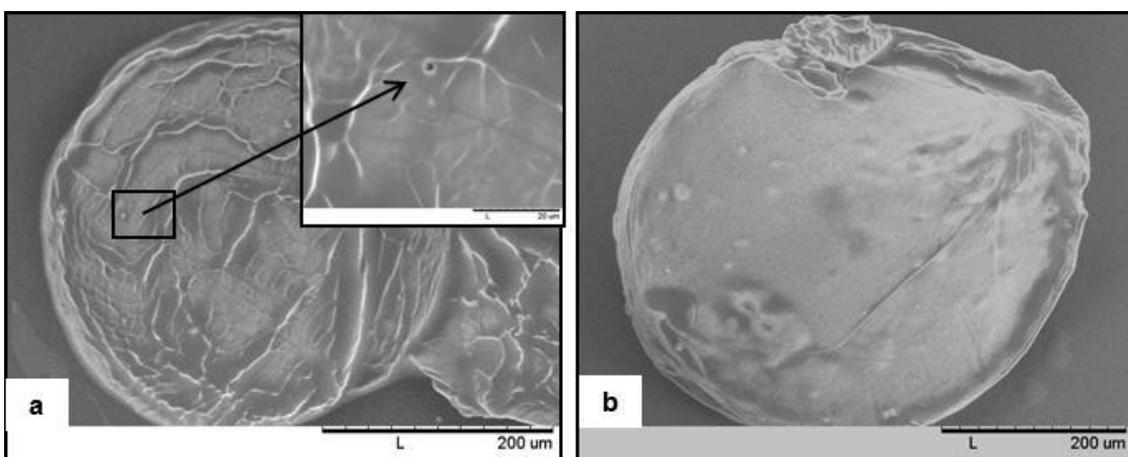


Figura 4.19 Imágenes obtenidas por SEM de microsferas de alginato deshidratadas. Microsferas preparadas en emulsión por GI a partir de una solución de alginato 2% p/p y soluciones acuosas de sales cálcicas a 0,05 M de Carbonato, a y Citrato de calcio, b.

4.3.2 Estudio de estabilidad de las emulsiones para la obtención de las microesferas de alginato.

Con la intención de obtener una emulsión lo más estable posible para la preparación de microesferas de alginato con una distribución de tamaños más uniforme, se prepararon emulsiones W/O con varios tipos de tensioactivos (S80, S85, S80T80 y PGPR) y concentraciones (2%, 5% y 10% p/p) para el estudio de su estabilidad, partiendo de 10 g de emulsión total, con un 20% de fase acuosa o dispersa constituida por solución de alginato 2% p/p y la sal de citrato cálcico a 0,05 M seleccionada como fuente de calcio en los estudios anteriores y, un 80% de fase oleosa, conformada por el aceite vegetal y el tensioactivo, sin el acético para evitar la formación de microesferas a fin de observar la estabilidad de la emulsión con el tiempo (apartado 3.4.3.2).

4.3.2.1 Influencia de la concentración y tipo de tensioactivo en la estabilidad de la emulsión.

La Figura 4.20 muestra la evolución de retrodifusión (Back Scattering, BS), medido con el Turbiscan MA2000, para las emulsiones W/O con 20% p/p de fase dispersa y diferentes concentraciones de varios tensioactivos (S80, S85, S80T80 y PGPR). Se puede observar una disminución del %BS cuando se utilizan tensioactivos de tipo spans o una mezcla de span-tween, lo que indica un fenómeno de desestabilización rápida con el tiempo de estudio de 14 min. En tanto que, al utilizar polirricinoleato de poliglicerol (PGPR), el %BS permanece prácticamente constante para todas las concentraciones estudiadas.

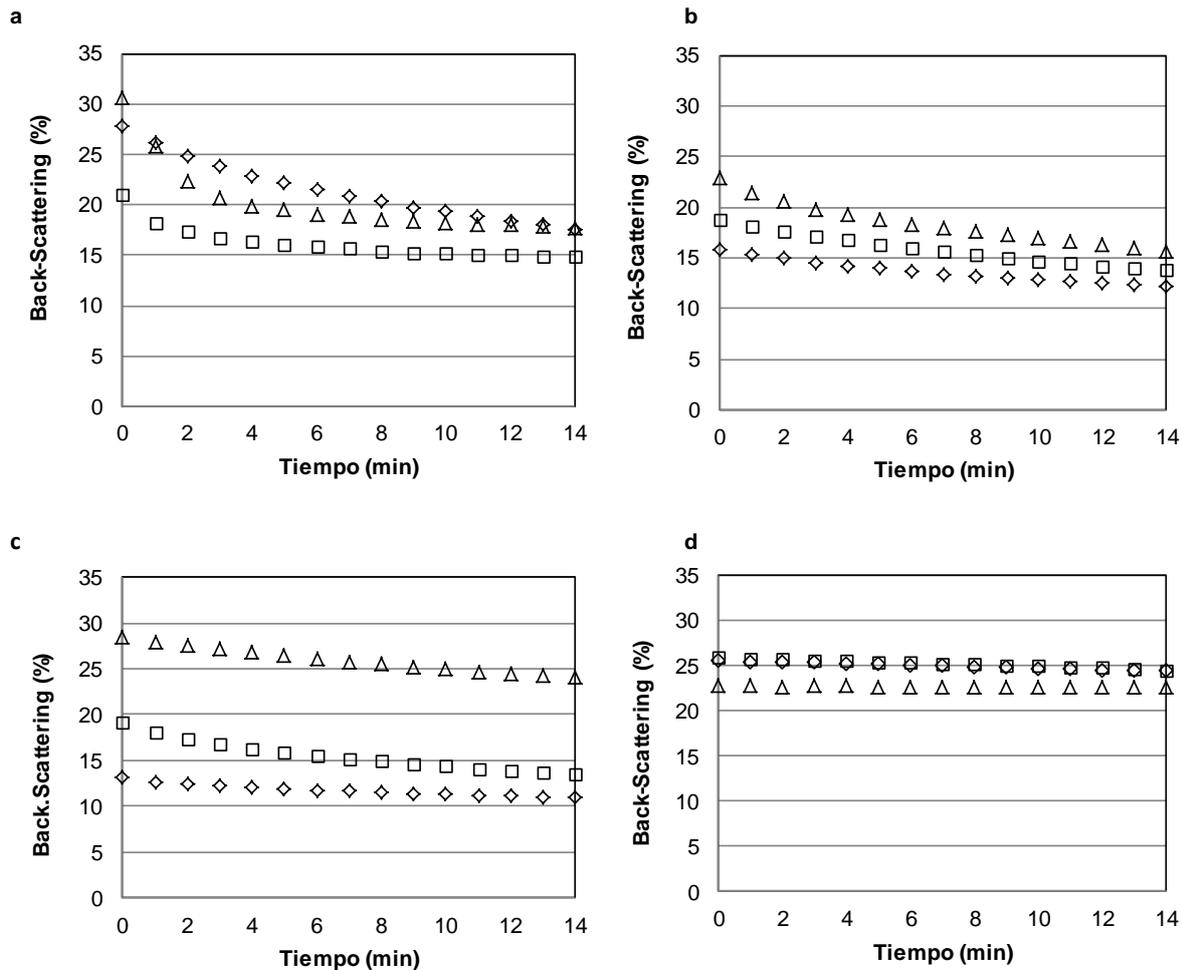


Figura 4.20 Perfil de desestabilización cinética para las emulsiones W/O con 20% de fase acuosa y varias concentraciones de tensioactivo. S80, a; S85, b; S80T80, c y PGPR, d al \diamond 2%, \square 5% y Δ 10% p/p y 25 °C. El %BS representa la media de los valores dados a los 20 - 25 mm y 50 - 55 mm de longitud del tubo.

La disminución con el tiempo de los valores de %BS se podría explicar debido a la coalescencia de las gotas de la fase dispersa (solución alginato/citrato). En tal sentido, a fin de determinar la cinética de desestabilización de las emulsiones, se calculó el porcentaje de coalescencia (%C) a partir de la ecuación (31) cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.3. Cabe destacar, que la mayoría de los trabajos reportan la utilización de tensioactivos tipo spans como el S80 y S85 en la preparación de microesferas de alginato por GI (Poncelet, 2001; Chan *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006; Chen y Subirade, 2006; Zhao *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados en este estudio indican que las emulsiones formadas con ellos son las más inestables, ya que poseen el mayor porcentaje de coalescencia.

Tabla 4.3 Variación del back scattering y coalescencia de las emulsiones W/O con el tiempo.

Tensioactivo	Tiempo=0	Tiempo=14 min	
2% p/p	%BS_{in}	%BS_f	%C
S80	27,80	17,59	36,73
S85	15,84	12,14	23,36
S80T80	13,12	10,90	16,92
PGPR	25,55	24,39	4,54
5% p/p	%BS_{in}	%BS_f	%C
S80	18,73	13,86	26,00
S85	16,77	10,65	36,49
S80T80	19,16	13,47	29,69
PGPR	25,88	24,77	4,29
10% p/p	%BS_{in}	%BS_f	%C
S80	30,58	17,77	41,89
S85	22,94	15,64	31,82
S80T80	28,56	24,01	15,93
PGPR	22,80	22,63	0,75

%BS_{in}: back scattering inicial; %BS_f: back scattering final; Porcentaje de coalescencia, %C. Tensioactivos Span 80, S80; Span 85, S85; Span 80 y Tween 80, S80:T80; Polirricinoleato de poliglicerol, PGPR.

Por otra parte, se manifiesta que a pesar del aumento de la cantidad de tensioactivo al utilizar S80, S85 y S80/T80 no se produce una mejora de la estabilidad de las emulsiones. Los valores más bajos de coalescencia, y con una diferencia importante respecto al resto de los tensioactivos, se obtuvieron al utilizar el PGPR para todas las concentraciones. Este aspecto indica que las emulsiones preparadas con PGPR son más estables. Además, al incrementar el % de PGPR en la fase oleosa se obtuvo un %C menor (4,54 a 0,75 %C), lo que determina la formación de emulsiones más estables para el intervalo de concentraciones estudiado. Este comportamiento también fue observado por **Márquez** y colaboradores (**2010**) en emulsiones W/O con PGPR y un 10% p/p de fase dispersa en aceite de girasol, donde incluso se señaló una mejora de la estabilidad de la emulsión con la presencia de sales de calcio en el sistema. Se conjetura que con emulsiones más inestables probablemente se formarán esferas con una distribución de tamaños muchos más amplia y, por ello, serán menos adecuadas para la preparación de dichas microesferas que las preparadas con PGPR, que son, como se ha visto, mucho más estables, cosa que se comprueba a continuación.

4.3.2.2 *Influencia de la estabilidad de las emulsiones en la distribución de tamaño de las microesferas de alginato.*

Con la finalidad de observar la influencia de los tensioactivos utilizados sobre la distribución de tamaño de las microesferas, se prepararon esferas de alginato en emulsión a partir de una fase dispersa de alginato al 2% p/p y 1 ml de solución de citrato de calcio a 0,05 M en una fase oleosa con un 5% p/p de los tensioactivos estudiados: S80, S85, S80-T80 y PGPR y con la adición de ácido acético glacial previamente disuelto en una parte del aceite vegetal para inducir la gelificación de las gotas (apartado 3.4.3.2.b). Se puede observar en la Figura 4.21 la distribución de tamaño de las microesferas de alginato obtenidas para cada muestra a partir de los diferentes tensioactivos, donde las microesferas de menor tamaño fueron producidas al utilizar el PGPR, seguidas en orden creciente de las microesferas preparadas con S85, S80 y finalizando con el S80-T80.

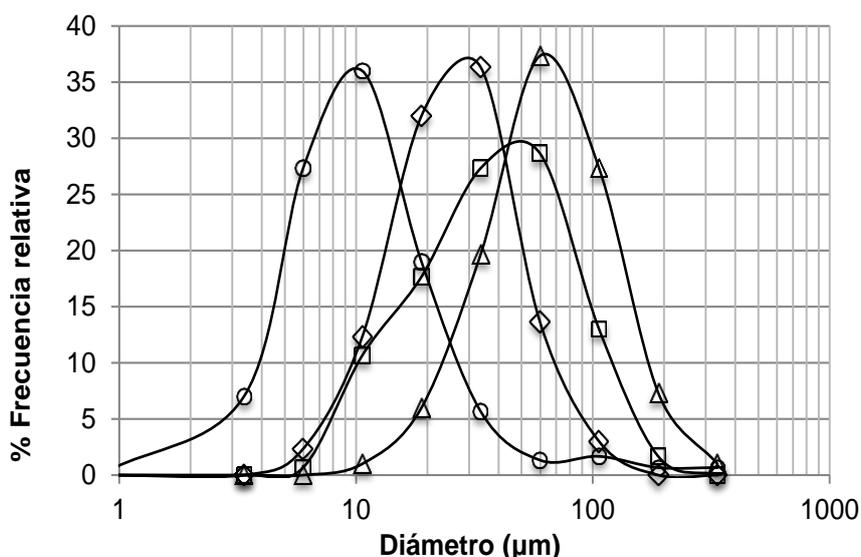


Figura 4.21 Distribución de tamaño de las microesferas preparadas con □ S80, ◇ S85, △ S80T80 y o PGPR al 5% p/p. Polirricinoleato de poliglicerol, PGPR. Solución alginato 2% p/p, Solución de citrato de calcio 0,05 M, 25 °C.

Al estudiar la dispersión del tamaño de las microesferas preparadas en emulsión por GI con los diferentes tensioactivos al 5%p/p a través del diagrama de caja (Figura 4.22), se aprecia la polidispersidad en los tamaños de las microesferas de alginato obtenidas. La representación muestra el cuartil medio menos estrecho al utilizar PGPR, seguido del S85, S80 y finalizando con S80-T80, lo que, coincide con

el orden de la distribución de tamaño de las esferas de menor a mayor tamaño mostrado en la Figura 4.21 (PGPR<S85<S80<S80T80).

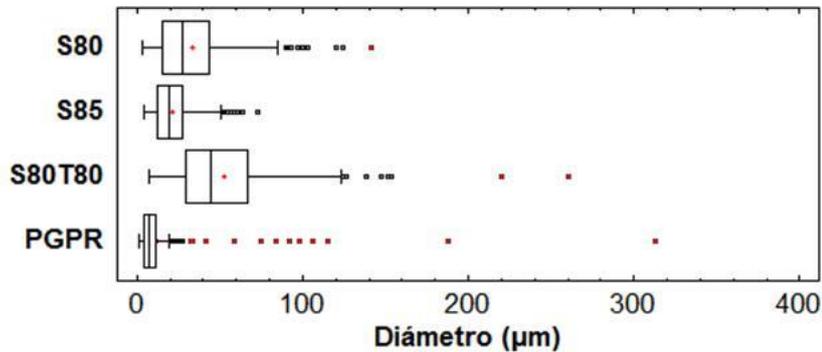


Figura 4.22 Dispersión del tamaño de las microesferas preparadas en emulsión por GI con varios tensioactivos. S80, S85, S80T80 y PGPR a 5% p/p. Polirricinoleato de poliglicerol, PGPR. Solución alginato 2% p/p, Citrato de calcio 0,05 M, 25 °C.

La Figura 4.23 permite apreciar de forma más clara la polidispersidad en el tamaño de las microesferas preparadas en emulsión por GI con diferentes tensioactivos (S80, S85, S80-T80 y PGPR) a través de las imágenes tomadas por microscopía óptica para cada caso estudiado.

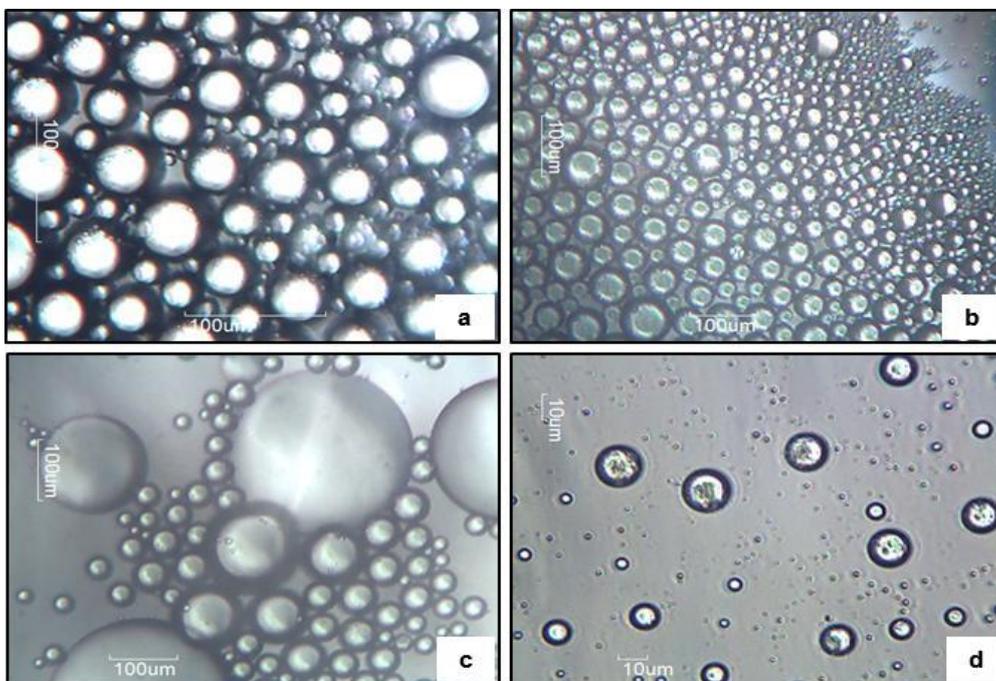


Figura 4.23 Polidispersidad de las microesferas de alginato preparadas en emulsión por GI con diferentes tensioactivos. Solución de alginato 2% p/p, Citrato de calcio a 0,05 M y diferentes tensioactivos al 5% p/p. Imágenes obtenidas por microscopía óptica utilizando varios objetivos. S80, a (10X); S85, b (10X); S80-T80, c (10X) y PGPR, d (40X).

Por otra parte, se pudo observar que también existe una relación directa de este comportamiento referido a la polidispersidad y distribución de tamaño de las microesferas con el grado de coalescencia de las emulsiones previas solamente para el PGPR (Tabla 4.3), siendo el %C menor para el PGPR el cual proporcionó emulsiones más estables y, por tanto, microesferas de alginato con una distribución de tamaño medio menor y menos polidispersas. Mientras que, en el caso de los spans, el grado de coalescencia no mostró seguir un orden específico, tal como se observó para el factor de polidispersidad y tamaño de las esferas, sino que varió según la concentración de tensioactivo utilizado. Este aspecto observado en los spans, probablemente pudiera atribuirse a la existencia de otros mecanismos de desestabilización que afecten a las emulsiones, como la sedimentación, floculación o la maduración de Ostwald. En tal sentido, este aspecto parece indicar que las emulsiones más estables producen, en consecuencia, microesferas menos polidispersas y de menor tamaño, y por tanto conviene usar PGPR para la preparación de las emulsiones W/O previas a la formación de las microesferas. Por ello, el tensioactivo PGPR es seleccionado para la preparación de las microesferas de alginato en emulsión.

4.3.2.3 Determinación de la correlación entre la distribución del tamaño de gota de las emulsiones y la distribución de tamaño de las microesferas de alginato obtenidas.

Como se ha descrito en este apartado, se ha comprobado que el citrato como fuente de calcio a concentraciones de 0,05 M y la utilización del tensioactivo PGPR en las emulsiones para la preparación de las microesferas permiten la producción de microesferas de alginato con superficies más uniformes y tamaños adecuados para ser añadidos en alimentos sin ser percibidos sensorialmente. Parece interesante encontrar por tanto una posible correlación entre la distribución del tamaño de gotas y las microesferas de alginatos obtenidas, utilizando el citrato de calcio y el tensioactivo PGPR, que son los que mejor resultado han dado. Para llevar a cabo el estudio, se emplearon dos de las concentraciones de PGPR utilizadas en el apartado de estabilidad. La Figura 4.24 muestra las distribuciones del tamaño de gota de las emulsiones iniciales y del tamaño de las microesferas obtenidas a partir de las mismas con un 2% y 5% p/p de PGPR. Se puede observar que las

distribuciones de tamaño de gota se desplazan hacia valores más bajos al ocurrir la formación de las microesferas, es decir que hay una contracción de las gotas al producirse la gelificación, manteniendo en todo momento su forma esférica. Este aspecto indica que la contracción producida por el proceso de gelificación se relaciona con el fenómeno de sinéresis, según han estudiado otros autores (**Chan et al., 2011**).

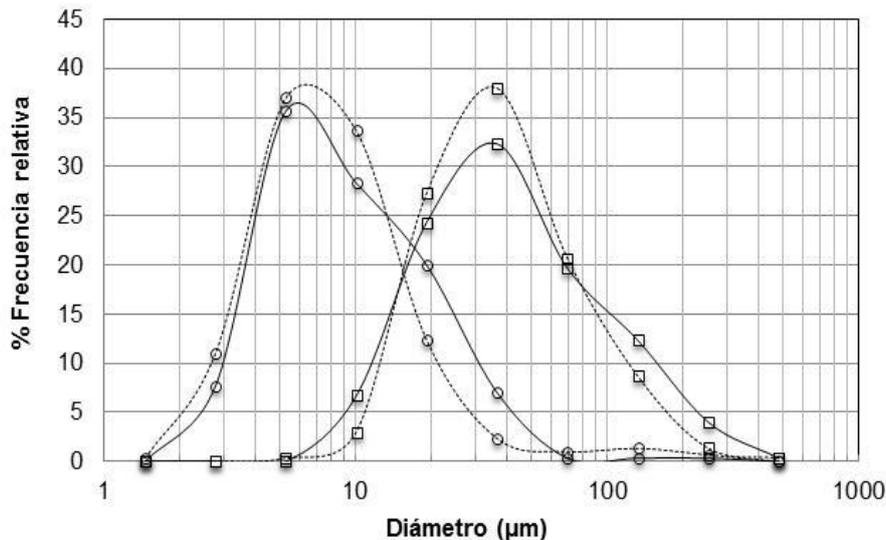


Figura 4.24 Distribución del tamaño de gota de emulsiones iniciales y del tamaño de las microesferas de alginato obtenidas a partir de las mismas con PGPR al 2% — y 5% - - - (p/p) por GI. □ gotas y o microesferas. Solución de alginato 2% p/p, Citrato de calcio a 0,05 M y Polirricinoleato de poliglicerol, PGPR, 25 °C.

La Tabla 4.4 muestra el valor medio del diámetro de las gotas y esferas (D_g y D_e), su desviación estándar (DE) y porcentaje de desviación estándar relativa (%DER). Se puede apreciar que los valores del %DER son del mismo orden de magnitud, por tanto, se infiere que no ocurren cambios significativos en la forma de la distribución de tamaño una vez que se produce la gelificación. A fin de determinar la correlación entre el tamaño de gota y la esfera de alginato formada, se calculó un factor de contracción por gelificación (K_{cg}) expresado según la Ec. 35 (**Chan et al. 2011**), el cual se define para cada muestra a partir del valor medio del diámetro de las gotas formadas en la emulsión y posterior a su gelificación a partir de las diferentes concentraciones de PGPR utilizadas en estos experimentos como:

$$K_{cg} = \frac{D_g - D_e}{D_g} \quad (35)$$

Se puede observar que los valores de K_{cg} señalan una contracción cerca al 80%, como consecuencia del fenómeno de sinéresis característico de los geles, debido a la pérdida de agua durante el proceso de gelificación. Por otra parte, cabe destacar que los diámetros obtenidos muestran valores prácticamente independientes para el rango de concentración de tensioactivo estudiado.

Tabla 4.4 Valores medios de diámetros de gotas y esferas de alginato.

Diámetro (μm)	2% PGPR		5% PGPR	
	D_e	D_g	D_e	D_g
<i>Media (μm)</i>	11,19	54,20	10,14	45,58
<i>DE</i>	8,93	51,97	8,92	35,86
<i>%DER</i>	79,83	95,89	87,89	78,67
<i>K_{cg}</i>	0,79		0,78	

Desviación estándar, DE; Porcentaje desviación estándar relativa, %DER; Factor de contracción por gelificación, K_{cg} ; Diámetro esfera, D_e y diámetro de gota, D_g .

4.3.3 Estudio de las variables de composición y preparación para la obtención de las microesferas en emulsión por gelificación interna con el principio activo a encapsular.

La serie de experimentos realizados anteriormente permitió establecer las condiciones iniciales del estudio de optimización para la preparación de las microesferas de alginato con el principio activo a encapsular en emulsión por gelificación interna. Bajo estas consideraciones, se realizó un diseño experimental completo de tipo factorial 2^k , compuesto y rotatable con tres réplicas en el punto central, como se ha explicado en el apartado 2.5, para estudiar la influencia de las variables de composición con tres factores a dos niveles, y otro diseño para estudiar la influencia de las variables de preparación con dos factores a dos niveles. El dominio experimental correspondiente para cada diseño central compuesto empleado en el presente trabajo se muestra en la Figura 2.14 de ese apartado en el capítulo de introducción.

Para las variables de composición se plantearon tres factores: concentración de tensioactivo, concentración de CaCl_2 con 10% p/p de Tween 20 (T20) en la solución de lavado de las microesferas obtenidas, y % fase dispersa, donde los niveles inferiores y superiores fueron 4-15% p/p de tensioactivo respecto al aceite,

concentración de CaCl_2 de 0,03-0,1 M en 100 ml de solución de lavado añadida a las microesferas para facilitar su separación y 15-40% p/p para la fase dispersa.

Para las variables de preparación se plantearon dos factores definidos como velocidad de agitación durante el proceso de gelificación y velocidad de centrifugación para la separación de las microesferas una vez formadas. Los máximos y mínimos se plantearon entre 250-600 rpm y 2000-3800 rpm, respectivamente. La influencia de las variables de composición y preparación se analizaron sobre las variables de salida especificadas como: diámetro medio del volumen equivalente, $D(4,3)$, cuyo cálculo se describe en el apartado 3.4.3.3.b, así como el factor de polidispersidad (SPAN) al utilizar el análisis del tamaño de las partículas por difracción láser, y el porcentaje de retención (%Ret) del principio activo referido al contenido de polifenoles totales encapsulados en las microesferas y analizado por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. La cantidad de ensayos y combinaciones de las variables para la preparación de las microesferas para ambos diseños se determinó con el software Statgraphics Plus 5.1.

El protocolo de preparación se llevó a cabo siguiendo las condiciones planteadas para cada ensayo y diseño. Como ejemplo se describe el procedimiento estándar de preparación de las microesferas en emulsión por GI para las condiciones del punto central (apartado 3.4.3.3) donde se partió de una fase dispersa (27,5%) de solución de alginato 2%/cacao 1% p/p y un 6,2% p/p de citrato cálcico a 0,05 M (respecto a la fase dispersa), una vez homogenizada se goteó manualmente en la fase oleosa constituida por aceite y 9,5% p/p de PGPR. La emulsión W/O se preparó bajo agitación constante a 250 rpm y 25 °C durante 15 min en un minireactor, para la gelificación de las gotas se incorporó el resto de aceite con el acético disuelto. Las microesferas pregelificadas se separaron de la fase oleosa adicionando 100 ml de solución acuosa a 0,07 M $\text{CaCl}_2/\text{T20}$ bajo agitación moderada durante 15 min a fin de continuar el proceso de gelificación y favorecer la partición de las fases y, finalmente, éstas se separaron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min, descartando la fase oleosa y reservando la fase acuosa para la cuantificación de los polifenoles presentes en la solución de separación. Las microesferas alginato/cacao se redispersaron en agua para su análisis de distribución de tamaño por difracción laser.

Por otra parte, el extracto de cacao utilizado como principio activo a encapsular se caracterizó a fin de determinar la calidad de éste y como valor referencial frente a otros compuestos polifenólicos posibles a encapsular.

4.3.3.1 Caracterización del extracto de cacao como principio activo a encapsular.

En este apartado se caracteriza el extracto de cacao empleado como principio activo a encapsular con la finalidad de determinar su composición a objeto de tener un valor referencial que permita conocer la calidad del extracto.

4.3.3.1.a Cuantificación de los polifenoles totales mediante análisis espectrofotométrico para el extracto de cacao utilizado como principio activo a encapsular.

Para determinar el contenido total de fenoles en el extracto de cacao empleado como principio activo, y sucesivamente en las diferentes muestras de los encapsulados, se partió de la construcción de una recta de calibrado preparada a partir de patrones de ácido gálico. Para ello, se utilizó el análisis espectrofotométrico con el método de Folin-Ciocalteu, explicado en el apartado 3.4.3.3.a, que permite cuantificar los fenoles totales en equivalentes de ácido gálico (EAG) con la medición de la absorbancia de una solución de concentración desconocida a través de una recta de calibrado con un patrón fenólico de referencia (Apéndice 9.4-Figura 9.8). La ecuación de ajuste del calibrado se utilizó tanto para la caracterización del extracto de cacao como para el cálculo de los fenoles totales encapsulados (extracto de cacao) a partir de las diferentes técnicas de gelificación y métodos de encapsulación utilizados en este estudio. En tal sentido, al analizar el extracto se obtuvo como resultado por triplicado de una solución preparada con 250 mg de extracto de cacao seco en 50 ml de agua miliQ, una concentración de fenoles totales igual a $370,79 \pm 2,16$ mg EAG/g extracto cacao seco. Se puede inferir que dada la concentración calculada de fenoles para el extracto, éste posee un alto contenido de polifenoles totales, ya que al compararse con otros extractos y polvos de cacao estudiados en diferentes trabajos su valor se encuentra por encima de los reportados (**Hii et al., 2009; Ortega et al., 2010; Schinella et al., 2010; Calatayud et al., 2013**).

4.3.3.1.b *Cuantificación de los compuestos fenólicos principales en el extracto de cacao mediante técnica cromatográfica.*

En la Tabla 4.5 se muestran los resultados obtenidos al analizar por UPLC una solución madre de 250 mg de extracto de cacao en 50 ml de una solución etanol-agua debidamente sonicada y diluida 1:5 (apartado 3.4.3.3.a), tomando como patrones de referencia la (+)-Catequina y (-)-Epicatequina y, de acuerdo a los cálculos necesarios a partir de los espectros obtenidos (Apéndice 9.4-Figuras 9.9 y 9.10). Estos compuestos fenólicos utilizados como patrones, se encuentran entre los mayoritarios constituyentes del extracto de cacao. Los valores de concentración (Tabla 4.5), indican que el extracto de cacao contiene éstos compuestos polifenólicos en mayores proporciones frente a otros datos de composición reportados por diferentes autores (**Hii et al., 2009; Ortega et al., 2010; Schinella et al, 2010; Calatayud et al., 2013**). Sin embargo, cabe resaltar que su cuantificación tiene como finalidad la obtención de un valor referencial que permita conocer la calidad del extracto utilizado como principio activo a encapsular, teniendo en consideración según señala **Schinella** y colaboradores (**2010**) que estas características de composición pueden variar con las condiciones del análisis aplicado.

Tabla 4.5 Composición fenólica del extracto de cacao utilizado como principio activo.

Muestra	Extracto de Cacao
Fenoles Totales (EAG) ^a	370,79 ± 2,16
(+)-Catequina ^b	13,73 ± 0,02
(-)-Epicatequina ^b	77,06 ± 0,20

a. Datos expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG)

b. Datos obtenidos mediante UPLC (mg fenol/g extracto seco)

4.3.3.2 *Influencia de las variables de composición diseño 2³ factorial compuesto.*

La Tabla 4.6 muestra los experimentos que se llevaron a cabo con el fin de estudiar la influencia de las variables de composición (concentración de PGPR, concentración de CaCl₂ en la solución de lavado y % fase dispersa) en las propiedades de las microesferas obtenidas con el extracto de cacao.

Tabla 4.6 Diseño experimental 2³ factorial compuesto.

Tensioactivo (%)	Fase Dispersa (%)	CaCl ₂ (M)	D(4,3) (µm)	SPAN	%Ret
9,5*	27,5	0,07	273,95±9,36	5,59±0,92	59,51±4,19
9,5	6,48	0,07	448,87±67,57	7,86±1,08	31,26±0,68
0,25	27,5	0,07	486,86±16,28	1,89±0,04	62,51±0,84
9,5	48,5	0,07	101,93±85,17	3,35±5,42	85,24±0,40
9,5	27,5	0,12	827,11±152,65	1,69±0,18	81,05±0,06
9,5*	27,5	0,07	157,06±30,84	2,42±0,74	61,97±3,15
15,0	40,0	0,03	59,20±13,62	6,29±7,52	89,61±0,25
4,0	15,0	0,10	301,71±56,56	3,55±0,49	48,51±2,39
15,0	15,0	0,10	241,13±108,15	4,21±0,94	30,25±4,78
9,5	27,5	0,01	171,87±13,76	1,42±0,16	62,32±0,60
4,0	40,0	0,10	152,62±32,76	2,51±0,47	82,05±0,22
4,0	15,0	0,03	332,38±43,71	3,76±1,02	46,37±1,15
9,5*	27,5	0,07	236,81±31,78	2,26±0,64	75,13±0,19
18,7	27,5	0,07	113,23±44,89	3,33±2,75	75,86±2,72
15,0	15,0	0,03	187,94±62,36	4,07±1,06	39,51±1,03
4,0	40,0	0,03	171,74±25,73	4,80±1,02	80,80±0,67
15,0	40,0	0,10	101,72±67,47	5,02±5,77	76,53±3,87

*Réplica: Puntos centrales. %Ret.: porcentaje retención fenoles totales (cacao) en microesferas

El análisis estadístico mediante ANOVA indica que las variables de composición no tienen influencia significativa sobre el diámetro medio equivalente D(4,3) de las microesferas ni el factor de polidispersidad o SPAN de la muestra de microesferas, dentro del rango experimental estudiado. Sin embargo, se observa un valor de $p < 0,05$ como efecto de la cantidad de la fase dispersa sobre el porcentaje de retención de los polifenoles (%Ret) del extracto de cacao en las microesferas de alginato obtenidas (Figura 4.25c), indicando una influencia significativa del % fase dispersa en el %Ret. Cabe resaltar que los valores dados por el punto central y sus réplicas en las variables de salida y que describen las propiedades de las microesferas, evidencian diferencias importantes entre ellos, lo que indica la poca reproducibilidad de los resultados, y por tanto, sugiere la existencia de variables no controladas en el proceso.

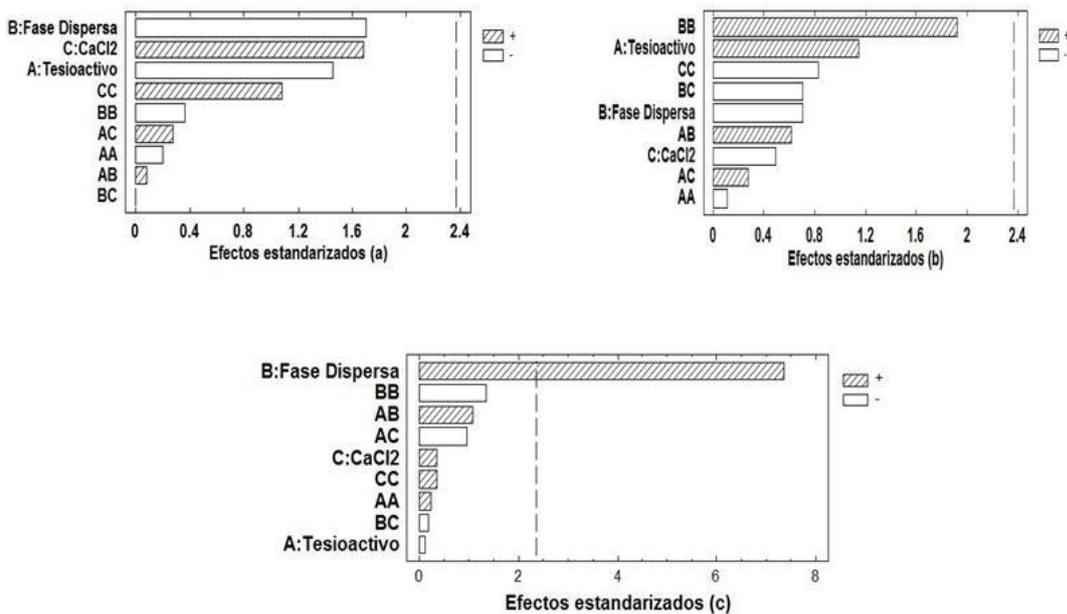


Figura 4.25 Gráficos de Pareto para el diseño experimental de las microesferas preparadas en emulsión por GI con extracto de cacao para las variables de composición. Variables de salida: Diámetro medio equivalente, a; Factor de polidispersidad o Span, b y Porcentaje de retención de fenoles totales o %Ret, c.

4.3.3.3 Influencia de las variables de preparación diseño 2² factorial compuesto.

El diseño obtenido para las variables de preparación se realizó para estudiar la influencia de las variables velocidad de agitación (250-600 rpm) en la emulsión durante la gelificación y velocidad de centrifugación (2000-3800 rpm) para la separación de las microesferas obtenidas en emulsión, a fin de determinar su efecto en las propiedades de éstas, definiendo las variables de salida como tamaño y polidispersidad de las microesferas, así como el %Ret del extracto de cacao como principio activo a encapsular. Para llevar a cabo el estudio de la influencia de las variables de preparación, se tomaron las condiciones de composición del punto central indicadas en el diseño 2³, 27,5% p/p fase dispersa, 9,5% p/p PGPR respecto al aceite y solución acuosa de CaCl₂ a 0,07 M con 10% p/p T20 para la separación de las microesferas obtenidas en emulsión. En este sentido, se prepararon las microesferas en emulsión por GI con el mismo protocolo descrito anteriormente (apartado 4.3.3) como estándar para el punto central pero utilizando las velocidades de agitación para el proceso de gelificación y velocidades de centrifugación para la

separación de las microesferas planteadas para cada ensayo del diseño 2². Los resultados se muestran en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7 Diseño experimental 2² factorial compuesto.

V.A (rpm)	Cent. (rpm)	D (4,3) μm	SPAN	%Ret
425*	2900	90,02 \pm 17,63	1,81 \pm 0,098	60,02 \pm 0,76
600	3800	73,02 \pm 0,96	1,59 \pm 0,007	22,96 \pm 0,35
675	2900	59,66 \pm 9,24	1,65 \pm 0,059	72,84 \pm 0,09
425*	2900	75,27 \pm 4,74	1,63 \pm 0,031	73,71 \pm 1,37
250	2000	157,23 \pm 11,67	2,05 \pm 0,113	74,53 \pm 0,63
425*	2900	80,98 \pm 20,51	1,65 \pm 0,106	82,78 \pm 0,16
425	1630	79,16 \pm 8,81	1,63 \pm 0,067	68,66 \pm 0,56
250	3800	127,13 \pm 7,23	1,89 \pm 0,04	75,58 \pm 0,07
175	2900	148,06 \pm 5,89	2,28 \pm 0,038	76,82 \pm 0,01
600	2000	84,01 \pm 12,26	1,53 \pm 0,074	26,07 \pm 0,73
425	4170	61,3 \pm 0,23	1,75 \pm 0,009	69,56 \pm 2,02

*Réplica: Puntos centrales. %Ret.: porcentaje retención fenoles totales (cacao) en microesferas. Cent.: centrifugación. V.A.: velocidad de agitación

Al aplicar el ANOVA, se obtuvieron valores de $p < 0,05$ para el factor velocidad de agitación sobre las variables respuestas concernientes al diámetro medio de las microesferas y su factor de polidispersidad (SPAN), indicando con ello la existencia de una influencia estadísticamente significativa de la velocidad de agitación sobre el D(4,3) y el SPAN de las microesferas con extracto de cacao. Por el contrario, el factor velocidad de centrifugación no mostró influencia significativa en ninguna de las variables de salidas para las condiciones planteadas en este estudio (Figura 4.26).

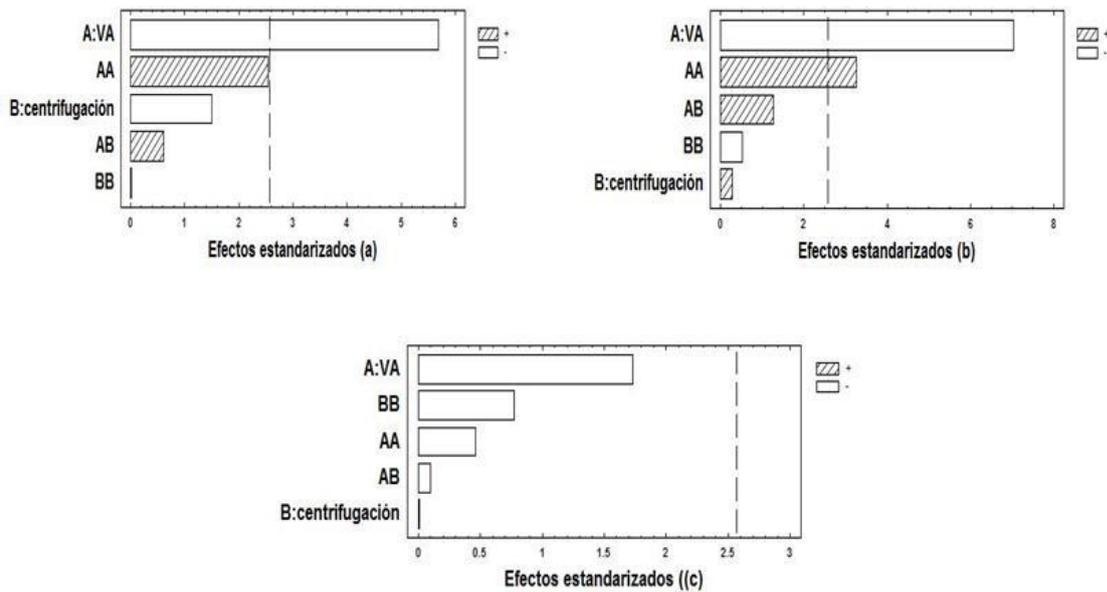


Figura 4.26 Gráficos de Pareto para el diseño experimental de las microesferas preparadas en emulsión con extracto de cacao para las variables de preparación. Variables de salida: Diámetro medio equivalente, a; Factor de polidispersidad o Span, b y Porcentaje de retención de fenoles totales o %Ret, c.

Particularmente, el efecto del factor velocidad de agitación sobre el diámetro medio se puede interpretar como un resultado esperado, ya que un incremento de la velocidad tiende a inducir el rompimiento de las gotas de la fase dispersa en la fase oleosa en gotas más pequeñas, lo que provocaría la formación de microesferas menores. En la Figura 4.27 se muestra cómo la distribución de tamaños de las esferas se desplaza a valores de diámetros menores a medida que aumenta la velocidad de agitación utilizada durante el proceso de preparación de las microesferas con extracto de cacao en emulsión por gelificación interna.

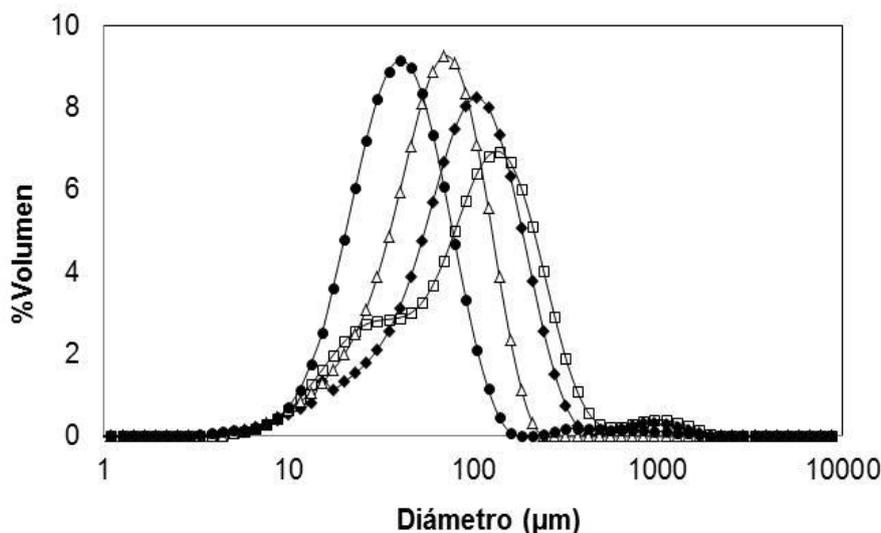


Figura 4.27 Efecto de la velocidad de agitación sobre el diámetro medio de las microesferas con extracto de cacao preparadas en emulsión por GI. □ 175 rpm; ◆ 250 rpm; △ 600 rpm y ● 675 rpm.

Considerando los valores de las variables de salida dados por los puntos centrales en el diseño 2^2 (Tabla 4.7), se pudo observar que los resultados en este caso también son poco reproducibles. Este aspecto manifiesta la existencia de variables no controladas en el sistema de preparación de las microesferas. Como consecuencia, se decide profundizar en el estudio de la factor fase dispersa del sistema (solución de alginato al 2% p/p con extracto de cacao 1% p/p) tomando en cuenta que en los apartados anteriores se estudió la fuente de calcio y su concentración, así como el tipo y concentración de tensioactivo, y se intentó detectar alguna variable no controlada en la misma. Para ello se llevó a cabo el estudio de viscosidad que se muestra en el apartado siguiente.

4.3.3.4 *Influencia del pH en la viscosidad de la fase dispersa.*

Se estudió la influencia del pH en la fase dispersa utilizada para la preparación de las microesferas en emulsión bajo las condiciones de composición planteadas para el punto central del diseño 2^3 compuesto. En este sentido, se realizó un análisis de viscosidad estacionaria en función del gradiente de velocidad a temperatura controlada de 25 °C a la fase dispersa (27,5% p/p) preparada a partir de una solución de alginato sódico 2% p/p con 1% p/p de extracto de cacao y 6,2% p/p de suspensión de citrato de calcio a 0,05 M respecto a la fase dispersa, a dos pH distintos, ácido y neutro, y dos tiempos. Se puede observar en la Figura 4.28 que la

viscosidad de la fase dispersa utilizada para el diseño experimental propuesto aumenta con el tiempo, por ejemplo en un 63% desde los 6 a los 32 min para un gradiente de velocidad de 1 (s^{-1}), cuando el pH no se controla y por tanto permanece ácido por efecto de la acidez del cacao, este efecto podría atribuirse a las interacciones del sistema alginato/cacao/citrato que producen una pregelificación del alginato como consecuencia de un ligero aporte de acidez por parte del extracto de cacao que provoca la liberación de iones calcio, efecto no deseado ya que no está controlado, lo que produce una pregelificación antes de la emulsificación (Apéndice 9.5). Ésta podría ser una de las variables no controladas del diseño experimental, que hacían que los resultados fueran poco reproducibles. De la misma forma, se realizó el estudio de viscosidad para la fase dispersa neutralizada (pH entre 6,5 y 6,8 al ser neutralizado con unas gotas de NaOH 6 M). En este caso los valores de viscosidad mostraron poca variación con el tiempo (Figura 4.28), indicando que al controlar el pH se ha podido evitar la pregelificación indeseada.

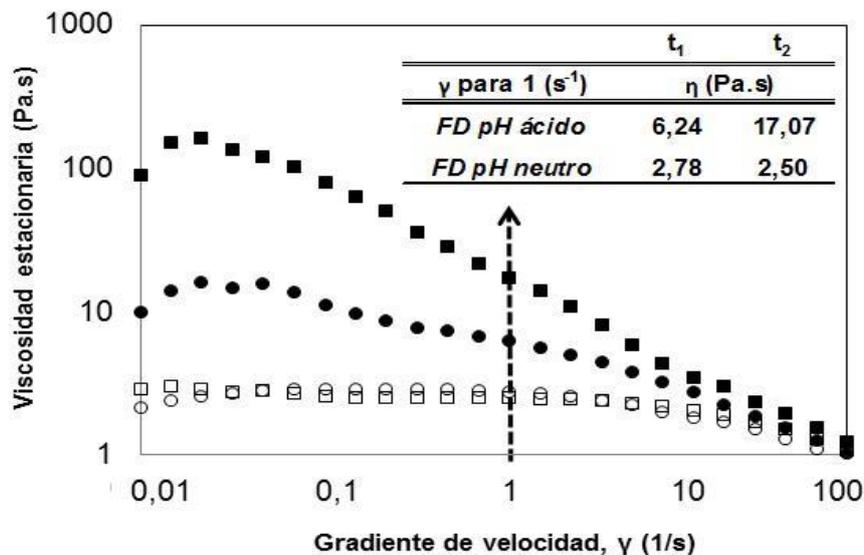


Figura 4.28 Comportamiento de la viscosidad estacionaria de la fase dispersa frente al gradiente de velocidad con el tiempo. FD: fase dispersa; pH ácido, 5,0; pH neutro, 6,5-6,8; t_1 , tiempo 6 min; t_2 , tiempo 32 min; gradiente de velocidad, γ ; viscosidad estacionaria, η ; o FD neutra a t_1 ; □ FD neutra a t_2 ; ● FD ácida a t_1 y ■ FD ácida a t_2 a 25 °C.

Por tanto, se decidió realizar un nuevo diseño experimental, en este caso de tipo fraccionado para limitar el número de experimentos, pero neutralizando la fase dispersa para evitar la pregelificación, y comprobar así si se obtenían resultados más reproducibles.

4.3.3.5 *Diseño experimental fraccionado a pH neutro.*

4.3.3.5.a *Diseño fraccionado con extracto de cacao.*

Las microesferas de alginato con extracto de cacao encapsulado se prepararon según el protocolo explicado en el apartado 3.4.3.3 para el estudio de las variables de composición del diseño experimental completo pero con la fase dispersa a pH neutro y un menor número de experimentos. En este sentido, se realizó un diseño experimental fraccionado 2^{3-1} para estudiar el efecto de los factores a dos niveles de la cantidad de PGPR (4-15% p/p), % fase dispersa a pH neutro (15-40% p/p) y la concentración de CaCl_2 (0,03-0,1 M) en la solución con 10% p/p de T20 para el lavado y separación de las microesferas sobre las variables respuesta o de salida, especificadas como: diámetro medio de las microesferas, $D(4,3)$, factor de polidispersidad (SPAN) y el porcentaje de retención de los polifenoles en las microesferas (%Ret). Las microesferas con el extracto de cacao a encapsular se prepararon en emulsión por GI un minireactor a 250rpm y 25 °C. Una vez formadas las microesferas y particionadas a la fase acuosa con la adición de 100 ml solución CaCl_2 /T20 bajo agitación moderada durante 15 min se separaron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min, descartando la fase oleosa y reservando la fase acuosa para la cuantificación de los polifenoles presentes en la solución de separación. Las microesferas alginato/cacao se redispersaron en agua para su análisis de distribución de tamaño y polidispersidad por difracción laser. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8 Diseño fraccionado 2^{3-1} factorial para la fase dispersa con extracto de cacao a pH neutro.

Tensioactivo (%)	Fase dispersa (%)	CaCl ₂ (M)	D (4,3) μm	Span	%Ret
9,5*	27,5	0,07	85,48 \pm 0,41	1,81 \pm 0,01	58,97 \pm 0,05
9,5*	27,5	0,07	87,35 \pm 1,86	1,86 \pm 0,03	59,93 \pm 0,07
4,0	40,0	0,03	136,34 \pm 10,0	1,77 \pm 0,04	78,45 \pm 0,01
15,0	40,0	0,10	39,60 \pm 2,43	1,88 \pm 0,02	80,92 \pm 0,30
15,0	15,0	0,03	143,93 \pm 9,19	2,37 \pm 0,10	47,76 \pm 0,02
4,0	15,0	0,10	321,14 \pm 23,4	3,90 \pm 0,19	53,61 \pm 0,03

*Réplica: Puntos centrales. %Ret.: porcentaje retención fenoles totales (cacao) en microesferas

Al utilizar la fase dispersa a pH neutro controlado se pudo observar reproducibilidad de los resultados dado la cercanía entre los valores de las variables de salida obtenidos en el diseño para el punto central y su réplica (Tabla 4.8), por lo que pueden considerarse éstos más fiables. Por otra parte, el ANOVA mostró una influencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) sólo para el factor % fase dispersa sobre el porcentaje de retención de los polifenoles en las microesferas obtenidas, tal como muestra la Figura 4.29c a través del gráfico de Pareto.

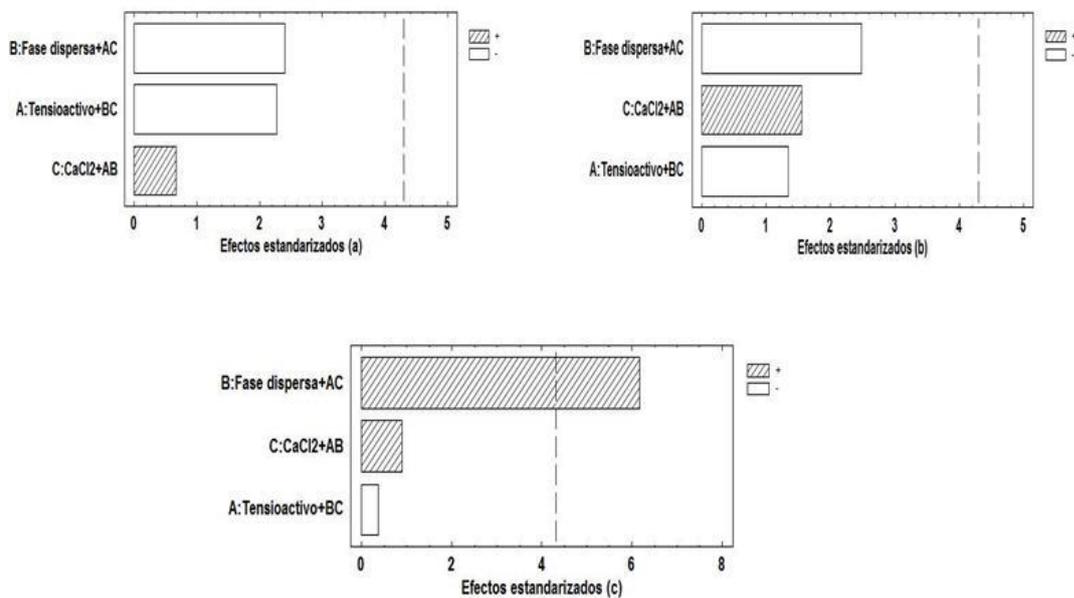


Figura 4.29 Gráficos de Pareto para el diseño fraccionado con la fase dispersa a pH neutro de las microesferas preparadas en emulsión por GI para estudiar la influencia de las variables de composición en las variables de salida: Diámetro medio equivalente, a; Factor de polidispersidad o SPAN, b y Porcentaje de retención de fenoles totales o %Ret, c.

Los gráficos de Pareto permiten interpretar las posibles combinaciones e interacciones entre las variables de entrada en un sistema y su efecto sobre las

variables de salida. Las franjas de tramas a rayas indican una dependencia positiva (+) de la variable de entrada frente a la variable de salida, de manera que al aumentar ésta aumenta la variable de estudio. Las franjas en blanco (-) significan que una disminución de esa variable provoca un aumento de la variable de salida. Si alguna franja supera la línea discontinua significa que este valor supera el error experimental y, por tanto, que esa variable tiene una influencia estadísticamente significativa sobre el parámetro estudiado. En este sentido, es evidente que un incremento de la cantidad de fase dispersa provoca un aumento en el %Ret de los polifenoles en las microesferas.

Por otro lado, se podría realizar de manera muy reservada dado los resultados estadísticos, un análisis de las posibles tendencias producto de las observaciones que puedan resultar de acuerdo a los valores mostrados en la Tabla 4.8, resaltado que otras posibles influencias podrían no ser observadas debido a un enmascaramiento producto de las interacciones entre las variables de entrada. Por ejemplo, se podría decir, en general, que un incremento de la concentración del tensioactivo de 4% a 15% p/p provoca una disminución en los diámetros de las microesferas desde 321 μm para las preparadas con menor concentración de PGPR hasta diámetros de microesferas de 39 μm para las obtenidas con mayor concentración del tensioactivo. Este comportamiento sería esperado ya que a mayor cantidad de tensioactivo se puede estabilizar más interfase y, por tanto, producir gotas de la emulsión de menor tamaño y, en consecuencia, microesferas más pequeñas. De hecho, estas mismas observaciones han sido señaladas por otros trabajos similares (**Silva et al., 2006**). Probablemente, este efecto se vea contrarrestado por las interacciones entre la concentración de tensioactivo y la cantidad de fase dispersa (Figura 4.26a) donde una disminución de la concentración de PGPR provoca un aumento del diámetro de las microesferas, y a su vez, una disminución del % fase dispersa provoca un aumento del diámetro de las microesferas. Esto podría explicar el resultado mostrado en el quinto ensayo (Tabla 4.8) donde a pesar del incremento de PGPR al 15% p/p, la utilización de un 15% p/p de fase dispersa en el proceso de preparación de la emulsión W/O provoca microesferas de mayor tamaño a lo esperado para el rango de estudio. Estas consideraciones podrían llevar a pensar que a pesar de las variables ya controladas, existan en el sistema otros factores no controlados en el proceso de encapsulación. Se tendría como ejemplo, el aspecto del protocolo de lavado y separación de las

microesferas con la solución de CaCl_2 , el cual se realiza manualmente. A pesar de que este paso del procedimiento de preparación se intenta realizar exactamente igual para cada muestra, una pequeña diferencia podría influir en las propiedades finales de las microesferas obtenidas. En este sentido, por ejemplo, otros trabajos han señalado que durante el proceso de partición y lavado de las microesferas de alginato ocurre una pérdida importante del principio activo (**Guan et al., 2011**). Sin embargo, a pesar de las limitaciones mencionadas, el protocolo aplicado en este trabajo muestra que para el caso de la variable de salida especificada como %Ret, se tienen retenciones del principio activo (polifenoles) de hasta un 60%. Por lo tanto, la encapsulación de extracto de cacao en microesferas de alginato preparadas en emulsión por gelificación interna con citrato de calcio y PGPR como estabilizante de la emulsión parece ser un método prometedor. Hasta el momento, principalmente se han logrado encapsular eficientemente polifenoles de plantas mediante el secado por atomización y la técnica por extrusión (**Deladino et al., 2008; Chan et al., 2010; Fang y Bhandari, 2010; Nazzaro et al., 2009**) y con nuevas tendencias tecnológicas como la extrusión electrostática (**Belščak-Cvitanović et al., 2011**). Los estudios más comúnmente reportados de encapsulación por emulsificación/gelificación interna, se han centrado en la administración de fármacos, atrapamiento de enzimas y células, pero no en la encapsulación de polifenoles (**Shah y Ravula, 2000; Talwalkar y Kailasaphaty, 2003; Kailasaphaty y Masondole, 2005; Muthukumarasamy y Holley, 2006; Özer et al., 2008; Özer et al., 2009; Brinques y Záchia-Ayub, 2011; Betoret E. et al., 2011**).

4.3.3.5.b *Diseño fraccionado con Catequina.*

Tomando en consideración que la mayoría de los trabajos revisados en la bibliografía utilizaron compuestos puros como los fármacos para estudiar su encapsulación por el método de emulsificación/gelificación interna, se decide utilizar como principio activo a encapsular un compuesto fenólico puro, seleccionando para ello, la Catequina ya que constituye uno de los principales componentes del extracto de cacao. En tal sentido, se realizó un diseño fraccionado 2^{3-1} a dos niveles que limite el número de experimentos y permita observar una posible influencia de las variables de entrada en las propiedades de las microesferas preparadas en emulsión por GI con un único compuesto activo a encapsular. Para ello, se plantearon como

variables de entrada la concentración de tensioactivo (4-15% p/p PGPR), % fase dispersa (15-40% p/p) y la velocidad de agitación (250-600 rpm), las cuales se tomaron en cuenta debido a los resultados obtenidos en los diseños anteriores, y como variables de salida el diámetro medio del volumen de las microesferas, D(4,3), la polidispersidad o factor SPAN y el %Ret del compuesto puro en las microesferas.

Las microesferas de alginato con (+) Catequina encapsulada se prepararon siguiendo el protocolo indicado en el apartado 3.4.3.5 para el procedimiento estándar de preparación explicado para el punto central del diseño 2^{3-1} . Se partió de 27,5% p/p de fase dispersa constituida por solución de alginato 2%/catequina 1000 ppm y 6,2% p/p citrato cálcico a 0,05 M respecto a la fase dispersa, la mezcla homogeneizada se goteó en la fase oleosa conformada por 9,5% p/p PGPR en aceite vegetal bajo agitación constante a 425 rpm y a temperatura controlada de 25 °C en un minireactor, tras 15 min de agitación y formada la emulsión W/O se adicionó el resto del aceite con acético disuelto para inducir la gelificación de las gotas. Las microesferas pregelificadas se separaron de la fase oleosa adicionando 100 ml de solución acuosa a 0,07 M CaCl_2 con 10% p/p de T20 bajo agitación moderada durante 15 min, la mezcla microesferas/emulsión se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min, la fase oleosa se descartó y la fase acuosa reservó para la cuantificación de la catequina presente en la solución de separación y, finalmente las microesferas se redispersaron en agua para la medición de sus tamaños y polidispersidad por difracción laser. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9 Diseño fraccionado 2^{3-1} factorial compuesto para la catequina.

Tensioactivo (%)	Fase dispersa (%)	V.A (rpm)	D (4,3) μm	SPAN	%Ret
9,5*	27,5	425	74,44 \pm 4,03	1,75 \pm 0,03	42,43 \pm 0,01
9,5*	27,5	425	73,12 \pm 2,31	2,02 \pm 0,05	41,66 \pm 0,25
4	15	600	88,27 \pm 2,57	1,74 \pm 0,02	72,47 \pm 0,57
15	15	250	163,21 \pm 7,05	2,27 \pm 0,05	69,91 \pm 0,66
4	40	250	153,32 \pm 4,58	1,76 \pm 0,03	91,16 \pm 0,11
15	40	600	27,72 \pm 1,75	2,69 \pm 0,09	93,28 \pm 0,22

*Réplica: Puntos centrales. %Ret.: porcentaje retención fenoles totales (catequina) en microesferas

V.A: velocidad de agitación; diámetro medio equivalente, D (4,3); factor de polidispersidad, SPAN.

Los valores obtenidos para las variables de salida (D[4,3], SPAN y %Ret) referidos al punto central y sus réplicas, presentan una buena reproducibilidad. Por

otra parte, el ANOVA muestra que no existe una influencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) de los factores sobre las variables de salida para el rango estudiado como puede apreciarse en la Figura 4.30.

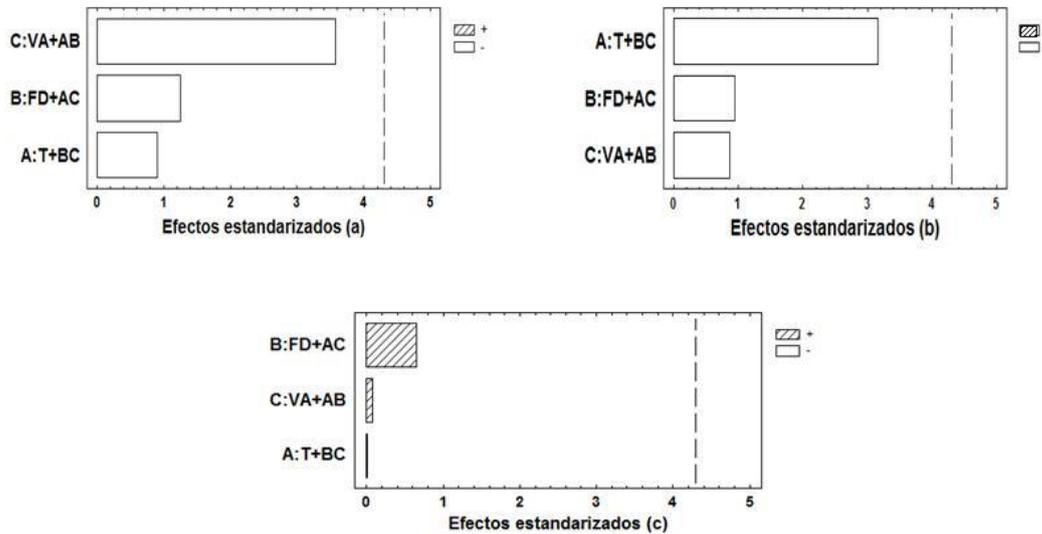


Figura 4.30 Gráficos de Pareto para el diseño fraccionado con Catequina de las microesferas preparadas en emulsión por GI para estudiar la influencia de las variables concentración de tensioactivo, % fase dispersa y velocidad de agitación en las variables de salida: Diámetro medio equivalente, a; Factor de polidispersidad o SPAN, b y Porcentaje de retención de Catequina o %Ret, c; Tensioactivo (PGPR), A:T; Fase Dispersa, B:FD; Velocidad de Agitación, C:VA; Interacciones entre variables, AC, AB y BC.

Estos resultados no esperados, podrían ser producto de las interacciones dadas por la combinación de los factores estudiados, en donde algunos factores actúan positivamente y otros negativamente sobre las variables de salida, lo que puede enmascarar los efectos individuales en estas variables, y por ello se observa como si nada influyera, cuando en realidad no es así. A saber, se podría hacer un análisis reservado de la posible influencia de estas variables de entrada sobre las variables de salida considerando los valores mostrados en la Tabla 4.9 y las tendencias de las variables que se observan en los gráficos de Pareto (Figura 4.30a y 4.30b). En este sentido, la velocidad de agitación parece influir en el diámetro de las microesferas, tendencia general observada a excepción del ensayo para 4%T-15%FD-600rpm, un aumento de la velocidad de agitación provocaría una disminución del diámetro medio de las microesferas (Figura 4.31). Incluso podría decirse que dada la interacción entre las variables y su combinación, se puede observar que el factor velocidad de agitación podría favorecer aún más la disminución de los D(4,3) al utilizar una mayor cantidad de tensioactivo, como

ejemplo se tendría los resultados mostrados por los ensayos donde se utiliza una velocidad de 600 rpm con 4% y otro con 15% p/p de tensioactivo, respectivamente. Lo que, por otra parte, se ve contrarrestado con la disminución del % fase dispersa ya que este factor influiría negativamente provocando con su disminución un aumento en el diámetro de las microesferas (Figura 4.30a).

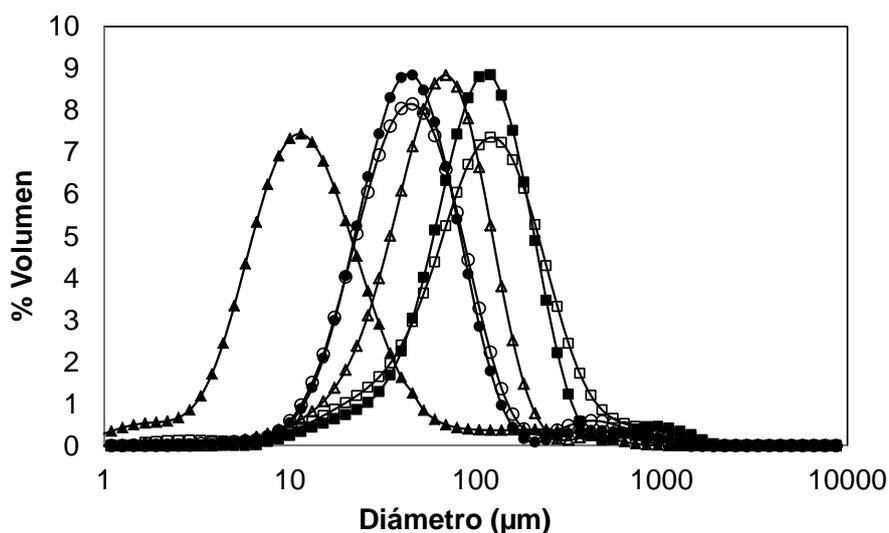


Figura 4.31 Efecto de la velocidad de agitación sobre el diámetro medio de las microesferas con catequina. ▲ 15%T-40%FD-600rpm; ● 9,5%T-27,5%FD-425rpm; ○ 9,5%T-27,5%FD-425rpm réplica; △ 4%T-15%FD-600rpm; ■ 4%T-40%FD-250rpm y □ 15%T-15%FD-250rpm. Tensioactivo, T; Fase dispersa, FD; revoluciones por minuto, rpm.

Cabe resaltar que el manifiesto observado en los diseños estudiados anteriormente con el extracto de cacao en referencia a una influencia estadísticamente significativa del % fase dispersa en el %Ret del compuesto activo en las microesferas, no fue observado en este estudio con la Catequina. Este aspecto pudiera atribuirse a diferencias de composición dadas por el compuesto activo encapsulado que provoquen interacciones con los factores en el diseño. En otras palabras, el hecho de que el extracto de cacao esté constituido por múltiples compuestos fenólicos con estructuras moleculares y tamaños diversos, podría aportar interacciones positivas o negativas con las variables de entrada durante el proceso de preparación de las microesferas. Mientras que, al utilizar la Catequina como compuesto activo único a encapsular estos efectos se vean atenuados y, por tanto, se obtengan resultados diferentes. Por otra parte, los valores de retención mostrados por el punto central y su réplica en el diseño 2^{3-1} con Catequina, %Ret ~42, y los valores obtenidos en el diseño fraccionado con el extracto de cacao,

%Ret~59, permiten inferir que una cantidad importante entre los compuestos activos encapsulados en las microesferas preparadas con extracto de cacao está formada por Catequina. y el resto por otros múltiples compuestos fenólicos tales como (-)epicatequina, galocatequina, (+)epigalocatequina, antocianinas y proantocianidinas. En este sentido, cabe recordar el apartado 2.7.2.2 en el capítulo de introducción donde se menciona el aspecto de la biodisponibilidad y beneficios de los polifenoles para la salud humana, en donde la catequina se encuentra entre los polifenoles más destacados por ejercer una acción inhibidora sobre ciertas enfermedades (**Bhooshan y Rizvi, 2009**). Por tanto, retenciones superiores al 50% en las microesferas de alginato refuerzan la viabilidad de la encapsulación con estos extractos naturales ricos en polifenoles a través de la técnica de gelificación interna en emulsión para su aplicación en alimentos a fin de convertirlos en productos funcionales.

4.3.3.6 Análisis térmico de las microesferas de alginato con extracto de cacao.

El efecto del extracto de cacao como principio activo encapsulado se estudió a través del comportamiento térmico de las microesferas de alginato mediante la aplicación de un análisis térmico (DSC) con la finalidad de observar la evolución del gel de alginato cálcico de acuerdo a la temperatura con y sin extracto de cacao. Las microesferas estudiadas se prepararon en emulsión por GI a partir de las condiciones ya indicadas para el punto central del diseño fraccionado a pH neutro controlado con el extracto de cacao. En la Figura 4.32 se muestra el termograma para las microesferas de alginato con el extracto de cacao encapsulado y en la Figura 4.33 para las microesferas de alginato sin el extracto de cacao. Puede observarse que la temperatura de inicio del evento endotérmico (onset), también denominada temperatura de transición sol-gel, para las microesferas con extracto de cacao (Figura 4.32) fue de 50,12 °C, mientras que para las microesferas sin el compuesto activo fue de 44,37 °C (Figura 4.33).

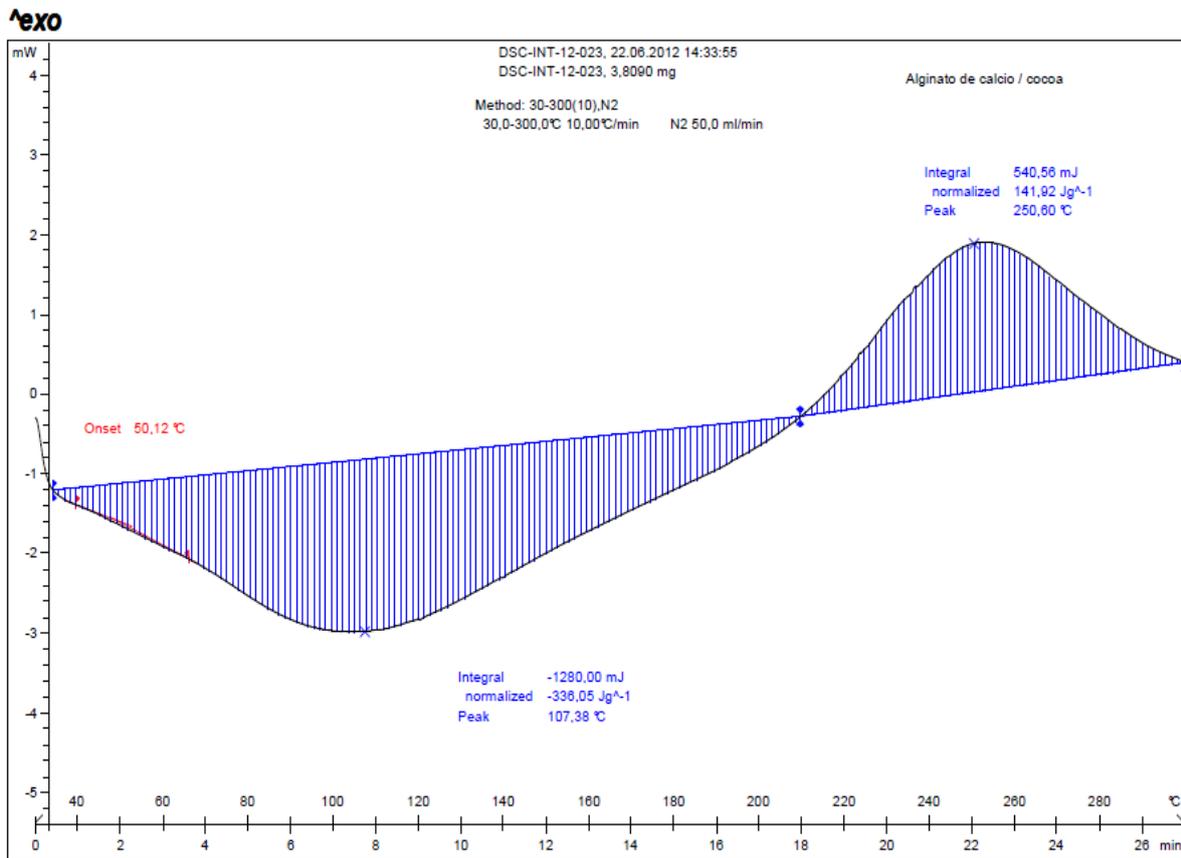


Figura 4.32 Análisis térmico (DSC) para las microesferas de alginato cálcico con extracto de cacao. Microesferas preparadas en emulsión por GI para las condiciones dadas por el punto central en el diseño fraccionado a pH neutro con extracto de cacao. Solución alginato sódico 2%/cacao 1% p/p y citrato cálcico a 0,05 M.

Este aspecto parece indicar que la incorporación del extracto de cacao altera la estructura del gel de alginato cálcico al modificar la supuesta temperatura de transición sol-gel, lo que puede probablemente atribuirse a una interacción entre los grupos fenólicos y la molécula de alginato. En tal sentido, la energía requerida por las microesferas con cacao fue de -336,05 J/g lo que muestra una diferencia importante respecto a la obtenida con las microesferas sin cacao de -182 J/g, es decir, un 54% más de energía, lo que confirmaría la existencia de una fuerte interacción entre todos los compuestos existentes dentro de la matriz polimérica de las microesferas. Por otra parte, se observa que las temperaturas obtenidas en los picos endotérmicos para cada caso, se presentan muy cercanas (107,38 y 102,41 °C) lo que puede indicar que las fuertes interacciones entre los compuestos fenólicos y el alginato parecen promover su estabilidad ya que prácticamente no ocurren cambios importantes en la temperatura de los picos (**Hamblenton et al., 2009**). Por

tanto, podría pensarse que este efecto de estabilidad manifiesta una acción protectora de la matriz del gel formado para el extracto de cacao encapsulado.

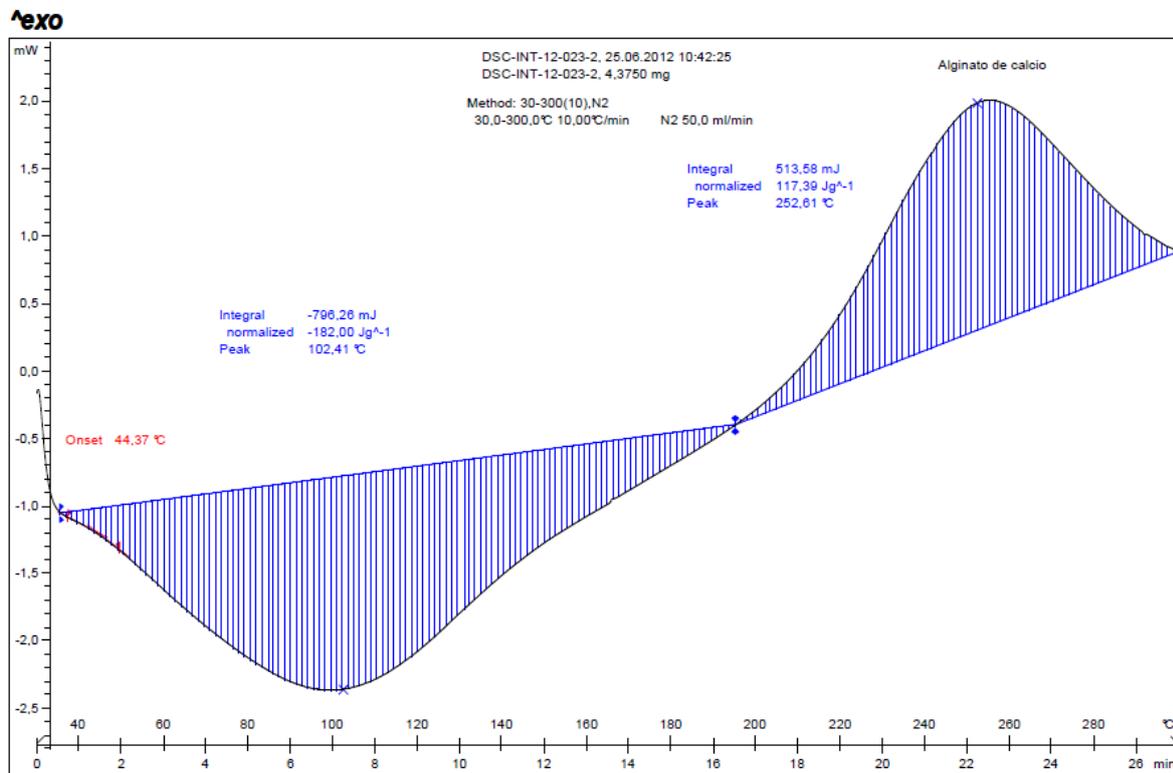


Figura 4.33 Análisis térmico (DSC) para las microesferas de alginato cálcico sin extracto de cacao. Microesferas preparadas en emulsión por GI para las condiciones dadas por las condiciones del punto central para el diseño fraccionado a pH neutro. Solución alginato sódico 2% p/p, solución citrato cálcico a 0,05 M.

4.3.4 Estudio del mecanismo de liberación del principio activo desde las microesferas.

Se estudió el mecanismo de liberación del principio activo desde las microesferas preparadas con extracto de cacao encapsulado en emulsión por GI de acuerdo a las condiciones dadas por el punto central del diseño fraccionado a pH neutro. Se partió de una fase dispersa (27,5% p/p) constituida por una solución alginato 2%/cacao 1% p/p y 6,2% p/p de solución de citrato cálcico a 0,05 M, la mezcla homogenizada se incorporó por goteo a la fase oleosa (aceite/PGPR 9,5% p/p) y finalmente se indujo la gelificación de las gotas al adicionar el agente acidificante. Una vez pregelificadas las microesferas se adicionó una solución acuosa de lavado ($\text{CaCl}_2/\text{T20}$) para ser particionadas a la fase acuosa y facilitar su

separación, luego se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min, la fase oleosa se descartó y la fase acuosa compuesta por la solución de lavado y polifenoles liberados se reservó para ser utilizada como medio de redispersión de las microesferas en el estudio de liberación. La Figura 4.34 muestra la evolución del porcentaje de polifenoles totales liberados con el tiempo, para las diferentes diluciones de las microesferas estudiadas en 50, 75, 100, 125, 150 y 200 ml de disolución acuosa constituida por el medio de separación reservado y, en los casos necesarios, parte de solución acuosa con CaCl_2 a 0,05 M y T20 al 10% p/p para completar el volumen. El análisis de los fenoles totales liberados se determinó por análisis espectrofotométrico con el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresaron como porcentaje de polifenoles totales liberados con el tiempo, teniendo en cuenta la cantidad de fenoles totales presentes inicialmente en la fase dispersa (alginato 2%/cacao 1% p/p) y la concentración en solución de los polifenoles liberados desde las microesferas (Ec. 33).

En la Figura 4.34 se puede observar, cualitativamente, que las curvas presentan una tendencia similar de liberación del compuesto activo para todas las diluciones estudiadas.

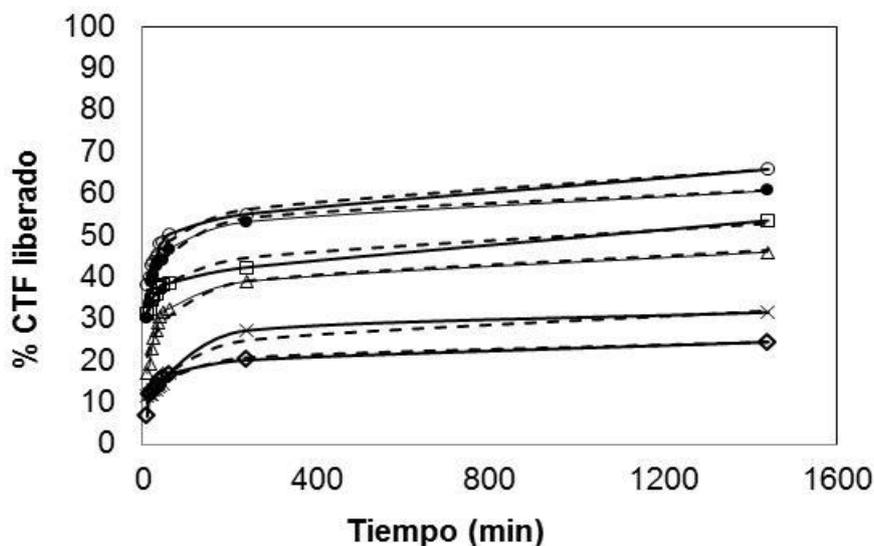


Figura 4.34 Contenido total fenólico liberado (%CTF) desde las microesferas preparadas en emulsión por GI con el tiempo. Redispersión de las microesferas alginato 2%/cacao 1% p/p en ◇ 50, x 75, Δ 100, □ 125, ● 150 y ○ 200 ml de disolución acuosa con CaCl_2 a 0,05 M y T20 al 10% p/p. Curvas experimentales en línea continua y curvas de ajuste a la ecuación empírica del modelo de Peppas-Sahlin en línea segmentada.

Con el fin de cuantificar estos resultados de liberación, los datos se analizaron utilizando las ecuaciones descritas en el apartado 2.6.2.1, Ec. 27 y Ec. 29, referidas a los modelos empíricos de *Peppas* o *Ley de la Potencia* y el modelo de *Peppas-Sahlin*. Los parámetros cinéticos de ajuste obtenidos para éstos modelos mediante el software Matlab v.7.9.0 se muestran en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10 Parámetros cinéticos de los modelos de ajuste.

Modelo $M_t / M_\infty =$	V (ml)	k or k₁ (min ⁻ⁿ)	k₂ (min ⁻²ⁿ)	n	R²
$k t^n$	50	0,0756	-	0,169	0,862
	75	0,0653	-	0,224	0,929
	100	0,1540	-	0,159	0,859
	125	0,2545	-	0,101	0,977
	150	0,2767	-	0,114	0,892
	200	0,3169	-	0,102	0,970
$k_1 t^n + k_2 t^{2n}$	50	0,0592	(-)0,0036	0,295	0,924
	75	0,0486	(-)0,0016	0,365	0,968
	100	0,1309	(-)0,0092	0,265	0,925
	125	0,2688	(-)0,0265	0,135	0,975
	150	0,2508	(-)0,0258	0,215	0,954
	200	0,3318	(-)0,0371	0,150	0,981

M_t y M_∞ son valores absolutos acumulados del principio activo en el tiempo t e infinito; Volumen del medio o solución de liberación, V ; Constante cinética característica del sistema, k ; Constante cinética Fickiana, k_1 ; Constante cinética relajación/disolución, k_2 ; Exponente cinético de liberación, n y Coeficiente de correlación, R^2 .

Aunque los resultados mostraron coeficientes de correlación satisfactorios para la Ley de la Potencia, los valores dados para los exponentes de liberación (n) se presentaron menores a 0,43. En tal sentido, estos valores de n difieren con los datos tabulados de liberación controlada para fármacos (Tabla 2.6) a partir de matrices poliméricas con diferentes geometrías específicamente para las esferas tratadas en este estudio (**Siepmann y Peppas, 2012**). Por otra parte, se obtuvieron buenos ajustes ($R^2 > 0,92$) al utilizar el modelo *Peppas-Sahlin*, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de relajación/disolución que, por tanto, influye sobre los parámetros cinéticos de liberación. Este modelo proporciona mayor información sobre la naturaleza de la difusión del compuesto activo, ya que considera en la ecuación la influencia del componente difusional, descrito por el primer término de la ecuación ($k_1 t^n$), y el aporte del transporte anómalo debido al hinchamiento del

polímero o componente de relajación, descrito por el segundo término de la ecuación ($k_2 t^{2n}$), por separado. En este sentido, los valores de una constante de velocidad negativa (k_2) sugieren alguna influencia de la relajación de la matriz que se produce por la interacción del polímero con el medio acuoso circundante a través de los poros durante el proceso de liberación de los polifenoles desde las microesferas y que conlleva el hinchamiento de éstas. Además, se puede observar en la Tabla 4.10 que los valores de k_1 son mayores respecto a los k_2 , lo que podría atribuirse a una contribución predominante de difusión Fickiana en el mecanismo de liberación del principio activo. Se observa que, salvo para algunas excepciones, la constante k_1 aumenta al aumentar la dilución, lo cual tiene sentido ya que a mayor dilución la concentración de polifenoles en el medio es menor al producirse la liberación, aumentando la fuerza impulsora o diferencia de concentraciones de polifenoles entre las microesferas de alginato y la solución externa. De manera que, el proceso de liberación de los polifenoles desde las microesferas de alginato puede describirse como la suma de dos mecanismos: la difusión de acuerdo a la *Ley de Fick* y la relajación con consiguiente hinchamiento de la estructura polimérica descrito por el modelo de *Peppas-Sahlin*.

4.4 Estudio de las esferas de alginato con principio activo preparadas por extrusión con diferentes mecanismos de gelificación.

La obtención de esferas de alginato por extrusión con el mecanismo de gelificación externa ha sido ampliamente estudiada a través de diferentes técnicas de preparación, desde el goteo manual de la solución de alginato con el principio activo sobre una solución de CaCl_2 hasta técnicas más avanzadas que han logrado la incorporación de dispositivos extrusores con boquillas múltiples y discos aspersores, inyectoros con impulsos vibratorios e incluso con la integración de un flujo de aire (**Champagne et al., 2000; Mark et al., 2009; Dohnal y Štěpánek, 2010**). Entre las características principales de la técnica de preparación por extrusión destaca la producción de esferas uniformes y de gran tamaño, comparada con las obtenidas por la gelificación en emulsión. Por otra parte, diversos trabajos de investigación han utilizado el mecanismo de gelificación interna a través de la técnica de emulsificación con miras a producir esferas de menor tamaño a fin de ser introducidas en los alimentos sin lograr su percepción por parte de los consumidores

(Poncelet, 2001; Gouin, 2004; Chan *et al.*, 2006; Champagne y Fustier, 2007; de Vos *et al.*, 2010). En este orden de ideas, diversos diseños han surgido con la finalidad de mejorar el proceso de producción de esferas mediante la optimización de los dispositivos mecánicos (Zuidam y Shimoni, 2010) e incluso para la producción de microesferas al combinar la técnica de emulsión con el mecanismo de gelificación externa (Chuah *et al.*, 2009). En este apartado, se pretende estudiar la obtención de esferas de alginato con extracto de cacao preparadas por extrusión en forma manual tanto con el mecanismo de gelificación interna como por el mecanismo tradicional referido a la gelificación externa a fin de comparar su tamaño, morfología y textura. Por otra parte, se pretende determinar la influencia de otras variables como la concentración de calcio y cantidad del compuesto activo, así como estudiar el mecanismo de liberación del principio activo según el tipo de gelificación utilizada, a objeto de seleccionar la mejor formulación para la preparación de esferas de alginato/cacao como cápsulas bioactivas que puedan ser incorporadas en productos alimentarios para hacerlos funcionales.

4.4.1 Influencia del mecanismo de gelificación, concentración del extracto de cacao y sal de calcio en el tamaño, morfología y textura de las esferas obtenidas por extrusión.

Se prepararon y caracterizaron las esferas de alginato con extracto de cacao utilizando la técnica por extrusión. Algunas esferas se obtuvieron a partir de soluciones de alginato 2%/cacao 1% p/p o alginato 2%/cacao 3% p/p utilizando una baja concentración de calcio ($0,4 \cdot 10^{-3}$ moles de Ca^{+2}/g de alginato) o una alta concentración del mismo ($1 \cdot 10^{-3}$ moles de Ca^{+2}/g de alginato) mediante el mecanismo de gelificación externa (GE) y otras esferas mediante el mecanismo de gelificación interna (GI), tal como se explica en los apartados 3.4.4.1 y 3.4.4.2 respectivamente. Para la preparación de las esferas por GE con diferentes concentraciones del extracto de cacao y calcio, se partió de una solución alginato 2%/cacao 1% o 3% p/p la cual se goteó sobre un baño acuoso de CaCl_2 a diferentes concentraciones. Las esferas formadas se mantuvieron en el baño de calcio durante 15 min, se filtraron y lavaron con agua. Algunas esferas se reservaron a fin de analizar sus propiedades mecánicas, otras para medir su diámetro medio número-longitud y otras más para observar su morfología. Por otra parte, se prepararon

esferas por GI con diferentes concentraciones del extracto de cacao y calcio a partir de soluciones de alginato 2%/cacao 1% o 3% p/p con la adición de diferentes concentraciones de solución de citrato cálcico, la mezcla homogeneizada se goteó sobre un baño gelificante de aceite vegetal y ácido acético disuelto a fin de inducir la liberación de los iones calcio distribuidos en la solución polimérica. Las esferas formadas se mantuvieron en el baño durante 15 min, luego se filtraron, lavaron y reservaron a fin de analizar su textura, otras para medir su diámetro medio número-longitud y otras más para observar su morfología. La composición de las diferentes formulaciones utilizadas para la preparación de esferas de alginato/cacao por extrusión se muestra en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11 Formulación de las esferas alginato/cacao preparadas por extrusión.

F_n	%Cocoa (p/p)	CaCl ₂ (M)	Citrato cálcico (M)	moles Ca ⁺² / g alginato ($\cdot 10^{-3}$)
E ₁	1	0,002	-	0,4
E ₂	1	0,005	-	1,0
E ₃	3	0,002	-	0,4
E ₄	3	0,005	-	1,0
I ₁	1	-	0,05	0,4
I ₂	1	-	0,25	1,0
I ₃	3	-	0,05	0,4
I ₄	3	-	0,25	1,0

Formulación, F_n ; Gelificación externa, E; Gelificación interna, I; Subíndices 1 y 2 para 1% p/p y subíndices 3 y 4 para 3% p/p extracto de cacao encapsulado; Además, subíndices 1 y 3 esferas preparadas con $0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca⁺²/g alginato y subíndices 2 y 4 esferas preparadas con $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca⁺²/g alginato.

4.4.1.1 Influencia de las diferentes formulaciones en el tamaño de las esferas.

Todas las esferas preparadas a partir de solución de alginato sódico 2% p/p y el extracto de cacao para las diferentes formulaciones presentaron forma esférica (Tabla 4.11). En la Tabla 4.12 se muestra el diámetro medio número-longitud (d_i) de las esferas para cada formulación y mecanismo de gelificación utilizado, calculados a partir de los datos presentados en el Apéndice 9.6.

Tabla 4.12 Diámetro medio número-longitud de las esferas alginato/cacao.

F_n	d_i (mm)	moles Ca⁺²/ g alginato (-10⁻³)
E ₁	3,65±0,36 ^a	0,4
E ₂	3,46±0,31 ^a	1,0
E ₃	4,03±0,48	0,4
E ₄	3,67±0,31	1,0
I ₁	4,42±0,30	0,4
I ₂	4,17±0,35	1,0
I ₃	4,37±0,36 ^b	0,4
I ₄	4,33±0,35 ^b	1,0

Formulación, F_n; Gelificación externa, E; Gelificación interna, I; Subíndices 1 y 2 para 1% p/p y subíndices 3 y 4 para 3% p/p extracto de cacao encapsulado; Además, subíndices 1 y 3 esferas preparadas con 0,4·10⁻³ moles Ca⁺²/g alginato y subíndices 2 y 4 esferas preparadas con 1·10⁻³ moles Ca⁺²/g alginato; Diámetro medio número-longitud de las esferas alginato/cacao, d_i (±desviación estándar). Letras iguales (a y b) en la misma columna indican que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) en los tamaños de las esferas para las condiciones estudiadas entre grupos.

Primeramente, las poblaciones de las esferas preparadas con alginato 2%/cacao 1% p/p, se compararon con el fin de determinar la influencia de la concentración de calcio para un tipo de gelificación en los tamaños de las esferas obtenidas. Al comparar las esferas formadas por GE según las formulaciones E₁ y E₂, se pudo observar que al utilizar diferente concentración de calcio, dentro del rango experimental, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) en los tamaños de las mismas (Tabla 4.12). Por otra parte, la comparación entre las esferas formadas por GI para las formulaciones I₁ e I₂, mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al utilizar diferentes concentraciones de calcio. Este aspecto sugiere que, dependiendo del mecanismo de gelificación utilizado para la preparación de esferas, la concentración de calcio puede afectar más o menos al tamaño de las mismas. En otras palabras, se puede apreciar que el aumento de la concentración de calcio produce una disminución en el tamaño de las esferas para ambos mecanismos de gelificación (Tabla 4.12) pero

que desde el punto de vista estadístico la concentración de calcio sólo influye de manera significativa en los tamaños de las esferas cuando se utiliza la GI para el rango estudiado. A continuación, se compararon las poblaciones de las esferas preparadas con alginato 2%/cacao 1% p/p con una misma concentración de calcio pero preparadas a partir de diferentes tipos de gelificación con el fin de determinar la influencia del mecanismo de gelificación en los tamaños de las esferas obtenidas. En este caso se puede observar que los diámetros medios número-longitud entre las poblaciones E_1 e I_1 y las poblaciones de esferas E_2 e I_2 , mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), lo que indica una clara influencia del tipo de mecanismo de gelificación en el tamaño de las esferas obtenidas. De hecho, se puede apreciar que los diámetros medios de las esferas formadas por GE para ambas concentraciones de calcio (E_1 y E_2) se presentaron menores respecto a los diámetros medios de las esferas formadas por GI (I_1 e I_2). Este aspecto, como ya se ha comentado, podría atribuirse a la formación de una capa externa más rígida del gel formado por GE, debido a una mayor concentración de iones calcio ubicados en esta capa externa, ya que éste se difunde desde afuera hacia adentro, lo cual comprime la matriz de las esferas y, por lo tanto, produce una mayor expulsión de agua. Esta sinéresis es una característica general de los geles. Los resultados muestran que dicho fenómeno se produce en menor medida cuando se utiliza el mecanismo de GI, ya que en este caso, aunque el gel es más homogéneo en toda la esfera, es probablemente más abierto, debido a que el calcio está más uniformemente distribuido, y, por tanto, también lo están los puntos de gelificación o de interconexión entre las moléculas de alginato. Al ser un gel menos rígido expulsa menos agua respecto a los formados por GE, y por ello se observa la diferencia de tamaño de las esferas preparadas por los diferentes mecanismos de gelificación. Sin embargo, cabe resaltar que mientras un aumento de la concentración de calcio en las esferas obtenidas por GI influye significativamente en los tamaños, el efecto de ésta variable no influye mucho en las esferas por GE porque al formarse una capa rígida que debe estar casi saturada de calcio, el gel se habrá unido en casi todos los puntos de unión posibles en la capa externa, éste, en el tiempo de gelificación usado, no penetra mucho más al haber más calcio y, por tanto, la sinéresis que se produce es muy parecida para ambas concentraciones de calcio. Mientras que para la GI se produce un gel más abierto que para la GE pero, comparando la GI con distintas concentraciones de calcio, más compacto cuando se usa más calcio, que

ya está incorporado en el interior de las esferas, produciéndose por tanto más sinéresis cuanto más calcio hay, aunque siempre en menor proporción respecto a las esferas preparadas por GE.

Las poblaciones de las esferas de alginato 2%/cacao 3% p/p, también se compararon con el fin de determinar la influencia de la concentración de calcio y el tipo de gelificación en el tamaño de las esferas obtenidas al encapsular mayor cantidad de extracto de cacao. Los resultados mostraron una influencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de la concentración de calcio en los diámetros medios número-longitud de las esferas preparadas por GE (E_3 y E_4); mientras que para las esferas preparadas por GI (I_3 e I_4) no se observó ($p > 0,05$). Este resultado, referido a la influencia de la concentración de calcio se presenta contrario respecto a los obtenidos al utilizar una menor cantidad de extracto de cacao (1% p/p, explicado anteriormente), efecto que puede ser atribuido al incremento de la cantidad de extracto de cacao encapsulado (3% p/p) ya que al encontrarse una mayor cantidad de compuestos polifenólicos en la matriz polimérica se produce una mayor interacción de éstos con los iones calcio que por tanto impiden la formación de puntos de gelificación, obteniéndose así un gel menos rígido y, por tanto, que expulsa menos agua. La formación de puentes entre los polifenoles y el calcio ha sido estudiada por **Yamada** y colaboradores (2007). En cuyo caso la influencia de la concentración de calcio puede ser más o menos significativa según el tipo de gelificación utilizado, tal como indican los resultados para la GE, donde se puede observar una influencia importante del incremento de calcio en el tamaño de las esferas ya que los iones calcio al difundirse desde el exterior a la superficie del alginato, algunos forman puentes con los compuestos fenólicos y otros se unen al alginato formando el gel, la formación de puentes entre los polifenoles y el calcio disminuye la disponibilidad de los iones calcio para el proceso de gelificación, lo que únicamente se puede ver contrarrestado con un incremento de la concentración de calcio, promoviendo así la formación de una capa o superficie más rígida de gel que por tanto provoca más sinéresis. Por el contrario, en las esferas preparadas por GI los iones calcio distribuidos en la matriz polimérica tienen un contacto más directo con los compuestos polifenólicos y, por tanto, se crea una relación de competencia entre ellos que parece ser independiente de la concentración de calcio utilizada en este estudio ya que se pueden observar diámetros medios de las esferas prácticamente similares. En general, se puede observar en la Tabla 4.12 que los

tamaños de las esferas con una mayor cantidad de extracto (3% p/p), a excepción de un caso, se mostraron superiores a los obtenidos en las esferas preparadas con una cantidad menor de extracto de cacao (1% p/p) debido a la formación de un gel menos rígido que por tanto expulsa menos agua. En referencia a la influencia del tipo de mecanismo de gelificación, al comparar los diámetros medios entre las poblaciones de las esferas formadas por los diferentes mecanismos de gelificación con 3% p/p de extracto de cacao (E_3 e I_3 ; E_4 e I_4) se obtuvo una influencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del tipo de gelificación utilizado sobre los tamaños de las esferas preparadas para una misma concentración de calcio. Este resultado concuerda con los mostrados al utilizar una menor cantidad de extracto de cacao (1% p/p), de manera que se evidencia la importancia del efecto que tiene el mecanismo de gelificación utilizado para la preparación de las esferas por extrusión sobre su tamaño para este rango de concentraciones estudiado.

En general, se puede observar que la concentración de calcio tiene influencia sobre el tamaño de las esferas, ya que se aprecia una disminución en el diámetro medio de estas al utilizar la concentración más alta de calcio, efecto también observado y reportado por otros autores (**Chan y Dobashi, 2003**). Este aspecto se puede explicar debido a la formación de un gel más reticulado y compacto, que por lo tanto, produce más sinéresis. Sin embargo, es apropiado considerar la proporción del compuesto activo utilizado para la preparación de las esferas, ya que este efecto de la concentración del calcio se puede ver alterado según el tipo de mecanismo de gelificación utilizado. Aspecto que, por tanto, requeriría de mayores estudios.

4.4.1.2 Influencia de las diferentes formulaciones en la estructura interna de las esferas.

La estructura interna de las esferas obtenidas con alta concentración de calcio ($1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g de alginato) para ambos mecanismos de gelificación y posteriormente liofilizadas se muestra en la Figura 4.35. Las microfotografías obtenidas por SEM, evidencian claramente grandes agujeros para las esferas preparadas por GE, Figura 4.35a y 4.35c. Mientras que, en las Figuras 4.35b y 4.35d, se puede observar una estructura interna más compacta y homogénea que corresponde a las esferas obtenidas por el mecanismo de GI.

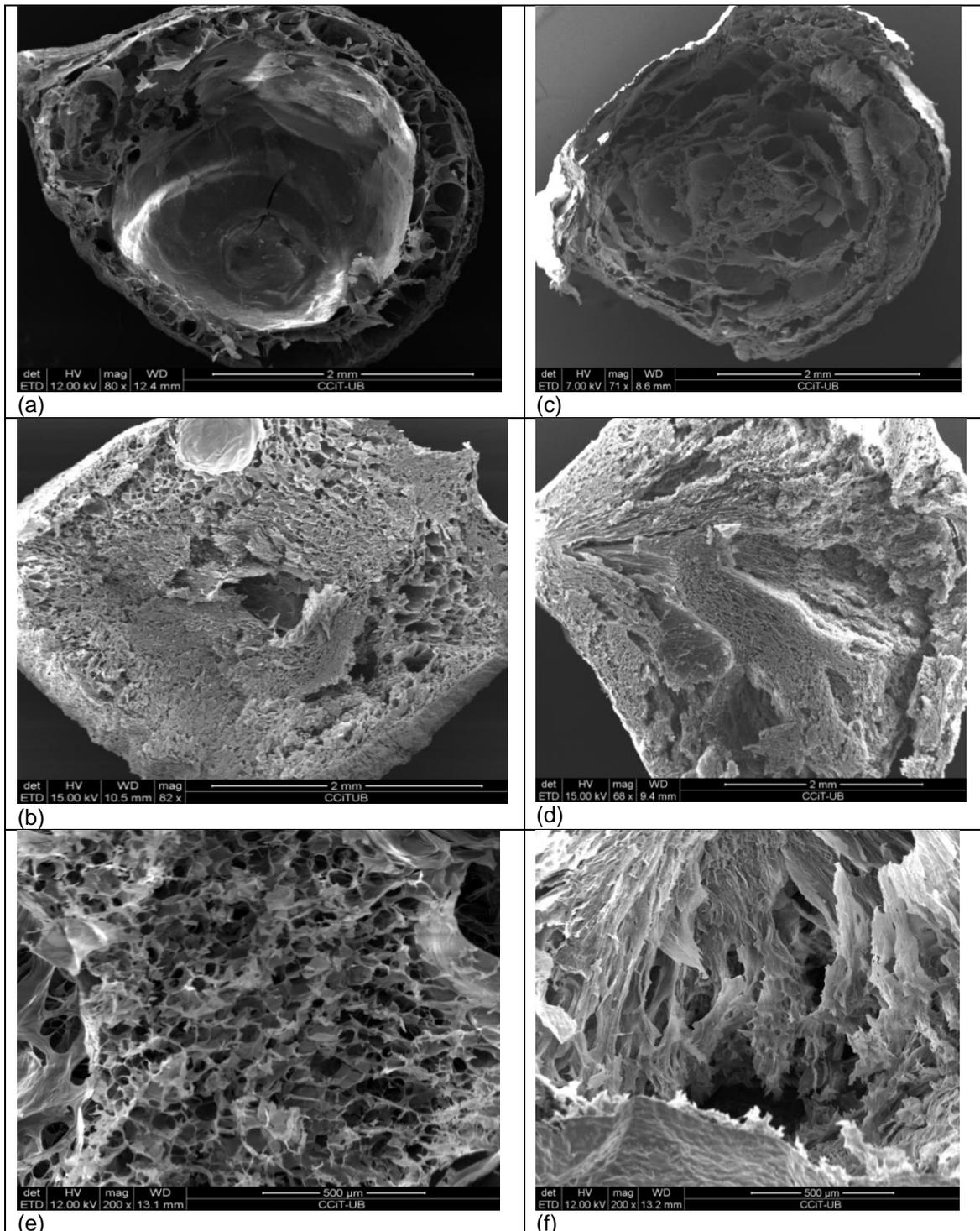


Figure 4.35 Microfotografías por SEM de las esferas preparadas por extrusión. Esferas liofilizadas y preparadas a partir de solución alginato 2%/cacao y $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2} /g alginato (alta concentración de calcio). Alginato/cacao 1% p/p por GE, (a); Alginato/cacao 1% p/p por GI, (b); Alginato/cacao 3% p/p por GE, (c); Alginato/cacao 3% p/p por GI, (d); Esferas de alginato 2% p/p control por GE, (e) y Esferas de alginato 2% p/p control por GI, (f).

La característica estructural que muestran las esferas obtenidas por GE, puede ser atribuida a la formación inicial de una capa de gel en la superficie de la

gota, lo que ralentizaría la difusión de los iones calcio hacia el interior, y por tanto, a través de la matriz polimérica. Por esta razón, el resultado corresponde a una matriz menos homogénea debido a la formación de un núcleo relativamente poco reticulado, deficitario en calcio, y con una superficie tipo cáscara altamente reticulada producto del mecanismo de gelificación cuya fuente de calcio es externa (Zhao *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2006). En contraste, el mecanismo de GI utiliza una fuente de calcio interna, en donde ocurre la difusión del H⁺ de forma más sencilla respecto al Ca⁺² desde la superficie hasta el núcleo de la gota a través del gel formado, produciendo una matriz más homogénea. Cuando se emplea una mayor concentración de extracto de cacao, la estructura interna de la esfera tiene una apariencia menos porosa (Figura 4.35d), este aspecto puede atribuirse a la ocupación de los espacios intersticiales debido a una mayor cantidad del principio activo (Chan *et al.*, 2011). Las mismas características morfológicas se apreciaron al analizar la estructura interna de esferas de alginato preparadas para ambos mecanismos de gelificación sin la utilización del extracto de cacao (Figura 4.35e y 4.35f). Lo que confirma la influencia del tipo de mecanismo de gelificación utilizado en la estructura interna de las esferas. Por otra parte, se pudo observar que a pesar de las diferentes concentraciones de calcio utilizadas, la estructura interna de las esferas conserva la misma tendencia morfológica para cada mecanismo de gelificación, las imágenes obtenidas por SEM para las esferas preparadas por extrusión a partir de una menor concentración de calcio ($0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca⁺²/g alginato) se muestran en el apéndice 9.6.

4.4.1.3 *Influencia de las diferentes formulaciones en las propiedades texturales de las esferas.*

Las curvas de esfuerzo-deformación obtenidas por medio del análisis de perfil de textura (TPA), permitieron cuantificar las propiedades mecánicas de las diferentes esferas de alginato/cacao húmedas, las cuales se correlacionaron con sus características de textura. Las esferas alginato/cacao se prepararon por extrusión para las diferentes formulaciones tal como se explicó anteriormente (Tabla 4.11), las esferas se colocaron en una placa Petri, la que se llenó completamente según cada caso, el TPA se realizó en un reómetro modular programado para realizar mediciones con la fuerza normal a una velocidad de compresión de 0,025 mm/s, un

17% de deformación y una temperatura controlada a $5 \pm 0,5$ °C. A partir de las curvas dadas por el análisis de textura representado por un perfil de fuerza en función del tiempo, se midieron directamente algunas propiedades mecánicas como dureza, elasticidad y cohesividad, mientras otras fueron calculadas tales como gomosidad y masticabilidad. En la Tabla 4.13, se presentan los valores medios de los parámetros texturales correspondientes de las esferas o cápsulas obtenidas por extrusión a través de los diferentes mecanismos de gelificación y formulaciones. Todos los valores de los parámetros texturales obtenidos por triplicado se presentan en el Apéndice 9.6 (Tabla 9.18) para las diferentes formulaciones (Esferas con extracto de cacao 1% y 3% p/p preparadas a partir de bajas y altas concentraciones de calcio).

Tabla 4.13 Parámetros mecánicos texturales de las esferas de alginato/cacao para las diferentes formulaciones.

F_n	Dureza (N)	Cohesividad	Elasticidad	Gomosidad (N)
E₁	2,714±0,383 ^{ac}	0,507±0,026 ^{ad}	0,799±0,001 ^e	1,842±0,693 ^{ac}
E₂	3,169±0,569 ^{ad}	0,475±0,013 ^{ae}	0,792±0,000 ^f	1,501±0,243 ^{ad}
E₃	2,837±0,475 ^{bc}	0,480±0,015 ^{bd}	0,797±0,009 ^{ace}	1,495±0,375 ^{bc}
E₄	2,281±0,244 ^{bd}	0,446±0,014 ^{be}	0,800±0,008 ^{adf}	1,249±0,573 ^{bd}
I₁	0,224±0,029 ^e	0,654±0,064 ^{cf}	0,792±0,000 ^g	0,207±0,105 ^e
I₂	0,956±0,040 ^f	0,662±0,054 ^{cg}	0,828±0,018 ^h	0,634±0,068 ^f
I₃	0,467±0,167 ^e	0,584±0,031 ^{df}	0,820±0,018 ^{bcg}	0,329±0,144 ^e
I₄	0,950±0,140 ^f	0,619±0,078 ^{dg}	0,818±0,020 ^{bdh}	0,347±0,170 ^f

Formulación, F_n; Gelificación externa, E; Gelificación interna, I; Subíndices 1 y 2 para 1% p/p y subíndices 3 y 4 para 3% p/p extracto de cacao encapsulado; Además, subíndices 1 y 3 esferas preparadas con $0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca⁺²/g alginato y subíndices 2 y 4 esferas preparadas con $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca⁺²/g alginato; Las letras iguales (a hasta h) en la misma columna indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre los valores medios de las poblaciones analizadas según las formulaciones para un mismo atributo.

En ANOVA realizado entre los valores medios de un mismo atributo de textura para las poblaciones de esferas, permitió analizar la influencia de la concentración

de calcio, la cantidad de extracto y tipo de gelificación sobre estos parámetros mecánicos texturales obtenidos a través del TPA. En este sentido, se puede observar que la dureza de las esferas alginato 2%/cacao preparadas por GI para las diferentes cantidades de extracto de cacao, mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al utilizar varias concentraciones de calcio. De hecho, los valores de dureza de las esferas obtenidas por GI se incrementaron desde 0,224 hasta 0,956 N al utilizar una mayor concentración de calcio (I_1 e I_2 ; I_3 e I_4). Este aspecto indica que al utilizar una mayor concentración de calcio, se forma un gel más reticulado y, por tanto, más compacto. Por el contrario, esta influencia de la concentración de calcio no se observó ($p > 0,05$) para las esferas alginato 2%/cacao preparadas por GE (E_1 y E_2 ; E_3 y E_4). Este hecho, podría ser atribuido a que la corteza o superficie de las esferas preparadas por GE se satura rápidamente de calcio incluso con la menor concentración de calcio utilizada, formándose un gel rígido, y esta capa externa es la principal determinante de la dureza, resultando en valores de dureza similares para las concentraciones de calcio utilizadas (valores desde 2,281 hasta 3,169 N). El proceso de difusión de los iones calcio desde la superficie hacia el núcleo de la gota del polímero se ve ralentizado debido a la presencia de esta capa superficial de gel saturado y rígido que deben atravesar los iones para llegar al núcleo de las esferas. Todo ello parece proporcionar valores de dureza muy similares para el rango de concentración de calcio estudiado al utilizar el mecanismo de GE. En cuanto a la influencia de la cantidad del extracto de cacao, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre las poblaciones de esferas preparadas con la misma concentración de calcio y tipo de gelificación (E_1 y E_3 ; E_2 y E_4 ; I_1 e I_3 ; I_2 e I_4).

Por otro lado, al comparar la dureza de las esferas alginato/cacao preparadas para una misma concentración de calcio y cantidad de extracto de cacao a través de diferentes tipo de gelificación, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores medios de dureza de las poblaciones (I_1 y E_1 ; I_2 y E_2 ; I_3 y E_3 ; I_4 y E_4), lo que representa una clara evidencia del efecto del tipo de mecanismo de gelificación sobre la dureza de las esferas a pesar de las diferentes concentraciones de calcio y cantidad de extracto de cacao utilizado. En tal sentido, los valores de dureza para las esferas preparadas por GE fueron muy superiores (2,281 a 3,169 N) respecto a los obtenidos con las esferas preparadas por GI (0,224 a 0,956 N), lo que confirma la formación de una capa mucho más

rígida en la superficie de esferas cuando se utiliza la GE, proporcionando así una dureza externa superior, a pesar, de las características morfológicas observadas (SEM) correspondientes a un núcleo menos reticulado (Figura 4.35a y 4.35c). De acuerdo con estos resultados, la dureza de las esferas alginato/cacao se ve afectada principalmente por el mecanismo de gelificación, y en segundo lugar, por la concentración de calcio utilizada, especialmente cuando se utiliza la GI. Por el contrario, la cantidad del extracto de cacao no parece afectar a la dureza de las mismas.

Se estudió la cohesión como otro parámetro de textura medido a partir del Análisis de perfil de textura (TPA), y correlacionado con la fuerza de los enlaces internos que constituyen el cuerpo de un producto (**Friedman et al., 1963**). Se pudo observar en la Tabla 4.13 a través del análisis estadístico que al preparar esferas de alginato 2%/cacao con diferentes concentraciones de calcio, iguales cantidades de extracto de cacao y utilizando el mismo tipo de gelificación, tanto para las esferas preparadas por GE (E₁ y E₂; E₃ y E₄) como las preparadas por GI (I₁ e I₂; I₃ e I₄), sus valores medios de cohesividad no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Este aspecto parece indicar que la estructura interna formada entre la matriz polimérica y el compuesto activo (fuerza de los enlaces) tanto de las esferas preparadas por GE como las obtenidas por GI, mantienen una cohesión similar entre esferas preparadas con el mismo tipo de gelificación, independientemente de la concentración de calcio y la cantidad de extracto de cacao utilizado en los rangos de estudio establecidos. Por otro lado, al comparar los valores medios de cohesividad entre las diferentes poblaciones de esferas preparadas por diferentes mecanismos de gelificación (E₁ e I₁; E₂ e I₂; E₃ e I₃; E₄ e I₄), se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre ellos, resultado esperable, debido a la diferencia morfológica observada previamente en las esferas alginato 2%/cacao preparadas con distintos mecanismos de gelificación (Figura 4.35). Esto, a su vez permite explicar los valores de cohesividad superiores obtenidos para las esferas preparadas por GI respecto a los obtenidos por GE, debido a la formación de una estructura interna más compacta y homogénea en las esferas formadas por GI.

Al observar los valores medios obtenidos para el atributo de elasticidad de las diferentes poblaciones de esferas, éstos mostraron, en general, valores de elasticidad ligeramente menores (0,792 - 0,800) para las esferas de alginato 2%/cacao preparadas por GE respecto a los obtenidos por GI (0,792 - 0,828).

Considerando que la elasticidad se puede interpretar como el grado de recuperación de la muestra cuando se aplica una fuerza externa, los valores mencionados anteriormente parecen indicar que las esferas preparadas por GE se presentan ligeramente más deformables, probablemente debido a la formación de una estructura menos homogénea. Esta propiedad de textura, también conocida como índice de elasticidad, se relaciona frecuentemente con el grado de relajación de la muestra, el cual se presenta con valores entre 0 y 1. En tal sentido, cuando un producto alimenticio posee una alta elasticidad, con valores próximos a la unidad, se dice que éste tiene una textura gomosa, mientras que cuando los valores de elasticidad son bajos corresponde a una textura de tipo quebradiza. En general, los valores observados de elasticidad parecen describir una textura gomosa para todas las esferas de alginato/cacao. Sin embargo, al realizar la comparación estadística entre poblaciones de esferas, se pudo apreciar alguna diferencia estadísticamente significativa entre valores medios de elasticidad, tal como para las esferas alginato 2%/cacao 1% p/p preparadas con diferentes concentraciones de calcio y tipo de gelificación ($p < 0,05$). En este sentido, se pudo observar que al aumentar la concentración de calcio las esferas preparadas por GI se presentaron más elásticas (I_1 e I_2) respecto a las preparadas por GE (E_1 y E_2), lo que se atribuye a la formación de una estructura interna más homogénea. Por el contrario, la influencia de la concentración de calcio no se apreció estadísticamente significativa ($p > 0,05$) en las esferas alginato 2%/cacao 3% p/p preparadas con diferentes concentraciones de calcio y tipo de gelificación (E_3 y E_4 ; I_3 e I_4). Esto podría explicarse debido a la cantidad de compuesto activo utilizado en la encapsulación, el cual al llenar los espacios intersticiales en la matriz polimérica y dada la formación de puentes entre los iones calcio y los polifenoles que provocan una disminución de los iones calcio disponibles para la formación de puntos de gelificación, podría inducir la formación de una estructura del gel con valores de elasticidad muy similares a pesar del incremento en la concentración de calcio cuando se utiliza el mismo mecanismo de gelificación. Al comparar los valores medios de elasticidad entre las esferas alginato 2%/cacao preparadas con diferentes mecanismos de gelificación, se pudo observar que la cantidad de extracto utilizada en su preparación influye en el índice de elasticidad obtenido ya que las esferas alginato 2%/cacao 1% (E_1 e I_1 ; E_2 e I_2) mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Este aspecto es atribuido, como se ha dicho, a la diferencia en la estructura interna de las esferas.

Por el contrario, se presentaron $p > 0,05$ para las esferas preparadas con 3% p/p de extracto de cacao (E_3 e I_3 ; E_4 e I_4), lo que podría explicarse debido al llenado intersticial de la matriz con el principio activo y dada la formación de menos puntos de gelificación como consecuencia de la mayor cantidad de puentes calcio-polifenoles formados, lo que provoca valores de elasticidad similares e independientes de la concentración de calcio y tipo de gelificación utilizado para el rango estudiado. En general, las esferas preparadas por GI se presentaron más elásticas que las preparadas por GE.

Los resultados de gomosidad muestran diferencias significativas ($p < 0,05$), al comparar sus valores medios entre poblaciones de esferas preparadas con una misma concentración de calcio y cantidad de extracto de cacao pero utilizando diferentes mecanismos de gelificación (E_1 e I_1 ; E_2 e I_2 ; E_3 e I_3 ; E_4 e I_4). Estos valores de gomosidad, resultaron mayores para las esferas preparadas por GE respecto a los obtenidos por GI, resultado esperable, debido a la gran contribución del atributo dureza en el parámetro de gomosidad (producto de la dureza por la cohesividad). En este sentido, los resultados estadísticos se mostraron iguales a los obtenidos con el atributo dureza. Este parámetro textural, se relacionan con la energía requerida para desintegrar un alimento (esferas o cápsulas) con objeto de ser deglutido (**Pons y Fiszman 1996; Szczesniak, 2002**). Las esferas alginato 2%/cacao obtenidas por GE, por tanto, requieren mucha más energía (1,249 a 1,842 N) que las preparadas por GI (0,207 a 0,634 N). Y por tanto, puede decirse que las esferas preparadas por GE al ser más gomosas requerirán mayor energía para su ruptura en boca respecto a las esferas obtenidas por GI.

Por tanto, considerando que a través del análisis instrumental de las propiedades mecánicas de un producto se puede conocer la tendencia de las características percibidas desde el punto de vista sensorial, es importante tener en cuenta especialmente las características de dureza y gomosidad, con la finalidad de que su incorporación en los alimentos sea adecuada al seleccionar las cápsulas o esferas de alginato/cacao que posean una textura más suave o dura según el efecto que se desee perciba el consumidor en el producto.

La característica referida a masticabilidad calculada para las esferas preparadas según cada caso del estudio, se muestran en el Apéndice 9.6. Este atributo está íntimamente vinculado con las características de dureza, cohesividad y elasticidad, ya discutidos en este apartado, el cual es interpretado como la energía

requerida para masticar el producto hasta un estado adecuado de deglución. Por tanto, estos resultados permiten inferir claramente que las esferas de alginato/cacao preparadas por GI requieren menor cantidad de energía para su desintegración en boca, lo que está relacionado con la explicación dada anteriormente en referencia al atributo gomosidad.

4.4.2 Estudio del mecanismo de liberación del principio activo desde las esferas preparadas por gelificación externa y gelificación interna.

El desarrollo y aplicación de sistemas de vehiculización y liberación controlada de compuestos activos se ha practicado en la industria alimentaria desde hace años. Sin embargo, como se ha hecho mención en el apartado 2.6, los modelos cinéticos estudiados y aplicados han sido pocos en comparación con otros campos de estudios como la industria farmacológica en el desarrollo de nuevas formas de medicación. La liberación controlada de compuestos activos es una estrategia de uso frecuente en la formulación de alimentos con propiedades funcionales. Ésta se define como el mecanismo mediante el cual uno o más compuestos activos se difunden desde el interior de un soporte, cápsula, etc, hasta el seno de un medio específico a lo largo del tiempo y con una cinética determinada (**Mastromatto et al., 2010**). En los sistemas de liberación controlada, el agente bioactivo es incorporado a una matriz o soporte que generalmente es de tipo polimérico. Su velocidad de liberación depende de varios factores internos y externos del sistema; principalmente viene determinada por las propiedades del polímero como el tipo de matriz encapsulante, geometría del sistema, y naturaleza del principio activo, y en menor medida, por factores externos como el pH, la temperatura, solvente de liberación entre otros. Los mecanismos más importantes que regulan la velocidad de liberación de un compuesto activo, son la difusión, el hinchamiento y/o la degradación/erosión de la matriz. La importancia de cada uno dependerá en gran parte de la composición de la matriz polimérica y del medio circundante, por lo que el agente activo podrá ser liberado al medio por uno o más mecanismos (**Barba et al., 2009**).

En este apartado se estudian algunos de los diferentes modelos cinéticos previamente descritos en el apartado 2.6, a fin de determinar el mecanismo de liberación de los polifenoles como principio activo encapsulado en las esferas de

alginato por extrusión a través de los mecanismos de gelificación externa o gelificación interna. Entre los numerosos modelos cinéticos que han sido propuestos para predecir el comportamiento de los fármacos al ser liberados desde una matriz polimérica hacia el medio, se tienen la ley de la potencia o modelo de Kosmeyer-Peppas generalizado, o el modelo de Higuchi que representa una versión simplificada del anterior al especificar el valor del exponente cinético (n). Posteriormente se desarrollaron otros modelos, que surgieron con miras a proporcionar mayor información de la naturaleza de la difusión del principio activo debido a las desviaciones de la Ley de Fick observadas, como el modelo de Peppas-Sahlin generalizado que introduce un segundo término a la ecuación cinética establecida en la ley de la potencia, y a partir del cual se obtiene el modelo simplificado conocido como modelo de Ritger-Peppas para un valor de exponente cinético definido. En tal sentido, este trabajo estudia los modelos generalizados de la Ley de la Potencia y el modelo de Peppas-Sahlin e incorpora otro modelo propuesto por Gallagher-Corrigan, debido al planteamiento de dos términos matemáticos en la ecuación cinética, el cual pretende explicar el fenómeno de difusión del soluto o fármaco en dos etapas, una inicial llamada efecto estallido o en inglés “burst effect” en donde ocurre una primera disolución rápida del soluto atrapado en el material de forma más superficial, y una segunda etapa del proceso de liberación, más lenta, en donde continúa la liberación del soluto e incluso podría ocurrir la degradación del material polimérico.

El estudio de liberación de los polifenoles totales, se llevó a cabo desde las esferas alginato/cacao preparadas según cada una de las formulaciones (Tabla 4.11) ya caracterizadas en el apartado anterior, a partir del método de extrusión tal como se explica el apartado 3.4.5.2 para varias diluciones desde 50 ml hasta 300 ml en un medio acuoso con CaCl_2 como medio circundante de liberación. Para el estudio se prepararon esferas alginato 2%/cacao 1% p/p y esferas alginato 2%/cacao 3% p/p y diferentes concentraciones de calcio en un baño acuoso gelificante de CaCl_2 para varias diluciones desde 50-300 ml a través del mecanismo de GE, las esferas formadas se mantuvieron en el baño gelificante durante 10 min para completar su gelificación. Por otra parte, se prepararon esferas alginato 2%/cacao 1% p/p y esferas alginato 2%/cacao 3% p/p por GI y diferentes concentraciones de citrato cálcico, las esferas formadas se mantuvieron en el baño oleoso acidificado durante 10 min para su gelificación completa, se separaron,

lavaron y suspendieron en 100, 150, 200, 250 y 300 ml de solución acuosa de CaCl_2 a 0,001 M con agitación moderada. En todos los estudios realizados se tomaron alícuotas de la solución acuosa de CaCl_2 , inicialmente pasados 10 min y sucesivamente cada 10 min hasta completar 1 hora, después de 4 horas y finalmente a las 24 horas. El análisis del contenido de polifenoles totales liberados desde las esferas con el tiempo se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu.

En la Figura 4.36 se muestran los perfiles de liberación de los polifenoles obtenidos desde las esferas preparadas con diferentes mecanismos de gelificación y cantidad de extracto de cacao utilizando una baja concentración de calcio ($0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato) en una disolución de 150 ml de los distintos modelos de ajuste cinéticos estudiados.

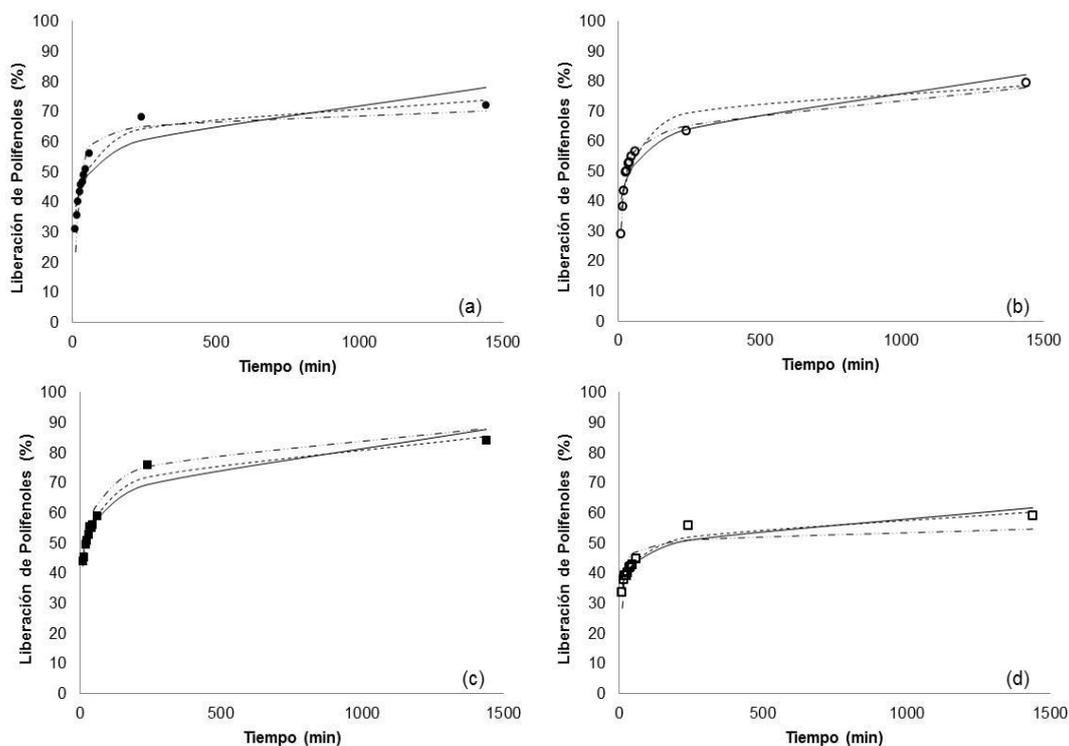


Figura 4.36 Perfiles de liberación de los polifenoles desde esferas preparadas por extrusión. Medio de liberación: 150 ml disolución acuosa de CaCl_2 . Datos experimentales en puntos geométricos para las esferas alginato 2%/cacao 1% p/p, a y alginato 2%/cacao 3% p/p, b preparadas por GE. Para las esferas alginato 2%/cacao 1% p/p, c y alginato 2%/cacao 3% p/p, d preparadas por GI con una baja concentración de calcio, $0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato. Ajustes a los modelos: *Power Law* en línea continua; *Peppas-Sahlin* en línea discontinua y *Gallagher-Corrigan* en línea punto-rayada.

Se puede observar que los mejores ajustes a los datos experimentales parecen obtenerse con los modelos de *Peppas-Sahlin* y *Gallagher-Corrigan*. Por el contrario, los ajustes al modelo de *Power Law* se mostraron, en general, más

alejados de los datos experimentales. Estas tendencias similares se observaron en los perfiles de liberación obtenidos desde esferas preparadas con diferentes mecanismos de gelificación y cantidad de extracto de cacao utilizando una alta concentración de calcio ($1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato) en una disolución de 150 ml (Figura 4.37). El resto de perfiles obtenidos para todos los volúmenes de disolución utilizados se presentaron muy similares.

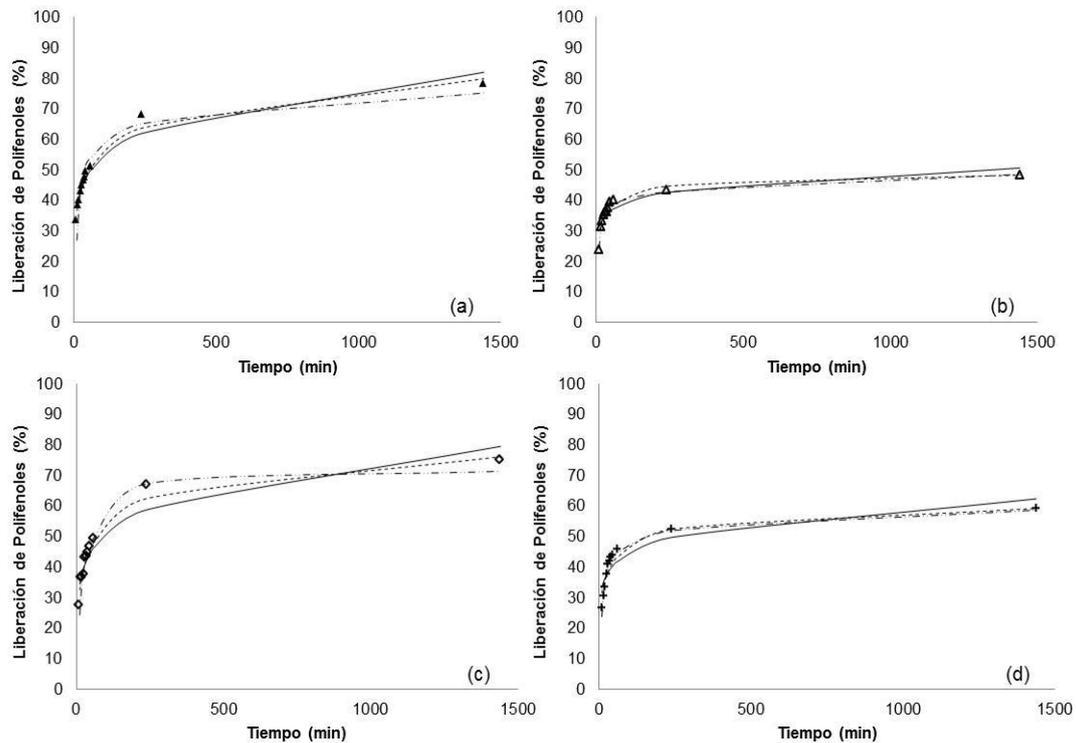


Figura 4.37 Perfiles de liberación de los polifenoles desde esferas preparadas por extrusión. Resultados obtenidos para una disolución acuosa de CaCl_2 de 150 ml datos experimentales en puntos geométricos para las esferas alginato 2%/cacao 1% p/p (a) y alginato 2%/cacao 3% p/p (b) preparadas por GE y para las esferas alginato 2%/cacao 1% p/p (c) y alginato 2%/cacao 3% p/p (d) preparadas por GI con una alta concentración de calcio, $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato. Ajustes a los modelos: *Power Law* en línea continua; *Peppas-Sahlin* en línea discontinua y *Gallagher-Corrigan* en línea punto-rama.

Con la finalidad de analizar más a fondo los ajustes obtenidos, en la Tabla 4.14 se muestran los parámetros cinéticos y coeficientes de correlación para cada uno de los modelos estudiados.

Tabla 4.14 Parámetros y coeficientes de correlación obtenidos a partir del ajuste a los modelos de *Power Law*, *Peppas-Sahlin* y *Gallagher-Corrigan*.

Formulación, F _n / Diluciones, V (ml)	Modelo Mt / M _∞ =	f _b	k or k ₁ (min ⁻ⁿ)	f _{tmax}	k ₂ (min ⁻²ⁿ)	t _{max} (min)	n	R ²	SSE
E ₁ /100-300	kt ⁿ	-	0,324±0,045	-	-	-	0,132±0,125	> 0,79	< 0,032
E ₂ /100-300		-	0,360±0,049	-	-	-	0,158±0,019	> 0,84	< 0,014
E ₃ /100-300		-	0,249±0,049	-	-	-	0,215±0,038	> 0,88	< 0,014
E ₄ /100-300		-	0,279±0,031	-	-	-	0,097±0,017	> 0,83	< 0,008
E ₁ /100-300	k ₁ t ⁿ + k ₂ t ²ⁿ	-	0,275±0,042	-	(-)0,023±0,005	-	0,246±0,009	> 0,91	< 0,015
E ₂ /100-300		-	0,330±0,047	-	(-)0,034±0,006	-	0,214±0,011	> 0,91	< 0,008
E ₃ /100-300		-	0,247±0,039	-	(-)0,017±0,003	-	0,272±0,003	> 0,94	< 0,015
E ₄ /100-300		-	0,233±0,019	-	(-)0,024±0,002	-	0,215±0,006	> 0,90	< 0,005
E ₁ /100-300	f _{tmax} (1 - e ^{-k₁t}) + (f _{tmax} - f _b) * (e ^{b₁t - k₁t²} / (1 + e ^{b₁t - k₁t²}))	0,350	0,068±0,006	0,498 - 0,661	0,016±0,010	240	-	> 0,97	< 0,004
E ₂ /100-300		0,360	0,087±0,016	0,478 - 0,642	0,014±0,012	245	-	> 0,91	< 0,010
E ₃ /100-300		0,390	0,060±0,013	0,515 - 0,696	0,019±0,005	210	-	> 0,94	< 0,021
E ₄ /100-300		0,250	0,089±0,006	0,348 - 0,467	0,013±0,007	235	-	> 0,95	< 0,003
I ₁ /100-300	kt ⁿ	-	0,418±0,072	-	-	-	0,117±0,028	> 0,82	< 0,021
I ₂ /100-300		-	0,337±0,077	-	-	-	0,141±0,035	> 0,84	< 0,028
I ₃ /100-300		-	0,336±0,081	-	-	-	0,100±0,025	> 0,87	< 0,005
I ₄ /100-300		-	0,269±0,014	-	-	-	0,127±0,007	> 0,81	< 0,013
I ₁ /100-300	k ₁ t ⁿ + k ₂ t ²ⁿ	-	0,338±0,065	-	(-)0,031±0,012	-	0,238±0,018	> 0,93	< 0,008
I ₂ /100-300		-	0,297±0,094	-	(-)0,031±0,031	-	0,253±0,041	> 0,93	< 0,011
I ₃ /100-300		-	0,337±0,082	-	(-)0,042±0,020	-	0,190±0,012	> 0,95	< 0,002
I ₄ /100-300		-	0,233±0,014	-	(-)0,021±0,003	-	0,239±0,011	> 0,91	< 0,006
I ₁ /100-300	f _{tmax} (1 - e ^{-k₁t}) + (f _{tmax} - f _b) * (e ^{b₁t - k₁t²} / (1 + e ^{b₁t - k₁t²}))	0,420	0,098±0,037	0,605 - 0,727	0,018±0,015	170	-	> 0,90	< 0,026
I ₂ /100-300		0,300	0,078±0,049	0,551 - 0,628	0,006±0,005	200	-	> 0,91	< 0,013
I ₃ /100-300		0,280	0,125±0,017	0,437 - 0,615	0,022±0,019	245	-	> 0,90	< 0,006
I ₄ /100-300		0,300	0,084±0,011	0,440 - 0,502	0,015±0,003	265	-	> 0,93	< 0,006

Formulación, F_n; Gelificación externa, E; Gelificación interna, I; Subíndices 1 y 2 para las esferas alginato/cacao 1% p/p y subíndices 3 y 4 para las esferas alginato/cacao 3% p/p extracto de cacao encapsulado; Además, subíndices 1 y 3 para esferas preparadas con 0,4·10⁻³ moles Ca⁺²/g alginato, y subíndices 2 y 4 para las esferas preparadas con 1·10⁻³ moles Ca⁺²/g alginato, respectivamente; Fracción absoluta del compuesto activo liberado en el tiempo t e infinito, M_t / M_∞; Volumen del medio de liberación desde 100 ml hasta 300 ml, V; Constante cinética que refleja las características estructurales del sistema o la contribución Fickiana, k o k₁; Constante cinética de disolución/relajación del polímero, k₂; Exponente cinético, n; Fracción liberada durante la primera etapa del proceso, f_b; Fracción máxima del compuesto liberado a lo largo del proceso, f_{tmax}; constante de primer orden (min⁻¹) durante la primera etapa, k₁; constante para la segunda fase de liberación (min⁻¹), k₂; tiempo durante el que se produce el máximo ratio de liberación a lo largo del proceso, t_{max}; Coeficiente de correlación, R²; Suma de cuadrados debido al error, SSE; Valores medios (±desviación estándar).

Se puede observar que los coeficientes de regresión obtenidos para el modelo de *Peppas* o *Power Law* se presentaron inferiores a R² < 0,88, este parámetro de ajuste puede explicar los valores del exponente cinético (n), los cuales se presentaron alejados respecto a los valores tabulados en literatura para geometrías esféricas, figura geométrica característica de los encapsulados utilizados en este estudio (Tabla 2.6). Considerando que n permite interpretar el mecanismo de liberación del compuesto activo, y dado los valores (n < 0,43), se puede inferir sobre la existencia de un comportamiento de difusión pseudo-Fickiano, por ello, el modelo de *Peppas* o *Power Law* es descartado del estudio para considerar otros modelos más complejos que puedan proporcionar mayor información sobre la naturaleza de

la difusión de los polifenoles desde las esferas, tales como el modelo de *Peppas-Sahlin* y *Gallagher-Corrigan*.

El ajuste al modelo de *Peppas-Sahlin*, presenta mejores coeficientes de correlación respecto a los obtenidos con el modelo de *Peppas* ($R^2 > 0,90$), así como SSE menores. En tal sentido, el modelo permite interpretar el comportamiento de liberación de los polifenoles desde las esferas de alginato/cacao, en donde se puede apreciar que los valores dados para la constante cinética k_1 son mayores respecto a los obtenidos para k_2 . Este aspecto indica que el primer término de la ecuación tiene una mayor contribución. Este término describe un comportamiento de tipo difusional. Por tanto, se puede decir que el mecanismo de liberación de los polifenoles se ve principalmente dominado por una contribución difusional Fickiana (**Spizzirri et al., 2013**). Por otro lado, los valores obtenidos de los exponentes cinéticos ($n < 0,43$), manifiestan al mismo tiempo, la existencia de un comportamiento difusional tipo pseudo-Fickiano que es asociado a la presencia de poros en la matriz del polímero encapsulante, y por tanto, se relaciona con la difusión simultánea del compuesto activo a través de la matriz hinchada y de los poros llenos con el medio de disolución. Dicho comportamiento, se denomina mecanismo de disolución/relajación. Por otra parte, este comportamiento es a su vez reflejado en la tasa negativa que aporta la constante cinética (k_2), como consecuencia de una anomalía producto de la relajación y posterior hinchamiento de la matriz polimérica que produce un ralentizamiento del proceso de liberación del principio activo, tal y como han descrito otros autores (**Siepmann y Peppas, 2012**).

En lo que respecta a los parámetros dados por el ajuste al modelo de *Gallagher-Corrigan*, se pueden observar valores de $R^2 > 0,90$. Esto parece indicar que el modelo podría explicar el mecanismo de liberación de los polifenoles desde las esferas. Sin embargo, los valores del estadístico de ajuste, SSE, se acercan más a cero al utilizar el modelo de *Peppas-Sahlin* (0,002-0,015) respecto a los obtenidos con el modelo de *Gallagher* (0,003-0,026), lo que indica que se tiene un mejor ajuste de los datos experimentales con el modelo de *Peppas-Sahlin*. Por otra parte, al observar los valores dados por las constantes cinéticas, k_1 y k_2 , éstas se presentan muy similares. Por ello, podría inferirse que el proceso de liberación, descrito por este modelo en dos etapas, ocurre prácticamente en iguales proporciones referidas a la velocidad de liberación de los polifenoles. En otras palabras, una fase inicial debida a la difusión del compuesto activo que se encuentra en la superficie de la

matriz polimérica, y que ocurre a una velocidad ligeramente mayor ($k_1 > k_2$) influenciado por el “efecto estallido”, respecto a una segunda etapa o fase que ocurre más lentamente y donde continúa la liberación de los polifenoles desde el interior de la matriz hacia el exterior producto del hinchamiento o degradación del polímero. En este sentido, es importante destacar que el modelo plantea la posibilidad de explicar el proceso de liberación debido a la degradación del polímero. Sin embargo, no se observó durante el estudio ningún tipo de degeneración de las esferas, ya que éstas se conservaron enteras y esféricas en todo momento durante la experimentación. Por tanto, la segunda etapa correspondería a un proceso de hinchamiento del polímero producto del llenado intersticial de los poros de la matriz con la disolución o medio de liberación. Tomando en cuenta estas consideraciones, las cuales resultan muy semejantes a las dadas por el modelo de *Peppas-Sahlin*, y sumando que éste proporciona otros parámetros como el exponente cinético que permiten obtener mayor información sobre el mecanismo de liberación del compuesto activo, se selecciona como modelo cinético más adecuado para explicar el mecanismo de liberación de los polifenoles desde las esferas alginato/cacao para ambos mecanismos de gelificación, el modelo de *Peppas-Sahlin*. En este sentido, se puede observar en las Figuras 4.36 y 4.37 que las curvas cinéticas de ajuste al modelo de *Gallagher-Corrigan* presentaron un comportamiento muy semejante al obtenido con el modelo de *Peppas-Sahlin*, lo que se encuentra en consonancia con las explicaciones dadas anteriormente, y por tanto, permite concluir que el proceso de liberación del compuesto activo ocurre a través de un proceso complejo y simultáneo producto de entredós mecanismos: la difusión fickiana de los polifenoles y la relajación e hinchamiento de la matriz polimérica encapsulante, modelo descrito por la ecuación cinética propuesta por *Peppas-Sahlin*. En la Figura 4.38 se muestran los perfiles de liberación de los datos experimentales y sus ajustes al modelo de *Peppas-Sahlin* obtenidos desde las esferas preparadas para las diferentes formulaciones para el resto de las diluciones utilizadas.

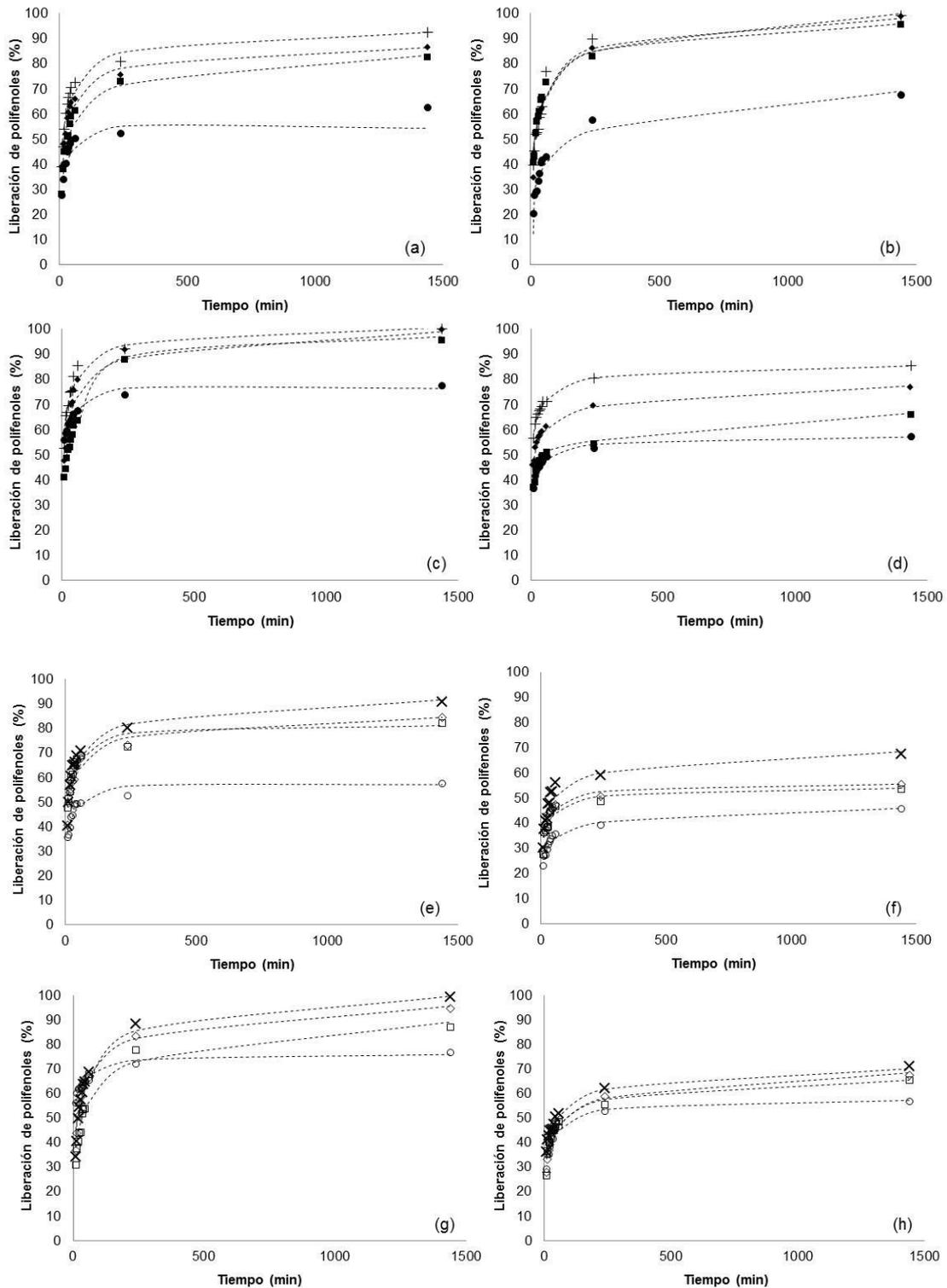


Figura 4.38 Perfiles de liberación de los polifenoles desde esferas preparadas por extrusión. Datos experimentales en puntos geométricos en diluciones acuosas de CaCl_2 ●, ○ 100, ■, □ 200, ◆, ◇ 250 y +, x 300 ml. Esferas alginato 2%/cacao 1% p/p (a, e) y alginato 2%/cacao 3% p/p (b, f) preparadas por GE y esferas alginato 2%/cacao 1% p/p (c, g) y alginato 2%/cacao 3% p/p (d, h) preparadas por GI. Esferas preparadas con $0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato puntos geométricos rellenos y esferas preparadas con $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato puntos geométricos sin relleno. Ajustes al modelo de *Peppas-Sahlin* en línea discontinua.

4.4.2.1 Influencia de la concentración de calcio en la liberación del principio activo desde las esferas.

A fin de analizar la influencia de la concentración de calcio sobre el proceso de liberación de los polifenoles, se observaron los perfiles de liberación gráficamente. La Figura 4.39 muestra los perfiles de liberación de los polifenoles durante 24 horas para las diluciones de 150 ml y 300 ml en solución acuosa con CaCl_2 para las diferentes formulaciones de esferas alginato 2%/cacao 1% o 3% p/p preparadas con varias concentraciones de calcio para ambos tipos de gelificación. Se puede observar que los perfiles de liberación (Figura 4.39a y 4.39b) para las esferas de alginato 2%/cacao 1% p/p presentan un comportamiento cinético muy parecido. Las pequeñas diferencias que puedan apreciarse referidas al porcentaje de liberación, son esperadas, al considerar que se utiliza un mayor volumen de dilución (300 ml) que, por tanto, aumenta el gradiente de concentración de polifenoles entre las esferas y el medio acuoso. En la Figura 4.39b, se muestra una liberación aparentemente más rápida de los polifenoles desde las esferas preparadas por GI respecto a las esferas obtenidas por GE, en donde se observa una clara diferencia en los porcentajes liberados al utilizar una mayor concentración de calcio que ralentiza la difusión del compuesto activo desde las esferas obtenidas por GI.

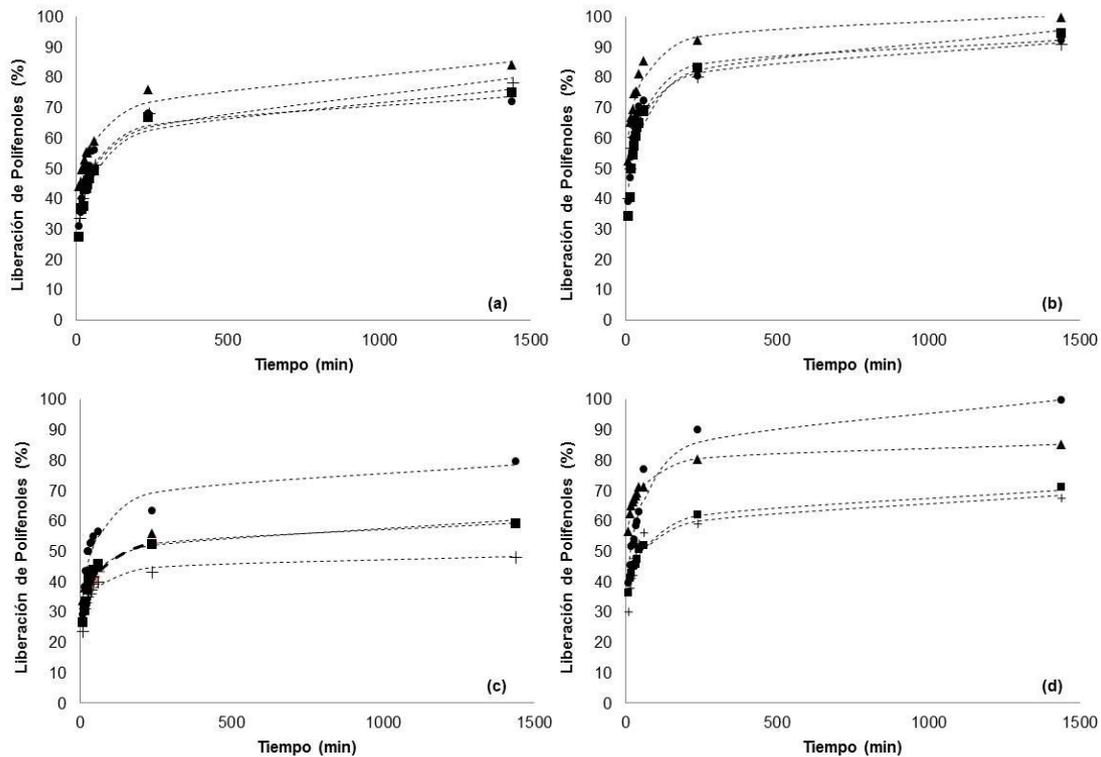


Figura 4.39 Perfil de liberación de los polifenoles desde las esferas de alginato/cacao preparadas por extrusión. Resultados experimentales en puntos geométricos y ajustes al modelo *Peppas-Sahlin* en línea discontinua. Diluciones del medio para 150 ml, (a) y 300 ml, (b) para las esferas alginato 2%/cacao 1% p/p; Diluciones del medio para 150 ml, (c) y 300 ml, (d) para las esferas alginato 2%/cacao 3% p/p; ● $0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato y $+ 1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato concentración de calcio para las esferas preparadas por GE; ▲ $0,4 \cdot 10^{-4}$ moles Ca^{+2}/g alginato y ■ $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato concentración de calcio para las esferas preparadas por GI.

Por otra parte, en los gráficos Figura 4.39c y 4.39d, para las esferas de alginato 2%/cacao 3% p/p, se puede observar que los perfiles de liberación se encuentran más diferenciados y como se mencionó anteriormente se aprecia mejor el comportamiento al utilizar un mayor volumen del medio de liberación. La Figura 4.39d muestra una influencia de la concentración de calcio al observarse un retraso en la liberación de los polifenoles cuando se utiliza una mayor concentración ($1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato) para ambos mecanismos de gelificación, debido a que el gel formado es más compacto y por tanto retrasa la liberación del principio activo. En tal sentido, se puede observar que los % de liberación obtenidos, en general, al utilizar una baja concentración de calcio ($0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato) van del 80% al 95%, mientras que en las esferas preparadas con una mayor concentración de calcio se ven disminuidos hasta aproximadamente el 60%. Este aspecto puede atribuirse a la formación de un gel de alginato más reticulado que, por tanto, dificulta la difusión de las moléculas del principio activo al exterior. En la Figura 4.39c este

efecto es probablemente enmascarado por la poca cantidad de disolución utilizada, por tanto los polifenoles liberados que se encuentran presentes en la solución en una concentración mayor impiden la salida de las moléculas fenólicas, debido a una baja fuerza impulsora. La complejidad del sistema alginato/cacao y su interacción con el disolvente podría explicar las diferencias observadas en los perfiles de liberación al emplear cantidades varias del compuesto activo, y por ello, sugerir que al utilizar una menor concentración de extracto de cacao se facilita el acceso del medio circundante a través de los poros e intersticios no ocupados en el interior de las esferas, lo que produciría un enmascaramiento de la influencia de la concentración de calcio sobre el proceso de liberación de los polifenoles. Por tanto, mayores estudios serían necesarios para determinar la influencia de la concentración de calcio en la liberación de los polifenoles de las esferas.

4.4.2.2 Influencia de la concentración de calcio en la liberación del principio activo desde geles obtenidos por gelificación interna.

En virtud de los resultados obtenidos en el apartado 4.4.1 referente a la caracterización de las esferas, se observó que las esferas alginato/cacao preparadas por el mecanismo de GI presentaron atributos de textura referidos a una mayor suavidad y menor gomosidad, los cuales son considerados en este estudio desde el punto de vista sensorial, más apropiados para ser incorporados como cápsulas bioactivas en alimentos. Por tanto, estas características de mayor suavidad y menor gomosidad requerirán de menor energía para su ruptura en boca. Estos resultados están en consonancia con la observación de una estructura más compacta y homogénea. Por otra parte, los perfiles de liberación del principio activo encapsulado, en general, mostraron que al utilizar una mayor concentración de calcio el proceso de difusión de los polifenoles se ve retrasado. En lo que respecta a la cantidad de extracto a utilizar, es importante resaltar que una mayor cantidad de compuesto activo encapsulado, proporcionará mayor cantidad de polifenoles totales disponibles. Se llevaron a cabo estudios adicionales para evaluar la influencia de la concentración de calcio en la liberación del compuesto activo, tal como se explica en el apartado 3.4.5.3, no a partir de esferas, sino a partir de geles preparados con alginato 2%/cacao 3% p/p y varias concentraciones de calcio colocados sobre una base de gelatina neutra, hacia la cual se iría difundiendo el principio activo, a fin de

determinar la influencia de la concentración de calcio sobre la liberación de los polifenoles desde el gel hacia la gelatina con el tiempo. Para ello, se analizaron varios geles de alginato 2%/cacao 3% p/p preparados a partir de $0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato y otros a partir de $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato formados por GI tras 5, 16, 21 y 38 horas. Los geles y la gelatina base se separaron, se realizó un corte en la superficie de la gelatina de 1 mm, éste se eliminó para evitar posibles interferencias provocadas por el contacto directo de la gelatina con el gel alginato/cacao. Luego, se realizó un nuevo corte a la gelatina con un espesor de 5 mm, la cual se fundió a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ser analizada por el método de Folin-Ciocalteu.

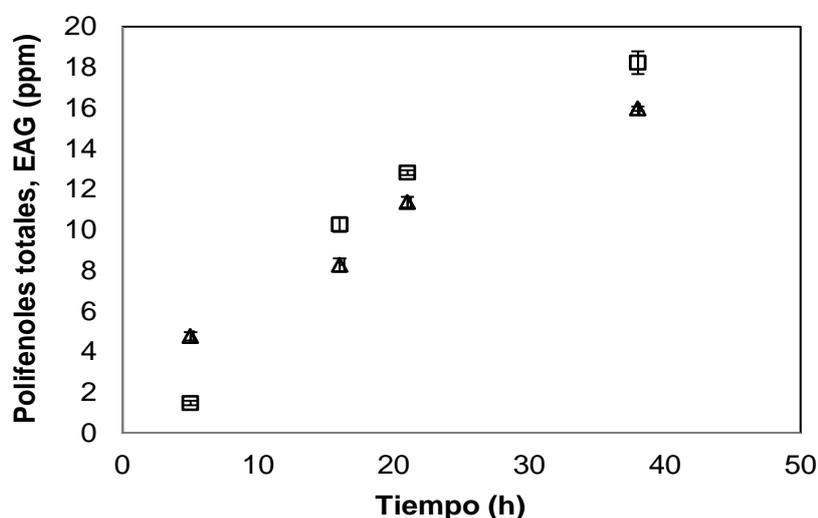


Figura 4.40 Efecto de la concentración de calcio en la liberación de los polifenoles desde geles alginato/cacao hacia gelatina neutra con el tiempo. Geles de alginato 2%/cacao 3% p/p preparados por GI con □ $0,4 \cdot 10^{-3}$ y Δ $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato para las 5, 16, 21 y 38 horas; Polifenoles totales en gelatina neutra expresados en equivalentes de ácido gálico, EAG.

En la Figura 4.40, se puede observar la evolución con el tiempo de la concentración de polifenoles en gelatina. Los resultados muestran, en general, menores cantidades de polifenoles difundidos en gelatina para el gel de alginato 2%/cacao 3% p/p preparado con la mayor concentración de calcio ($1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g de alginato). Este estudio confirma que un aumento de la concentración de calcio induce un retraso en la liberación de polifenoles, tal como se había observado en el estudio cinético con las esferas.

Por otra parte, se puede observar en la Figura 4.41 los resultados obtenidos del análisis por retrodifusión o Back Scattering (BS) a partir de los geles de alginato

2%/cacao 3% p/p preparados con diferentes concentraciones de calcio y colocados sobre una base de gelatina natural neutra en un tubo especial para mediciones de dispersión de luz (apartado 3.4.5.3). Las mediciones de BS se realizaron a 5 mm de profundidad dentro de la gelatina, a fin de determinar los polifenoles difundido desde el gel alginato/cacao a ésta con el tiempo (5, 16 21 y 38 horas). Estos resultados parecen indicar que transcurridas 5 horas los polifenoles aún no han llegado a la sección de la gelatina analizada o que la cantidad presente es pequeña para ser observada a través de los valores de retrodifusión y, por ello el %BS se muestra similar al correspondiente para la gelatina natural neutra (línea horizontal continua). Transcurridas 16 horas, se pudo observar una marcada disminución del %BS con el tiempo, lo que se atribuye a la presencia de moléculas fenólicas en la estructura de la gelatina debido a la proximidad de los resultados y valor del BS dado para el gel de alginato 2%/cacao 3% p/p (línea horizontal segmentada). En este sentido, los resultados muestran que los valores de BS decrecen continuamente al utilizar una baja concentración de calcio ($0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato) con el tiempo.

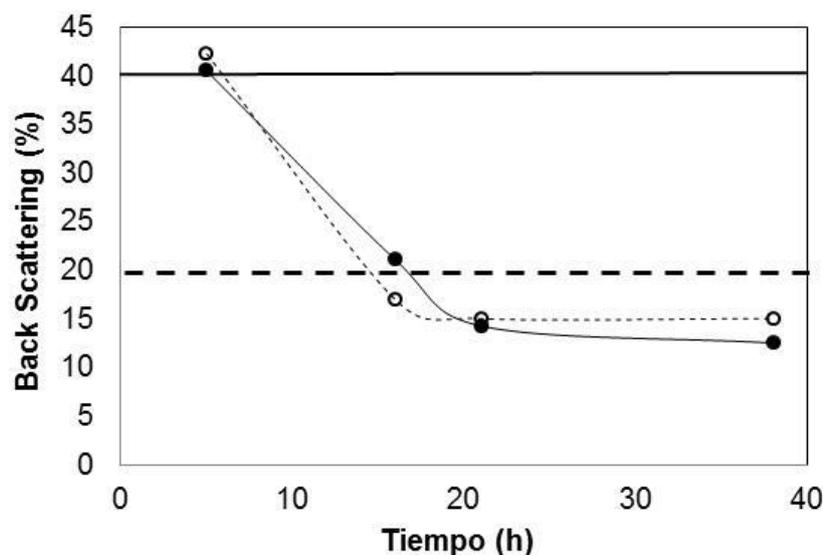


Figura 4.41 Efecto de la concentración de calcio en la liberación de los polifenoles desde geles con el tiempo. Geles de alginato 2%/cacao 3% p/p preparados por GI con \bullet $0,4 \cdot 10^{-3}$ y \circ $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato y analizados para las 5, 16, 21 y 38 horas. Porcentaje de Retrodifusión o Back Scattering, %BS gel alginato 2%/cacao 3% p/p en línea segmentada y %BS gelatina natural neutra en línea continua.

Por otro lado, al utilizar una concentración superior de calcio ($1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato) en el gel alginato/cacao, se obtuvieron valores de BS prácticamente constantes a partir de las 16 horas de análisis. Este aspecto pudo indicar que no

ocurrieron cambios importantes en la zona de la gelatina natural neutra analizada, y por tanto, que la cantidad de polifenoles totales presentes entre las 16 y 38 horas se mantuvo prácticamente igual. Lo que permite confirmar las observaciones anteriores referentes a la influencia de la concentración de calcio en la liberación de los compuestos activos presentes en el gel alginato/cacao, de manera que, al utilizar una mayor concentración de calcio ($1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato) se produce un retraso en la difusión de los polifenoles desde los geles de alginato 2%/cacao 3% p/p.

4.5 Estudio de un producto alimentario de aplicación funcional con la incorporación de los encapsulados.

Se decide estudiar un producto alimentario de aplicación funcional con la incorporación de esferas alginato/cacao o cápsulas obtenidas por el método de extrusión y preparadas a través del mecanismo de gelificación interna. Se pretende que el alimento funcional a evaluar sea un producto de aspecto atractivo e innovador al incorporar cápsulas bioactivas de tamaño, textura y color llamativo para el consumidor. En este sentido, con la finalidad de aprovechar los beneficios nutricionales proporcionados por el extracto de cacao (propiedades antioxidantes), se decide utilizar la mayor cantidad de extracto de cacao (3% p/p) empleada en este estudio, una alta concentración de calcio ($1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato) que permita inducir el retraso en la liberación de los polifenoles una vez integrados al producto alimentario, y para la preparación de las esferas alginato/cacao se utiliza el mecanismo de gelificación interna, principalmente debido a la aportación de sus propiedades texturales referidas a suavidad y menor gomosidad de las esferas. Además, esta técnica de gelificación utiliza un baño gelificante oleoso en donde los compuestos activos (polifenoles) no son solubles, y con ello se podría garantizar el máximo aprovechamiento de la cantidad de extracto de cacao encapsulado.

Este apartado estudia a través de una evaluación sensorial el grado de aceptación o rechazo del producto alimentario funcional elaborado. Por otra parte, estudia la influencia de las cápsulas en el producto, y la diferencia de adicionar el principio activo encapsulándolo o sin encapsular, a través de un análisis instrumental del perfil de textura y el ensayo de resistencia así como su evolución con el tiempo de almacenamiento. Finalmente, se realiza un análisis cualitativo de tipo

microbiológico a las muestras del producto alimentario, una vez alcanzado el tiempo final de almacenamiento establecido en el estudio.

4.5.1 Evaluación sensorial de las gelatinas enriquecidas con los encapsulados.

Las gelatinas enriquecidas con los encapsulados de alginato/cacao para un producto tipo postre fueron analizadas empleando el método de análisis de tipo discriminatorio a través de una prueba triangular. El postre de gelatina se preparó tal como se describe en el apartado 3.4.6.1 a partir de gelatina natural neutra, la cual fue aromatizada, coloreada, endulzada y a la que finalmente se incorporaron las cápsulas o esferas de alginato 2%/cacao 3% p/p preparadas previamente por extrusión con una alta concentración de calcio ($1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato) a través del mecanismo de GI. Asimismo, se elaboraron esferas de alginato 2%/frambuesa 3% p/p liofilizada en polvo (sin extracto de cacao), las cuales se colorearon para simular el color natural (burdeos) de las cápsulas bioactivas con extracto de cacao (cápsulas control) a fin de ser incorporadas en la gelatina aromatizada, coloreada y endulzada para su utilización como muestras control. Por otra parte, se prepararon esferas de alginato 2%/frambuesa 3% p/p con diferentes colores (naranja y verde) para ser incorporadas en las gelatinas enriquecidas (cápsulas bioactivas con extracto de cacao) y también en las gelatinas utilizadas como muestras control (cápsulas control sin extracto de cacao) para así elaborar un producto alimentario de aspecto atractivo e innovador. La frambuesa entera liofilizada se utilizó con el fin de obtener esferas con alto contenido de fibra que permitiera la retención de los colorantes.

La prueba triangular se llevó a cabo en el Laboratorio de Evaluación Sensorial en el Campus de Alimentación de Torribera de la Universidad de Barcelona con un grupo de 20 personas seleccionadas aleatoriamente. Los panelistas recibieron tres muestras codificadas, las cuales se presentaron aleatoriamente. A cada uno de los panelistas se le informó de que debía comenzar la degustación de izquierda a derecha, pudiendo probar cada una tantas veces fuese necesario siempre que se respetara el orden de las muestras. Se sugirió beber un poco de agua o comer un trozo de galleta para eliminar posibles interferencias. A los panelistas se les informó de que dos muestras eran idénticas y una diferente y, por tanto, debían identificar la muestra diferente e indicar su respuesta en el formulario.

Los resultados mostraron que sólo 7 panelistas de los 20 identificaron la muestra que era diferente. Esto significa que las muestras que sólo contenían las esferas de alginato control (sin extracto de cacao) y aquellas con las esferas de alginato/cacao, parecieron ser la misma al no mostrar ninguna diferencia estadísticamente significativa desde el punto de vista organoléptico para un nivel de confianza del 95%, según tabla estadística en el Apéndice 9.6 (**Mason y Nottingham, 2002**). Este resultado, indica que se tiene una probabilidad de error superior al 40%, por tanto, los panelistas sólo pueden acertar la respuesta por estimación aleatoria. En este sentido, los panelistas no pudieron identificar la diferencia entre las muestras, por ello, se tiene como resultado que el sabor del extracto de cacao (astringente y amargo) encapsulado en las esferas de alginato, no fue percibido por la mayoría de ellos, así como otras propiedades tales como la textura y el olor. Por tanto, el sabor del compuesto activo rico en polifenoles fue satisfactoriamente enmascarado a través de su encapsulación. La Figura 4.42 muestra los postres de gelatina probados por los panelistas en la prueba triangular.

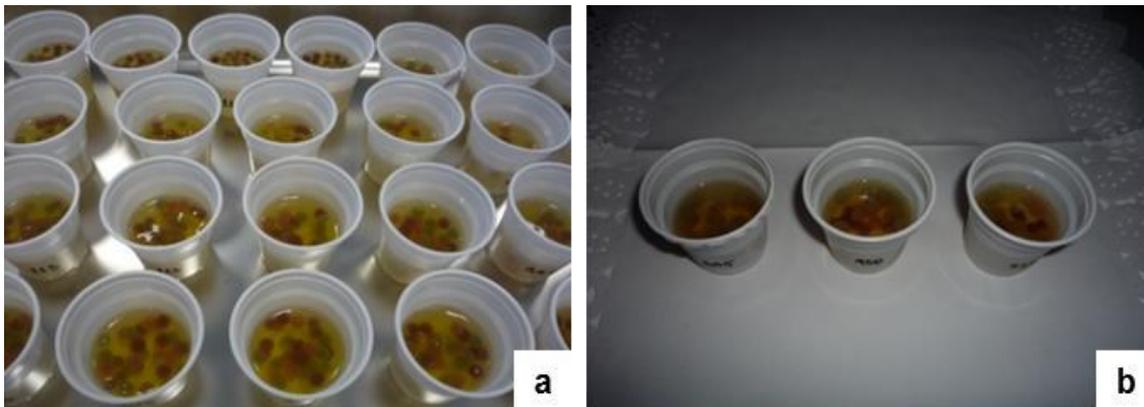


Figura 4.42 Fotografías de los postres de gelatina enriquecida con los encapsulados. Iluminación con luz natural, a; Iluminación con luces rojas, b.

4.5.2 Estudio comparativo de la texturas de las gelatinas con y sin la incorporación de encapsulados y su evolución con el tiempo de almacenamiento.

Se estudiaron distintos tipos de gelatinas preparadas sin y con la incorporación de esferas alginato/cacao como cápsulas bioactivas a fin de observar la influencia de éstas en la textura de las gelatinas, así como la diferencia de adicionar el principio activo encapsulándolo o sin encapsular, a través de un análisis

instrumental del perfil de textura (TPA) y el ensayo de resistencia, así como su evolución con el tiempo de almacenamiento.

Se analizaron cinco tipos de gelatinas, las cuales se prepararon a partir de gelatina natural neutra en cilindros de plástico. A tres muestras de gelatina se les incorporaron esferas de alginato, a una de éstas se incorporaron esferas de alginato 2% p/p (sin extracto de cacao) o GEA, a otra muestra se adicionaron esferas alginato 2%/cacao 3% p/p (cápsulas bioactivas) o GEC y en la tercera se incorporaron las cápsulas bioactivas a la gelatina natural neutra aromatizada, coloreada y endulzada con la misma formulación de las gelatinas enriquecidas tipo postre o GP (apartado 4.5.1), preparadas para el consumidor. Todas las esferas se prepararon por extrusión y formaron por gelificación interna para una alta concentración de calcio ($1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2} /g alginato). Por otra parte, se analizó otro tipo de gelatina preparada con la adición del principio activo sin encapsularlo, es decir, el extracto de cacao se añadió directamente a la gelatina natural neutra o GLC y, por último, otras más se prepararon con gelatina natural neutra sin la incorporación de esferas de alginato/cacao ni la adición del extracto de cacao o GN.

Al adicionar directamente el extracto de cacao a la gelatina neutra (sin encapsular o GLC), con la concentración de cacao utilizada para la preparación de las esferas alginato 2%/cacao 3% p/p, se observó que no ocurrió la gelificación de la misma, quedando partes líquidas y observándose la formación de un precipitado. Este aspecto se atribuye a interacciones entre los compuestos polifenólicos y la gelatina que impidieron una gelificación adecuada. Para que se produjera dicha gelificación, se duplicó la concentración de gelatina en la preparación de las GLC. Por ello, las muestras de gelatina natural neutra (GN) se prepararon considerando el doble de concentración de gelatina a fin de ser comparadas éstas con las muestras de GCL.

El análisis del perfil de textura (TPA) se realizó para los diferentes tipos de gelatinas a distintos tiempos de almacenamiento. El análisis instrumental de las muestras se llevó a cabo en un reómetro programado para realizar mediciones con fuerza normal a una velocidad de 0,025 mm/s y 17% de deformación durante dos ciclos de compresión sin provocar destrucción de las muestras, lo que permitió obtener las curvas fuerza-tiempo a través de las cuales se midieron las propiedades mecánicas de dureza, cohesividad y elasticidad, y calcularon otras más como gomosidad y masticabilidad. Por otra parte, se realizó el ensayo de resistencia (ER)

para todas las muestras de gelatinas con y sin encapsulados durante los 27 días de almacenamiento. Este ensayo de resistencia se realizó a una velocidad de compresión de 0,025 mm/s y un 70% de deformación (prueba destructiva que ocasiona el aplastamiento irreversible de la muestra) con la finalidad de medir la fuerza máxima o límite de cedencia, permitiendo así obtener una medida de la firmeza o consistencia de éstas y de sus posibles cambios de textura con el tiempo de almacenamiento. Todas las muestras de gelatinas de forma cilíndrica se cortaron desde su superficie manteniendo un espesor de 10 mm para los diferentes análisis de textura, los cuales se realizaron a una temperatura controlada de $5 \pm 0,5$ °C a fin de simular las condiciones de refrigeración y almacenamiento de las gelatinas. Dichas pruebas se realizaron al menos por triplicado para las muestras de gelatinas preparadas a partir de gelatina neutra y con la incorporación de las cápsulas bioactivas o esferas de alginato 2%/cacao 3% p/p (GEC).

4.5.2.1 Análisis del perfil de textura y ensayo de resistencia de las gelatinas con el principio activo adicionado directamente y sin añadidos y evolución con el tiempo de almacenamiento.

En la Tabla 4.15 se pueden observar los valores de dureza, cohesividad y elasticidad obtenidos para las gelatinas con el principio activo añadido directamente y sin éste. Los valores de la GCL (gelatinas con el principio activo libre o sin encapsular) se mostraron menores respecto a los obtenidos con la gelatina natural (GN) sin principio activo. Este resultado es esperable, dada la formación del precipitado observado durante el proceso de preparación de la GCL, lo que probablemente provocó la falta de una gelificación adecuada y en donde, a pesar de haber utilizado una mayor concentración de gelatina para lograr la gelificación, se pudo observar que los valores de dureza se presentaron inferiores respecto a los valores de dureza obtenidos para la GN, la cual se preparó con la misma cantidad de gelatina utilizada en las gelatinas con cacao libre o sin encapsular (GCL). Este aspecto parece indicar que existen interacciones entre los compuestos polifenólicos del extracto de cacao y la gelatina que provocan una gelificación inadecuada y, por tanto, la formación de un gel menos rígido y poco homogéneo y, por tanto, la adición del extracto libre de cacao no es adecuada para la preparación de los postres de gelatina enriquecidos.

Tabla 4.15 Propiedades mecánicas medidas a través del TPA para las gelatinas con extracto de cacao adicionado directamente y sin añadidos.

Días/Muestras	Dureza (N)		Cohesividad		Elasticidad	
	GCL	GN	GCL	GN	GCL	GN
1	0,364	1,777	0,437	0,863	0,800	0,794
2	0,288	2,801	0,514	0,849	0,799	0,799
3	0,657	2,131	0,362	0,894	0,824	0,799
6	0,423	1,565	0,409	0,808	0,817	0,792
9	0,639	0,776	0,693	0,613	0,792	0,808
13	0,539	0,756	0,267	0,649	0,800	0,792
16	0,512	0,702	0,352	0,800	0,792	0,792
20	0,450	0,961	0,260	0,680	0,800	0,792
23	0,445	0,912	0,608	0,699	0,792	0,799
27	0,445	0,820	0,608	0,427	0,792	0,792

Gelatina natural neutra con extracto de cacao libre (sin encapsular), GCL; Gelatina natural neutra sin añadidos, GN; Periodo de almacenamiento, 27 días bajo refrigeración a 5 °C.

Por otro lado, los valores de dureza para la GN mostraron un descenso importante entre el primer día y el noveno de almacenamiento (Tabla 4.15), este efecto también se pudo apreciar en los resultados obtenidos al aplicar a las muestras el ER, ya que se observó un descenso abrupto de la fuerza para el mismo periodo de estudio (Figura 4.43). Este aspecto puede ser atribuido a una degradación de la gelatina natural neutra con el tiempo de almacenamiento, ya que por observación directa, éstas mostraron cambios visibles en la apariencia, tal como agujeros en la superficie, presencia de puntos blancos en su interior y pérdida de consistencia, lo que probablemente se produjo debido a la presencia de microorganismos ya que no se utilizó ningún conservante para su preparación.

En lo que respecta al atributo cohesividad, el cual representa la fuerza de los enlaces internos del producto analizado, se puede observar que los valores de cohesión para las GCL fluctuaron a lo largo de los 27 días de almacenamiento (Tabla 4.15), este comportamiento podría ser explicado debido a la presencia de diferentes zonas en su estructura como consecuencia de una gelificación inadecuada. En ese sentido, se puede apreciar en la Figura 4.43 que los valores de fuerza o límite de cedencia de las GCL fueron bastante inferiores a los obtenidos para las GN, lo que incluso resultó en una pérdida de su consistencia con el tiempo tal que impidió la realización del ensayo de resistencia a partir del día 23 de almacenamiento ya que el sensor del instrumento no pudo detectar la superficie del gel.

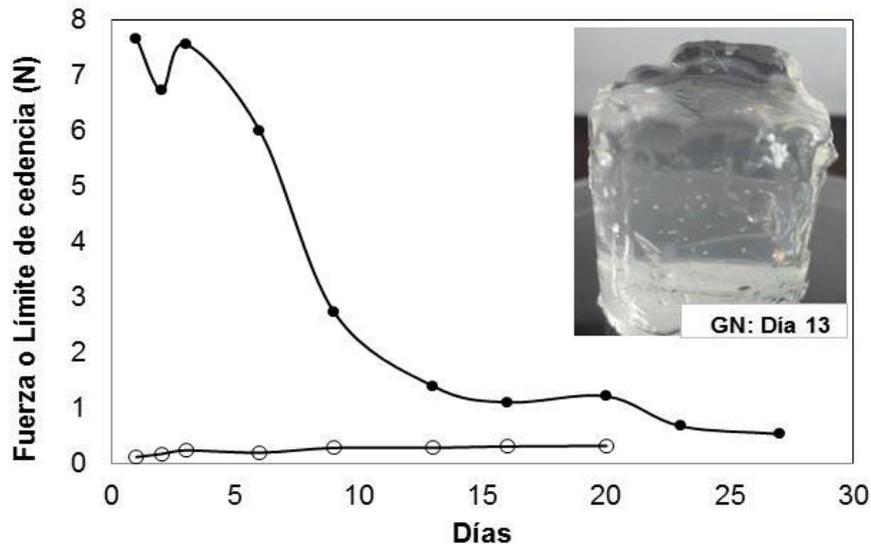


Figura 4.43 Ensayo de Resistencia de las gelatinas con el principio activo adicionado directamente y sin éste. ○ GCL, gelatina natural neutra con extracto de cacao adicionado directamente o sin encapsular; ● GN, gelatina natural neutra. Gelatinas preparadas con el doble de concentración de gelatina natural neutra respecto al utilizado para el resto de las diferentes gelatinas estudiadas con la incorporación de esferas alginato/cacao; 27 días de almacenamiento bajo refrigeración a $5 \pm 0,5$ °C. Foto: Aspecto de la GN a los 13 días de almacenamiento.

Los valores de elasticidad obtenidos para las muestras de GCL y GN se mostraron muy similares en el tiempo, este aspecto permite inferir que dadas las condiciones del TPA, las gelatinas parecen recuperarse tras los dos ciclos de compresión aplicados. Por otra parte, estos valores del índice de elasticidad más cercanos a uno, muestran que las texturas de las GCL y GN son de tipo gomoso. En la Tabla 4.16, se tienen las propiedades mecánicas calculadas a partir del TPA, especificadas como gomosidad y masticabilidad. Se puede observar que los valores de gomosidad muestran comportamientos similares a los obtenidos para la dureza de ambas muestras de gelatinas (GCL y GN), este efecto se produce debido a la importante contribución de la dureza en este atributo. Por ello, se puede inferir que la GCL requiere una menor energía para su desintegración dados los valores inferiores de gomosidad obtenidos (0,913-0,270 N) respecto a los valores de gomosidad en las GN (1,533-0,349 N). En ambos casos se observa que los valores disminuyen con el tiempo, aspecto que se atribuye a un cambio progresivo en su estructura y, que como se ha explicado anteriormente para el caso de las GCL éste puede ser producto de las interacciones entre los polifenoles y la gelatina; mientras que para las GN se puede inferir que este efecto es promovido por el posible ataque de

microorganismos dada las observaciones de su apariencia y la pérdida de consistencia.

Tabla 4.16 Propiedades mecánicas calculadas a partir de las curvas fuerza-tiempo (TPA) en las gelatinas con extracto de cacao adicionado directamente y sin añadidos.

Días/Muestras	Gomosidad (N)		Masticabilidad (N)	
	GCL	GN	GCL	GN
1	0,913	1,533	0,111	1,214
2	0,148	2,377	0,118	1,901
3	0,238	1,906	0,196	1,525
6	0,173	1,264	0,141	1,001
9	0,443	0,476	0,351	0,384
13	0,144	0,491	0,116	0,389
16	0,180	0,562	0,143	0,445
20	0,117	0,654	0,194	0,517
23	0,274	0,708	0,214	0,566
27	0,270	0,349	0,214	0,277

Gelatina con extracto de cacao libre (sin encapsular), GCL; Gelatina natural neutra sin añadidos, GN; Periodo de almacenamiento, 27 días bajo refrigeración a 5 °C.

Por otra parte, los valores de masticabilidad obtenidos para las GCL y GN, son esperables, considerando que este atributo es producto de la gomosis por la elasticidad expresada en unidades de fuerza, lo que se relaciona con la energía requerida para masticar un producto hasta un estado adecuado para la deglución, y está íntimamente vinculado a los parámetros primarios de dureza, cohesividad y elasticidad. Por tanto, estos valores en todo caso reflejan las tendencias ya observadas y explicadas para el atributo de gomosis.

4.5.2.2 Análisis del perfil de textura y ensayo de resistencia de las gelatinas con la incorporación de esferas de alginato y el principio activo encapsulado y su evolución con el tiempo de almacenamiento.

En la Tabla 4.17 se pueden observar las propiedades texturales obtenidas a partir de las curvas fuerza-tiempo del TPA correspondientes a la dureza, cohesividad, elasticidad, gomosis y masticabilidad de las diferentes gelatinas preparadas a partir de gelatina natural neutra y la incorporación de esferas de alginato 2% p/p (GEA), otras gelatinas con la adición de cápsulas bioactivas (esferas

alginato 2%/cacao 3% p/p) o GEC y, otras más tipo postre preparadas con la gelatina neutra endulzada, coloreada, aromatizada y con la incorporación de las cápsulas bioactivas o esferas alginato 2%/cacao 3% p/p (GP). Los valores obtenidos de los parámetros texturales para las muestras de gelatinas tipo GEC (realizadas por triplicado) evidencian una variabilidad adecuada considerando que los valores del coeficiente de variabilidad se presentaron menores al 10% (**Chacón-Villalobos y Pineda-Castro, 2009**). Los valores de dureza se presentaron, en general, muy irregulares para todas las muestras de gelatinas analizadas con el tiempo de almacenamiento, lo que se puede atribuir a la falta de homogeneidad presentada por la distribución aleatoria de las esferas o cápsulas en las gelatinas.

Tabla 4.17 Propiedades mecánicas medidas a través del TPA de las diferentes gelatinas preparadas con la incorporación de esferas de alginato y cápsulas bioactivas.

Días/Muestras	Dureza (N)			Cohesividad			Elasticidad		
	GEA	GP	GECprom	GEA	GP	GECprom	GEA	GP	GECprom
1	1,791	1,791	0,847±0,076	0,688	0,694	0,762±0,066	0,775	0,792	0,797±0,005
2	1,832	1,733	0,856±0,070	0,855	0,657	0,709±0,100	0,792	0,799	0,797±0,009
3	1,530	1,614	0,867±0,073	0,823	0,741	0,727±0,044	0,793	0,792	0,794±0,004
6	2,131	1,602	1,085±0,099	0,859	0,732	0,698±0,084	0,702	0,799	0,797±0,004
9	1,314	1,588	1,044±0,069	0,846	0,808	0,813±0,009	0,799	0,808	0,799±0,001
13	1,731	1,907	0,952±0,069	0,823	0,727	0,816±0,014	0,792	0,792	0,792±0,000
16	1,535	1,919	1,062±0,055	0,843	0,759	0,832±0,028	0,800	0,792	0,792±0,000
20	2,163	1,727	1,429±0,089	0,864	0,691	0,844±0,028	0,799	0,792	0,797±0,004
23	2,386	1,573	1,362±0,116	0,820	0,743	0,834±0,002	0,800	0,799	0,797±0,005
27	2,235	1,573	1,404±0,112	0,833	0,743	0,779±0,069	0,799	0,799	0,794±0,004
Días/Muestras	Gomosidad (N)			Masticabilidad (N)					
	GEA	GP	GECprom	GEA	GP	GECprom			
1	1,232	1,243	0,645±0,048	0,955	0,984	0,514±0,041			
2	1,566	1,482	0,607±0,112	1,240	1,184	0,483±0,091			
3	1,259	1,196	0,630±0,089	0,998	0,947	0,500±0,069			
6	1,830	1,173	0,757±0,181	1,285	0,937	0,603±0,084			
9	1,112	1,283	0,849±0,048	0,888	1,037	0,678±0,038			
13	1,425	1,386	0,777±0,050	1,129	1,098	0,615±0,014			
16	1,294	1,458	0,884±0,072	1,035	1,155	0,700±0,057			
20	1,869	1,193	1,206±0,105	1,493	0,945	0,961±0,087			
23	1,958	1,169	1,136±0,094	1,566	0,934	0,905±0,069			
27	1,863	1,169	1,094±0,094	1,489	0,934	0,869±0,071			

Gelatinas preparadas a partir de gelatina natural neutra con esferas alginato 2% p/p (sin extracto de cacao), GEA: Gelatina natural neutra aromatizada, coloreada y endulzada con la incorporación de cápsulas bioactivas (esferas alginato 2%/cacao 3% p/p) tipo postre, GP; Gelatina natural neutra con la incorporación de cápsulas bioactivas (esferas alginato 2%/cacao 3% p/p), GEC (valor medio±desviación estándar). Esferas preparadas por extrusión y gelificación interna con alta concentración de calcio, $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2} /g alginato. Almacenamiento durante 27 días bajo refrigeración a $5 \pm 0,5$ °C.

En lo que respecta a los valores de dureza, se puede observar que las gelatinas que contienen las esferas de alginato 2% p/p (GEA) muestran valores superiores, salvo para algunas excepciones, respecto a los valores de dureza obtenidos para las gelatinas tipo postre (GP) y, para todos los casos respecto a las GEC. En la Figura 4.44, se observan resultados similares en la fuerza o límite de

cedencia estas gelatinas con el tiempo. Las GEA presentaron un límite de cedencia o fuerza superior respecto a las GP y GEC, es decir, se mostraron más firmes las gelatinas con esferas de alginato 2% p/p (sin extracto de cacao) que las gelatinas con la incorporación de las cápsulas bioactivas. Este aspecto podría ser atribuido a la formación de puentes entre los iones calcio y los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de cacao que ha sido encapsulado en las esferas alginato/cacao o cápsulas bioactivas y, que por tanto, como ya se ha comentado, impiden la formación de mayores puntos de gelificación entre el alginato y los iones calcio disponibles (Yamada *et al.*, 2007). En este sentido, las posibles diferencias de dureza proporcionadas por las cápsulas bioactivas y las esferas de alginato sin el principio activo preparadas ambas por gelificación interna con la misma concentración de calcio a través del método de extrusión, parecen contribuir de forma distinta en la dureza final de las gelatinas preparadas con éstas.

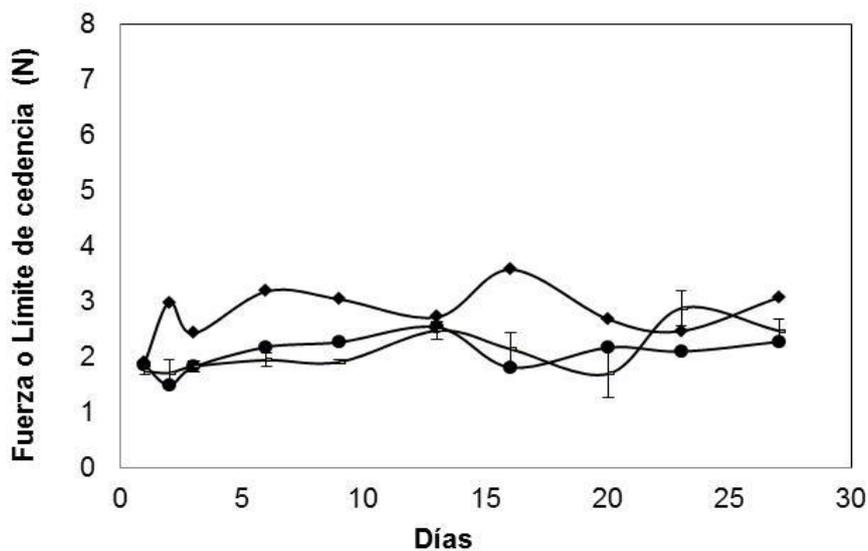


Figura 4.44 Ensayo de Resistencia de las gelatinas con la incorporación de esferas alginato y cápsulas bioactivas. Gelatinas preparadas a partir de gelatina natural neutra: gelatina natural endulzada, coloreada, aromatizada y con la adición de cápsulas bioactivas o esferas alginato 2%/cacao 3% p/p tipo postre, ● GP; Gelatina natural neutra con la incorporación de esferas alginato 2% p/p, ◆ GEA; Gelatinas natural con la incorporación de cápsulas bioactivas o esferas alginato 2%/cacao 3% p/p, ▲ GEC (valor medio±desviación estándar). Almacenamiento durante 27 días bajo refrigeración a $5 \pm 0,5$ °C. Esferas de alginato 2% y esferas alginato 2%/cacao 3% p/p preparadas por extrusión y gelificación interna.

En la Figura 4.44 se puede observar que respecto a la fuerza o límite de cedencia de las gelatinas GP y GEC se comportaron de forma similar hasta el día 13 de su almacenamiento, desde este punto, se mostraron variaciones en los valores

de fuerza para las GEC y, por el contrario, los valores de fuerza para las muestras de GP permanecieron prácticamente constantes en el tiempo. En referencia a las variaciones observadas en los valores de fuerza o límite de cedencia de las muestras de GEC y, considerando que éstas se analizaron por triplicado, al aplicar un ANOVA se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los valores de fuerza o límite de cedencia del día 6 y los valores dados a partir del día 13 de almacenamiento. Cabe resaltar que la fuerza o límite de cedencia de un producto se relaciona con la consistencia o firmeza de éste y, por tanto, con el término dureza, en cuyo caso estos valores se muestran diferentes entre las gelatinas (GP y GEC), siendo en general superiores los observados para las gelatinas GP, y que son también observados en sus valores de gomosidad. Este efecto, como se ha dicho, es esperable, dada la importante contribución de la dureza en los valores de gomosidad, sin embargo, el atributo cohesividad puede también contribuir en su valor final. En este sentido, se muestra en la Tabla 4.15 que los valores de cohesividad de las GP son menores respecto a los obtenidos en las GEC. Las posibles diferencias entre los valores de cohesividad de las GP y GEC, se pueden explicar debido a la presencia de ingredientes adicionales tales como la fructosa, colorante y aroma añadidos a la gelatina natural neutra para la preparación de la gelatina tipo postre (GP) y que, por tanto, han proporcionado una estructura interna diferente en el producto final. Por otra parte, durante el corte de las muestras (GP y GEC) y, a partir del día 13 de almacenamiento, se pudo apreciar visualmente la presencia de líquido en las GEC mientras que para la GP éste no se percibió, dicho efecto probablemente causó las fluctuaciones observadas desde este período. Esto podría explicarse debido al proceso de sinéresis que se produce en las esferas de alginato/cacao (**Chan y Dobashi, 2003; Chan et al, 2011**). Para las gelatinas tipo postre (GP) con un contenido de fructosa, este efecto probablemente ocurrió pero no fue percibido debido a la capacidad de los azúcares para formar enlaces de hidrógeno con el agua, lo que por tanto produjo su retención (**Cassini et al., 2013**) y se evidenció con valores de fuerza de ruptura prácticamente constantes hasta el último día de almacenamiento.

Los valores de elasticidad se mostraron muy similares para todas las gelatinas preparadas con la incorporación de esferas y cápsulas bioactivas, lo que permite inferir que la presencia de las diferentes esferas en el producto proporciona una textura muy parecida de tipo gomoso debido a sus valores cercanos a la unidad,

la cual parece ser controlada principalmente por la contribución de la gelatina neutra utilizada para la preparación de las diferentes muestras (Tabla 4.15), ya que estos valores de elasticidad se presentaron muy similares a los obtenidos con la GN.

Los resultados de gomosidad y masticabilidad de las muestras permiten inferir que dados los valores superiores de éstos en las GP respecto a las GEC, se requiere una mayor energía para su desintegración en boca, diferencia que es atribuida a la formulación de la gelatina tipo postre que permite mantener una consistencia del producto en el tiempo de almacenamiento estudiado, gracias a la presencia de la fructosa que facilita la retención del agua liberada por las cápsulas bioactivas debido al proceso natural de sinéresis. Esta diferencia de consistencia y aspecto entre las muestras de GEC y GP puede observarse en la Figura 4.45.

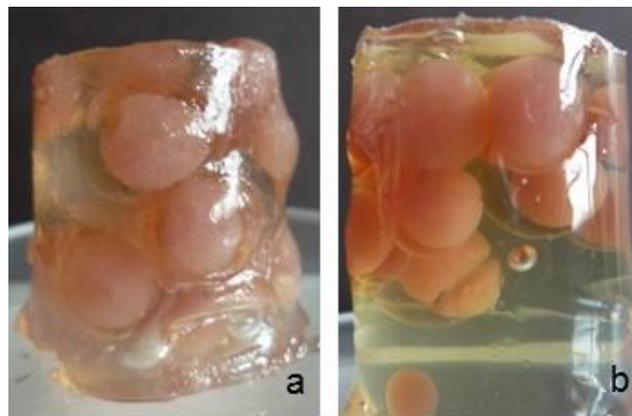


Figura 4.45 Gelatinas preparadas con cápsulas bioactivas para el análisis de TPA y ER. Gelatinas preparadas a partir de gelatina natural neutra con la incorporación de cápsulas bioactivas o esferas de alginato 2%/cacao 3% p/p, GEC (a); Gelatina natural neutra endulzada, coloreada, aromatizada y con la adición de cápsulas bioactivas tipo postre, GP (b). Fotos de las muestras a los 13 días de almacenamiento bajo refrigeración a $5\pm 0,5$ °C.

4.5.3 Evolución de la concentración de principio activo en las gelatinas con el tiempo.

En la Figura 4.46 se muestra el contenido de polifenoles totales expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG) y su variación con el tiempo en muestras de gelatina natural neutra con la adición directa del extracto de cacao (sin encapsular o libre, GCL) y otras muestras preparadas con gelatina natural neutra y la incorporación de las cápsulas bioactivas o esferas de alginato 2%/cacao 3% p/p (GEC) obtenidas por gelificación interna con una alta concentración de calcio ($1\cdot 10^{-3}$

moles Ca^{+2}/g alginato) por extrusión. Se puede observar que la concentración de los polifenoles totales en la GCL disminuye continuamente durante los 27 días de almacenamiento establecidos en el estudio con un decremento total aproximado del 46% respecto a la concentración inicial (Día 1) una vez transcurrido el periodo de estudio, lo que se atribuye a una degradación de los compuestos fenólicos causada por la humedad, el oxígeno y la luz (Fang y Bhandari, 2010). Cabe destacar que el efecto causado por la luz ocurriría en menor proporción al considerar que las muestras se encontraban debidamente protegidas.

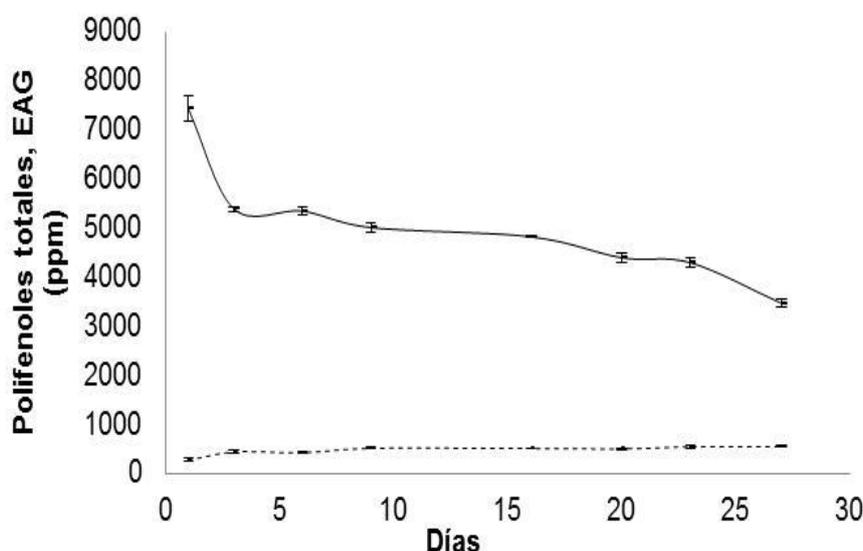


Figura 4.46 Evolución de los polifenoles en las gelatina con el tiempo. Línea continua gelatina natural neutra con extracto de cacao añadido directamente (sin encapsular o libre), GCL; Línea segmentada gelatina natural neutra con la incorporación de las cápsulas bioactivas o esferas alginato 2%/cacao 3% p/p, GEC. Esferas preparadas por GI con $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato. Polifenoles totales expresados en equivalentes de ácido gálico, EAG (ppm). Almacenadas bajo refrigeración a $5 \pm 0,5$ °C durante 27 días.

Por otra parte, al analizar el contenido de polifenoles totales difundidos en las muestras de gelatina con esferas alginato/cacao (GEC), es decir, desde las cápsulas a la gelatina natural neutra tomando únicamente para el análisis la gelatina fundida (sin esferas), se pudo observar que sólo una pequeña cantidad del compuesto activo fue liberado desde las mismas, ya que los valores de concentración presentaron únicamente una variación del 3% (Día 1) al 7% (último día) en el periodo de almacenamiento, los cuales se expresan en EAG y calcularon respecto a la concentración inicial utilizada para la preparación de los encapsulados o esferas alginato 2%/cacao 3% p/p incorporadas a las gelatinas (Figura 4.46). Este resultado

permite inferir que una gran cantidad de los polifenoles (alrededor del 93%) se mantuvieron dentro de las esferas, y por tanto, podría decirse que el principio activo encapsulado se encontró protegido de las agresiones ambientales, por lo menos, durante los 27 días de almacenamiento bajo refrigeración establecidos en el estudio.

4.5.4 Influencia del principio activo en la presencia de microorganismos en las gelatinas.

Se realizó una prueba sencilla microbiológica a muestras de GN, GCL y GEC con la finalidad de detectar la posible presencia de microorganismos una vez transcurridos los 27 días de almacenamiento. En este sentido, se prepararon varias placas tipo Petri para realizar el ensayo por siembra directa en un medio para el crecimiento de una amplia gama de organismos con agar/soja/triptona. Para el aislamiento de hongos y levaduras se preparó un medio de pH ácido con agar/dextrosa/Sabouraud y solución de antibiótico (cloranfenicol) en el agar esterilizado, cada muestra se inoculó utilizando un bastoncillo de algodón sobre la superficie de cada medio haciendo movimientos en zig-zag. Todas las muestras se incubaron a 37 °C durante 72 horas. El crecimiento o no de microorganismo se confirmó por observación directa de las diferentes muestras de gelatinas inoculadas (GN, GCL y GEC) tras el periodo de incubación (Figura 4.47).

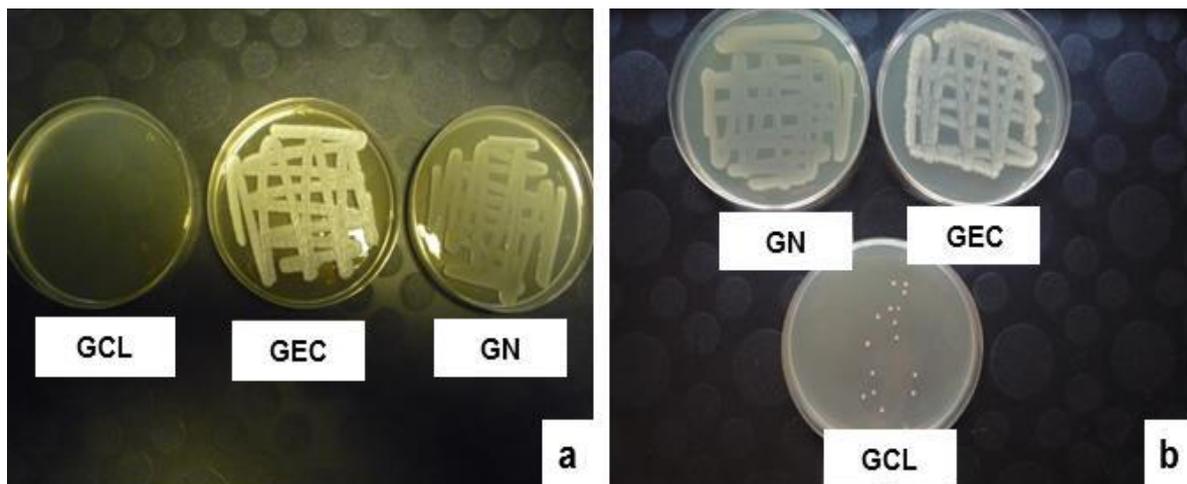


Figura 4.47 Crecimiento de microorganismos en las diferentes gelatinas tras 27 días de almacenamiento. Medio de cultivo con bactericida, a; Medio de cultivo sin bactericida, b. Bactericida: solución de antibiótico con cloranfenicol. Inoculación de las gelatinas a 37 °C por 72 horas. Gelatinas almacenadas durante 27 días bajo refrigeración a $5\pm 0,5$ °C. Gelatinas preparadas con gelatina natural neutra y la adición directa de extracto de cacao (sin encapsular o libre), GCL; Gelatina natural neutra con la incorporación de esferas alginato 2%/cacao 3% p/p, GEC; Gelatina natural neutra, GN.

El ensayo permitió confirmar la presencia de microorganismos en las muestras de GN y GEC. Para el caso de la gelatina natural neutra (GN), fue un resultado esperable considerando que se había visualizado la presencia de puntos blancos en su interior, así como la pérdida de consistencia y zonas ahuecadas (Foto: Figura 4.43). Por el contrario, no se observó crecimiento de hongos ni levaduras en la gelatina con extracto de cacao libre, GCL (Figura 4.47a). Este efecto se puede atribuir a la alta concentración de polifenoles añadidos directamente a la gelatina, los cuales parecen actuar como un agente antimicótico, propiedad de los extractos naturales ricos en polifenoles que ha sido estudiada por diferentes autores (**Benavente-García et al., 1997; Daglia, 2012**).

Por otro lado, la presencia de microorganismos en las muestras de gelatinas con las cápsulas bioactivas o esferas de alginato 2%/cacao 3% p/p (GEC) pudo indicar que los polifenoles difundidos desde las esferas (aproximadamente del 7%) no fueron suficientes para causar el mismo efecto de protección ante el crecimiento de hongos y levaduras observado en la GCL. En ese sentido, cabe resaltar que el objetivo planteado en este trabajo hizo referencia a la aplicación de los encapsulados para la elaboración de un alimento de tipo funcional, el cual fue alcanzado satisfactoriamente al confirmar que una cantidad importante del compuesto activo (93% de polifenoles) se encontró retenido por las esferas de alginato/cacao o cápsulas bioactivas tras 27 días de almacenamiento. A este postre con los polifenoles encapsulados habría que añadirle algún tipo de conservante. Con el fin de evaluar alguna otra aplicación, se podría plantear la utilización del extracto de cacao rico en polifenoles como un agente conservante o que forme parte de una formulación con otros componentes conservantes para evaluar su acción antimicrobiana, por tanto, sería necesario realizar mayores estudios que permitan determinar su efecto y la concentración requerida de extracto de cacao libre para lograr una acción protectora ante el crecimiento de microorganismos durante el almacenamiento de un producto alimentario.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se ha estudiado la gelificación de alginatos para encapsulación, llevando a cabo la caracterización del alginato, la preparación de las esferas con el principio activo encapsulado y su aplicación en alimentos funcionales. Las principales conclusiones del trabajo, clasificadas según el estudio específico al que corresponden, se presentan a continuación:

Caracterización del alginato sódico como material de partida para la preparación de los geles de alginato de calcio.

1. El ratio M/G de sus monómeros constituyentes indica una distribución de bloques heterogénea que sugiere una contribución equilibrada de cada uno éstos, lo que por tanto proporciona mayor flexibilidad al gel formado. Presenta un alto peso molecular promedio y un gran índice de polidispersidad, características que le confieren un mayor poder espesante, susceptibilidad a una degradación polimérica por cambios bruscos de pH y mayor grado de sinéresis. La presencia de sacarosa en la muestra es considerada una impureza inerte.

Caracterización reológica de los geles de alginato obtenidos con diferentes sales de calcio y mecanismos de gelificación.

1. En general, las características de los geles indican que un aumento de la $[Ca^{+2}]$ incrementa el módulo de almacenamiento producto de la formación de un gel más reticulado. Los geles obtenidos se muestran más o menos compactos según el tipo de gelificación:

a) Los geles preparados por GE muestran un incremento de las propiedades viscoelásticas al aumentar la $[Ca^{+2}]$. Este mecanismo de gelificación produce la formación de una capa de gel más reticulado en la interfase (alginato/solución $CaCl_2$) que ralentiza la difusión de los iones calcio al interior del polímero. Por tanto, estos geles son poco homogéneos, al disminuir su grado de reticulación a medida que nos adentramos en el gel.

b) Los geles preparados por GI con diferentes fuentes de calcio y para el intervalo inferior de $[Ca^{+2}]$, indican que los más fuertes pero más heterogéneos se forman a partir de $Ca(OH)_2$ como consecuencia de su mayor producto de solubilidad que, por tanto, provoca una reacción instantánea de gelificación inicial y, por ello, una estructura de gel más irregular. Los geles

con menores propiedades viscoelásticas se obtienen al utilizar CaCO_3 , aspecto atribuido a la presencia de poros en su estructura formados por la liberación de CO_2 durante la gelificación. Finalmente, los geles de características viscoelásticas intermedias con una estructura más homogénea y mejor reproducibilidad son los formados con citrato cálcico. Para la $[\text{Ca}^{+2}]$ mayor utilizada en el estudio, las propiedades reológicas se presentan independientes de la fuente de calcio utilizada.

c) Las diferencias viscoelásticas se atribuyen principalmente a la estructura del gel formado según el tipo de gelificación, siendo los geles por GI más homogéneos en su conjunto pero de red más abierta y, los geles formados por GE con una parte externa más reticulada y, por tanto, más rígida y una parte interna mucho menos reticulada debido a un déficit de calcio en el interior del gel al verse ralentizada su difusión a través de la capa externa del gel.

2. La influencia del pH en las propiedades reológicas de los geles preparados a partir de un valor de calcio superior al mínimo requerido que garantice una buena gelificación, indica que se obtiene un gel adecuadamente formado en un intervalo de pH de 4 a 10 debido a que sus propiedades viscoelásticas y aspecto visual homogéneo se presentan similares en todo el intervalo.

Estudio del método de preparación de las microesferas de alginato en emulsión por gelificación interna.

1. La naturaleza de la sal de calcio utilizada en la preparación de las microesferas afecta significativamente la distribución de tamaño de éstas al apreciarse tamaños medios sensiblemente menores en las obtenidas a partir de citrato cálcico en el rango de concentración estudiado, éstos tamaños son considerados más adecuados para ser añadidos en alimentos sin cambiar sus propiedades sensoriales.

2. La presencia de poros en la superficie de las microesferas preparadas con CaCO_3 atribuida al CO_2 liberado en el proceso de gelificación podría ocasionar una liberación prematura del compuesto activo encapsulado si se utiliza esta sal.

3. Las emulsiones preparadas a partir de Spans muestran muy poca estabilidad, con un alto grado de coalescencia, que no mejora al aumentar la concentración de tensioactivo. Por el contrario, las emulsiones formadas con PGPR se presentan muy

estables para todas las concentraciones de tensioactivo utilizadas y con un grado de coalescencia considerablemente menor.

4. La distribución de tamaños de las microesferas obtenidas a partir de las emulsiones preparadas con los diferentes tensioactivos y citrato cálcico indica que las microesferas de menor tamaño se producen con PGPR, seguidas en orden creciente con S85, S80 y S80-T80. Esto se atribuye a que el PGPR provee las emulsiones más estables y, por tanto, las microesferas de menor tamaño y menos polidispersas.

5. La correlación entre la distribución del tamaño de gota de las emulsiones y las microesferas muestra una contracción $\approx 80\%$, producto del fenómeno de sinéresis o expulsión del agua durante la gelificación.

Estudio de las variables de composición y preparación para la obtención de las microesferas en emulsión por gelificación interna con el principio activo a encapsular.

1. Para las variables de composición, un aumento de la cantidad de fase dispersa produce un efecto significativo sobre la cantidad del principio activo encapsulado al apreciarse un incremento en el porcentaje retenido de polifenoles en las microesferas.

2. Para las variables de preparación, se observa una influencia significativa de la velocidad de agitación sobre el diámetro medio y la polidispersidad de las microesferas con extracto de cacao, donde su aumento induce a la formación de microesferas más pequeñas y menos polidispersas debido al rompimiento de la fase dispersa en la oleosa en gotas más pequeñas y, por tanto, de sus microesferas.

3. La poca reproducibilidad en el diseño completo se atribuye a que en la fase dispersa el ligero aporte de acidez por parte del extracto de cacao provoca una pregelificación del alginato no controlada antes de la emulsificación.

4. Al utilizar una fase dispersa a pH controlado en el diseño fraccionado se obtiene reproducibilidad de los resultados. En este caso se tiene como único efecto significativo que un incremento de la cantidad de fase dispersa produce un aumento del porcentaje de polifenoles retenidos por las microesferas.

5. Las variables propuestas para el diseño con Catequina, uno de los principales constituyentes del extracto de cacao, no afectan significativamente a las

propiedades de las microesferas en el rango de trabajo estudiado. Por otro lado, su porcentaje medio de retención permite inferir que una cantidad importante de ésta se encuentra entre los polifenoles encapsulados en las microesferas con extracto de cacao.

6. La liberación de los polifenoles desde las microesferas se ajusta adecuadamente al modelo de *Peppas-Sahlin*.

Estudio de las esferas de alginato con principio activo preparadas por extrusión con diferentes mecanismos de gelificación.

1. El aumento de la $[Ca^{+2}]$ produce una disminución en el diámetro de las esferas, efecto reportado por otros autores y atribuido a la formación de un gel más reticulado y compacto que produce más sinéresis.

2. La estructura interna se ve influenciada por el tipo de gelificación, siendo las esferas obtenidas por GE de matriz heterogénea con un núcleo poco reticulado y una capa externa tipo cáscara, mucho más compacta. Por el contrario, las esferas formadas por GI se presentan más homogéneas debido a que el calcio ya está presente en toda la esfera y no ha de migrar de afuera hacia dentro.

3. Las propiedades texturales de las esferas obtenidas para las diferentes formulaciones indican que:

a) La dureza de las esferas formadas por GE es superior a la de las obtenidas por GI, debido a la existencia de una capa mucho más rígida en la superficie de las esferas cuando se utiliza la GE.

b) La cohesividad es superior en las preparadas por GI debido a su estructura interna más compacta y homogénea.

c) La cantidad de extracto y el tipo de gelificación afectan al índice de elasticidad de las esferas cuando se utiliza una misma $[Ca^{+2}]$, siendo más elásticas las esferas formadas por GI respecto a las obtenidas por GE.

d) Se presentan menos gomosas las esferas por GI, por tanto, éstas requerirán menor energía para su ruptura en boca.

4. La liberación de los polifenoles desde las esferas muestra un buen ajuste al modelo de *Peppas-Sahlin*, mostrando una cinética dominada por la difusión del compuesto activo a través de los poros de una matriz hinchada producto del mecanismo disolución/relajación.

5. Un aumento de la $[Ca^{+2}]$ induce un retraso en la liberación de los polifenoles desde las diferentes esferas debido a que el gel está más reticulado, siendo más notable en las obtenidas por GI.

Estudio de un producto alimentario de aplicación funcional con la incorporación de los encapsulados (gelatina con aroma a frambuesa y esferas en su interior).

1. El análisis sensorial muestra que el sabor del extracto de cacao es satisfactoriamente enmascarado a través de su encapsulación al no ser percibido por la mayoría de los panelistas.

2. El análisis del perfil de textura y el ensayo de resistencia de las diferentes gelatinas estudiadas y su evolución con el tiempo de almacenamiento indican que:

a) La utilización del extracto de cacao como añadido directo en gelatinas no es adecuada ya que la gelatina no se forma apropiadamente y además se degradan rápidamente los polifenoles debido a factores adversos del entorno.

b) La incorporación de esferas alginato/cacao en gelatinas se presentan menos firmes respecto a las gelatinas con esferas de alginato sin aditivo, lo que se atribuye a la formación de puentes entre iones calcio y polifenoles que disminuyen la disponibilidad de estos para la formación de mayores puntos de gelificación alginato/calcio y, por tanto, esferas menos reticuladas que contribuyen a una gelatina menos dura.

c) Las diferencias de dureza y cohesividad entre la gelatina tipo postre y la natural neutra se atribuyen a los ingredientes añadidos, donde la fructosa contribuye a una mayor consistencia debido a su capacidad para retener el agua expulsada por parte de las esferas.

d) El bajo contenido fenólico total difundido desde las esferas alginato/cacao a la gelatina evidencia que una cantidad importante permanece encapsulada.

6. RECOMENDACIONES

Dado los resultados obtenidos del estudio de encapsulación de principios activos con alginato a través de diferentes mecanismos de gelificación y varias técnicas para la preparación de los encapsulados como la emulsificación y la extrusión tradicionalmente utilizada, se cree conveniente hacer las siguientes recomendaciones para futuras investigaciones:

- .- Estudio y optimización de un método de separación que permita mejorar la cantidad de compuesto activo encapsulado en microesferas de alginato preparadas en emulsión por gelificación interna.

- .- Estudio de la producción masiva de cápsulas bioactivas de alginato por gelificación interna a través de diferentes dispositivos extrusores.

- .- En vista a su aplicación práctica, sería interesante evaluar y comparar la incorporación de las microesferas alginato/cacao húmedas y liofilizadas en un producto alimentario a fin de hacerlo funcional.

- .- Estudiar el efecto de los polifenoles difundidos desde encapsulados de alginato con extracto de cacao y su acción conservante en un producto alimentario.

7. BIBLIOGRAFÍA

Anal, A.K. y Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 240-251.

Arifin, D.Y., Lee, L.Y. y Wang, C-H. (2006). Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1274-1325.

Augustin, M.A. (2003). The role of microencapsulation in the development of functional dairy foods. *Aust J. Dairy Technology*, 58, 156-60.

Baker, R. (1987). *Controlled Release of Biologically Active Agents*. John Wiley & Sons, New York.

Balcerzac, J. y Mucha, M. (2009). PLA Microgranules used as carries of active substances prepared by emulsification in chitosan solution. *Process on Chemistry and application of Chitin and its*. Volumen XIV.

Barba, A.A, d'Amore, M., Chirico, S., Lamberti, G. y Titomanlio, G. (2009). A general code to predict the drug release kinetics from different shaped matrices. *European Journal Sciences*, 36(2-3), 359-368.

Becher, P. (1972). *Emulsiones: Teoría y práctica*, ed. Blume.

Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V. y Bugarsk, B. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*, 44(4), 1094-1101.

Benavente-García, O., Castillo, J., Marín, F.R., Orturo, A. y Del Rio, J.A. (1997). Uses and properties of Citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4505-4515.

Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D. y Fito, P. (2011). Functional food development: Trends and Technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 498-508.

Bhooshan, K. y Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278. <http://dx.doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>.

Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R. y Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterization of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416-423.

Bourne, M.C. (2002). Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement. 2nd Ed. Academic Press, Elsevier.

Bourne, M.C. y Szczesniak, A.S. (2003). Sensory evaluation-texture. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 5167–5174. Academic Press. Amsterdam, the Netherlands.

Box, G.E.P., Hunter, W.G. y Hunter, J.S. (1989). Estadística para experimentadores. Ed. Reverté S.A. Barcelona, España.

Brinques, G. B. y Zachia-Ayub, M. A. (2011). Effect of microencapsulation on survival of lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103(2), 123-128.

Calatayud, M., López-de-Dicastillo, C., López-Carballo, G., Vélez, D., Hernández Munóz, P. y Gavara, R. (2013). Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications. *Food Chemistry*, 139, 51-58.

Cassini, D.M., Yamul, D.K., Conforti, P.A., Pérez, V.A. y Lupano, C.E. (2013). Structure and Functionality of Whey Protein Concentrate-Based Products with Different water contents. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 217-227.

Chacón-Villalobos, A. y Pineda-Castro, M.L. (2009). Características químicas, físicas y sensoriales de un queso de cabra adaptado del tipo "Crottin de Chavignol". *Agronomía Mesoamericana*, 20(2), 297-309. ISSN: 1021-7444.

Champagne, C.P., Blahuta, N., Brion, F. y Gagnon, C. (2000). A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(6), 681-688.

Champagne, C.P. y Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184-190.

Chan, C.P. y Dobashi, T. (2003). Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 32, 257-262.

Chan L.W., Lee H.Y., Heng P.W.S. (2002). Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 259-262.

Chan, L.W., Lee, H.Y. y Heng, P.W.S. (2006). Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 63(2), 176-187.

Chan, E.S., Lee, B.B., Ravindra, P. y Poncelet, D. (2009). Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), 63-72.

Chan, E.S., Yim, Z.H., Phan, S.H., Mansa, R.F. y Ravindra, P. (2010). Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 195-201.

Chan, E., Wong, S., Lee, P., Lee, J., Ti, T.B., Zhang, Z. y Yim, Z. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83(1), 225-232.

Chandramouli, V., Kailasaphaty, K., Peiris, P. y Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions, *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 27-35.

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

Chen, L., y Subirade, M. (2007). Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate-whey protein granular microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(3), 354-362.

Choi, B.Y., Park, H.J., Hwang, S.J., y Park, J.B. (2002). Preparation of alginate beads for floating drug delivery system: Effects of CO₂ gas-forming agents. *International Journal of Pharmaceutics*, 239(1–2), 81-91.

Chuah, A.M., Kuroiwa, T., Kobayashi, I., Zhang, X. y Nakajima, M. (2009). Preparation of uniformly sized alginate microspheres using the novel combined methods of microchannel emulsification and external gelation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 351(1-3), 9-17.

Crank, J. (1975). Diffusion in a plane sheet. *The Mathematics of Diffusion*, 2nd Edition, Oxford University Press, Oxford, UK, 47-49.

Cubero, N., Monferrer, A. y Villalta, J. (2002). *Aditivos Alimentarios*. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. Sección Hidrocoloides.

Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in Biotechnology*, 23, 174-181.

Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A.S. y Martino, M.N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71(1), 126-134.

Dembczyński, R. y Jankowski, T. (2000). Growth of lactic acid bacteria in alginate/starch capsules. *Food Biotechnology. Progress in Biotechnology*. Vol. 17. (pp. 291-294). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B. V.

Desai, K.G.H. y Park, H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394.

de Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. y Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.

Dohnal, J. y Štěpánek, F. (2010). Inkjet fabrication and characterization of calcium alginate microcapsules. *Powder Technology*, 200(3), 254-259.

Draget, K.I. (2000). Handbook of hydrocolloids. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited - Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC. Chapter 22: Alginates, 379-395.

Erkan, N., Ayranci, G., y Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*rosmarinus officinalis L.*) extract, blackseed (*nigella sativa L.*) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76-82.

Espinosa-Manfugás, J. (2007). Evaluación sensorial de los Alimentos. Editorial Universitaria. <http://site.ebrary.com/lib/cbuc/docDetail.action?docID=10179643>.

Falbe, J. (1987) Surfactants in Consumer Products: Theory, Technology and Application. Springer-Verlag.

Fang, Z. y Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.

Ferry, J.D. (1980). Viscoelastic Properties of Polymers. Jhon Wiley & Sons, 3^a ed.

Friedman, H., Whitney, J. y Szczesniak, A. (1963). The texturometer a new instrument for object texture measurement. *Journal of Food Science*, 28, 390-396.

Friberg, S.E., Larsson, K. y Sjöblom (2005). Food Emulsions. Taylor & Francis, 4th ed.

Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I. y Phillips, G. O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1746-1755.

Gallagher, K.M. y Corrigan, O.I. (2000). Mechanistic aspect of the release of levamisole hydrochloride from biodegradable polymers. *Journal of Controlled release*, 69, 261-272.

Gardner, N. y Champagne, C.P. (2005). Production of *Propionibacterium shermanii* biomass and vitamin B12 on spent media. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 1236-1245.

Generalic, Eni. "Constantes del producto de solubilidad." EniG. Tabla periódica de los elementos. KTF-Split, 14 Febrero 2014. Web. 13 Marzo 2014. http://www.periodni.com/es/constantes_del_producto_de_solubilidad.html.

Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I. y Mulligan, C.N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213-224.

Goodwin, J. (2009). Colloids and interfaces with surfactants and polymers. ed. Wiley.

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 330-347.

Grasdalen, H., Larsen, B. y Smidrød, O. (1977). C NMR studies of alginate. *Carbohydrate Research*, 56, C11-C15.

Grasdalen, H., Larsen, B. y Smidrød, O. (1981). C NMR studies of monomeric composition and sequence in alginate. *Carbohydrate Research*, 89, 179-191.

Grasdalen, H. (1983). High-field H spectroscopy of alginate: Sequential structure and linkage conformations. *Carbohydrate Research*, 118, 255-260.

Griffin W.C. (1949). *Journal Society Cosmetical Chemistry*.

Guan, H., Chi, D., Yu, J., y Li, H. (2011). Encapsulated ecdysone by internal gelation of alginate microspheres for controlling its release and photostability. *Chemical Engineering Journal*, 168(1), 94-101.

Guzey, D. y McClements, J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128-130.

Hambleton, A., Debeaufort, F., Bonnotte, A. y Volleiy A. (2009). Influence of Alginate emulsion-based films structure on its barrier properties and on the protection of microencapsulated aroma compound. *Food Hydrocolloids*, 23, 2116-2124.

Harris, D.C., (2003). *Quantitative Chemical Analysis*. (6th ed.). New York: U.S.A., (Chapter 4).

Helgerud, T., Gåserød, O., Fjæreide, T., Andersen, P.O. y Larsen, C.K. (2010) Alginates. In Food stabilizers, thickeners and gelling agents. (pp. 50-72). United Kingdom: Wiley-Blackwell.

Hii, C.L., Law, C.L., Suzannah, S. y Cloke, M. (2009). Polyphenols in Cocoa (*Theobroma cacao L.*). *Asian Journal of Food Agro-Industry*, 2(04), 702-722.

Huibers, P.D.T. (1997). Evidence of synergism of non-ionic surfactants, *Langmuir*, 13, 5762-5765.

Hunter, R.J. (2001). Foundations of colloid science. Oxford University Press Inc., New York.

Imeson, A. (2010). Food stabilizers, thickeners and gelling agents. United Kingdom: Wiley-Blackwell. Chapter 4: Alginates, 50-69.

Jayalalitha, V., Balasundaram, B. y Palanidorai, R. (2012). *In vitro* assessment of microencapsulated probiotics beads. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2(1), 1-6.

Kailasapathy, K., y Masondole, L. (2005). Survival of free and microencapsulated lactobacillus acidophilus and bifidobacterium lactis and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60(3), 252-258.

Kim, H. y Fassihi, R. (1997). Application of binary polymer system in drug release rate modulation. 2. Influence of formulation variables and hydrodynamic conditions on release kinetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 323–328.

Korsmeyer, R.W., Lustig, R.S. y Peppas, N.A. (1986). Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. I. Mathematical modeling. *Journal of Polymer Science. Polymer Physics*, 24, 395–408.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14(8), 737-743.

Kris-Etherton, P.M., Lefevre, M., Beecher, G.R., Gross, M.D., Keen, C.L. y Etherton, T.D. (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: The antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, 24. 511–538.

Kruglyakov, P. (2000). Hydrophile-lipophile Balance of Surfactants and Solid Particles Physicochemical Aspects and Applications. Volume 9, 1-391. Ed. Elsevier.

Lawless, H.T. y Hildegarde, H. (2010). Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices. 2nd Ed. Springer New York.

Levi, S., Rac, V., Manojlovi, V., Raki, V., Bugarski, B., Flock, T., Krcyczmonik, K.E. y Nedovi, V. (2001). Limonene encapsulation in alginate/poly (vinyl alcohol). *Procedia Food Science*, 1, 1816-1820.

Lopretti, M., Barreiro, F., Fernández, I., Damboriarena, A., Ottati C. y Olivera A. (2007). Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. INNOTECH (Publicación anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay), 2, 19-23.

Lupo, B., González, C. y Maestro, A. (2012). Revisión: Microencapsulación con alginatos en alimentos. Técnicas y Aplicaciones. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 3(1).

<http://www.rvcta.org/Publicaciones/Vol3Num1/Volumen3Numero1.html>

Maestro, A. (2002) Reología de espesantes celulósicos para pinturas al agua: Modelización y Mecanismo de espesamiento asociativo. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.

Malkin, A.Y. y Isayev, A.I. (2006). Rheology: Concepts, Methods & Applications. Chem Tec Publishing.

Mancini, M., Moresi, M. y Rancini, R. (1999). Mechanical properties of alginate gels: empirical characterisation. *Journal of Food Engineering*, 39(4), 369-378.

Márquez, A.L., Medrano, A., Panizzolo, L.A. y Wagner, J.R. (2010). Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 341(1), 101-108.

Mark, D., Haeberle, S., Zengerle, R., Ducree, J. y Vladisavljević, G.T. (2009). Manufacture of chitosan microbeads using centrifugally driven flow of gel-forming solutions through a polymeric micronozzel. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336(2), 634-641.

Mason, R. y Nottingham, S.M. (2002). Sensory Evaluation Manual. Food 3007 and Food 7012. The University of Queensland, 53-55.

Mastromatto, M., Mastromatto, M., Conte, A. y Del Nobile, M.A. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 591-598.

McHuge, D.J. (1987). Production, properties and uses of alginates. *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds*. FAO. Fisheries Technical Paper. Chapter 2, 288, 58-115.

Mofidi, N., Aghai-Moghadam, M. y Sarbolouki, M.N. (2000). Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry*, 35(9), 885-888.

Montgomery, D.C. (2002). Diseño y Análisis de Experimentos. 2^{da} Ed. Limusa Wiley. Grupo Noriega Editores, México.

Morales, J.J., García, A. y Méndez, E. (2012). ¿Qué sabe Ud. acerca de...Cacao? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéutica*. 43(4), 79-81.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57928311010>.

Muthukumarasamy, P., y Holley, R.A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated lactobacillus reuteri. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 164-169.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A., y Orlando, P. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated lactobacillus acidophilus and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 319-323.

Núñez, C., Roca, A. y Jorba, J. (2012). Comportamiento mecánico de los materiales. Volumen I. Conceptos Fundamentales, 2^{da} Ed. Textos Docents 254, Universitat de Barcelona, España.

Ortega, N., Romero, M.P., Macià, A., Reguant, J. y Anglés, N. (2010). Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 298-305.

Otegbayo, B., Aina, J., Abbey, L., Sakyi-Dawson, E., Bokanga, M. y Asiedu, R. (2007). Texture profile analysis applied to pounded yam. *Journal of Texture Studies*, 38, 355-372.

Owen, R.W, Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B. y Bartsch, H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36(10). 1235-1247.

Özer, B., Uzun, Yakup, S. y Kirmaci, H.A. (2008). Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during kasar cheese ripening. *International Journal of Dairy Technol*, 61(3), 237-244.

Özer, B., Kirmaci, H. A., Şenel, E., Atamer, M. y Hayaloğlu, A. (2009). Improving the viability of bifidobacterium bifidum BB-12 and lactobacillus acidophilus LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, 19(1), 22-29.

Pal, K., Paulson, A.T., y Rousseau, D. (2009). Biopolymers in controlled-release delivery systems. In Modern biopolymer science. Bridging the divide between fundamental treatise and industrial application. London-Burlington-San Diego: Academic Press.

Parra-Huertas, R.A. (2010). Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(2), 5669-5684.

Pawar, S.N. y Edgar, K.J. (2012). Alginate derivation: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33, 3279-3305.

Peng, Z. y Regenstein, J.M. (2007). Comparison of Water Gel Desserts from Fish Skin and Pork Gelatins using Instrumental Measurements. *Journal of Food Science*, 72(4).

Pocorný, J. (1991). Natural antioxidants for food use. Review. *Trends in Food Science & Technology*, 2, 223-227.

Pons, M. y Fiszman, S.M. (1996). Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. Review. *Journal of Texture Studies*, 27, 597-624.

Poncelet, D. (2001). Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. In Bioartificial organs III: tissue sourcing immunoisolation and clinical trials. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 944, 74-82.

Prat, A., Tort-Martorell, X., Grima, P. y Pozueta, L. (1997). *Métodos Estadísticos. Control y mejora de la calidad*. Ediciones UPC.

Prior, R.L. y Gu, L. (2005). Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, 66(18), 2264-2280.

Ritger, P.L. y Peppas, N.A., (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Control Release*, 5, 23–36.

Rosen, M.J. (2004). *Surfactants and interfacial phenomena*. Ed. Wiley Interscience, New Jersey.

Rosenthal, A.J. (2010). Texture Profile Analysis-How important are the parameters?. *Journal of Texture Studies*, 41, 672-684.

Saez, V., Hernández, J.R. y Peniche, C. (2007). Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotecnología Aplicada*, 24(2), 98-107.

Sanguansri, L. y Augustin, M.A. (2010). Microencapsulation in functional food product development. In Functional food product development. (pp. 1-23). United Kingdom: Wiley-Blackwell.

Santi, C., Coppetta D. y Santoro S. (2008). NMR Analysis of Non Hydrolyzed Samples of Sodium Alginate. 12th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-12).

Schinella, G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., Pasamar, M.A., Muguerza, B., Ram6n, D. y R6os, J.L. (2010). Antioxidant properties of polyphenols-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*, 43, 1614-1623.

Schramm, L.L. (2005). Emulsions, foams and suspensions: Fundamentals and applications, ed. Wiley WCH, Weinheim.

Sen, M. (2011). Effects of molecular weight and ratio of gulur6nico acid to mannuronic acid on the antioxidant properties of sodium alginate fractions prepared by radiation-induced degradation. *Applied Radiation and Isotopes* 69, 126-129.

Serra-Cayuela, A., Castellari, M., Bosh-Fust6, J., Riu-Aumatell, M., Buxaderas, S. y L6pez-Tamames E. (2013). Identification of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) in Cava sparkling wines by LC-DAD-MS/MS and NMR spectrometry, *Food Chemistry*. 141(4), 3373-3380.

Seymour, R.B. y Carraher, C.E. (2002). Introducci6n a la qu6mica de los Pol6meros. Editorial Revet6, S.A.

Shah, N., y Ravula, R. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55(3), 139-144.

Siepmann, J. y G6pferich, A. (2001). Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48, 229-247.

Siepmann, J. y Peppas, N.A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced drug delivery Reviews*, 64, 163-174.

Siepmann, J. y Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 328-343.

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

Smidsrod, O. y Draget, K.I. (1996). Chemistry and physical properties of alginate. *Carbohydrate in Europe*, 14, 6-13.

Soares, J.P., Santos, J.E., Chierice, G.O. y Cavalheiro, E.T.G. (2004). Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química*, 29(2), 53-56.
www.scielo.br/eq.

Spizzirri, U.G., Hampel, S., Cirillo, G., Nicoletta, F.P., Hassen, A., Vittorio, O.; Picci, N. y lemma, F. (2013). Spherical gelatin/CHTs hybrid microgels as electro-responsive drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutical*, 448, 115-122.

Stoz, H., Müller, K.J., Ehrhart, F., Gómez, I., Shirley, S.G., Gesser, P., Zimmermann, G., Weyand, E., Sukhorukov, V.L., Forst, T., Weber, M.M., Zimmermann, H., Kulicke, W-M. y Zimmermann, U. (2009). Physicochemical features of ultra-high viscosity alginates. *Carbohydrates Research*, 344, 985-995.

Szczesniak, A.S., Brandt, M.A. y Friedman, H.H. (1963) Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objectives and the sensory methods of texture evaluation. *Journal of Food Science*, 28, 397-403.

Szczesniak, A.S. (2002) Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference Journal*, 13, 215-225.

Talwalkar, A., y Kailasapathy, K. (2003). Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(1), 36-39.

Viseras-Iborra, M.T. (2008). Desarrollo Galénico de preparados obtenidos por interacción del ácido 5-amino salicílico con Halloysita. Tesis doctoral. Universidad de Granada. ISBN: 978-84-6915652-0.

Walstra, P. (1996). Emulsion stability in: Encyclopedia of Emulsion Technology. P. Becher (Ed.) Marcel Dekker. New York. 1-62.

Wang, C.X., Cowen, C., Zhang, Z., Thomas, C.R. (2005). High-speed compression of single alginate microspheres. *Chemical Engineering Science*, 60, 6649-6657.

Wang, L., Dong, Y. Men, H., Tong, J. y Zhou, J. (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 32, 35-41.

Wang, T.T., Kwei, T.K. y Frisch, H.L. (1969). Diffusion in glassy polymers, III. *Journal Polymer Science*, A₂, 7(12), 2019-2028.

Wallgast, J. y Anklan, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33, 423-447.

Woodside, J.V., Young, I.S., Yarnell, J.W.G., Roxborough, H.E., McMaster, D., McCrum, E.E., Gey, K.F., y Evans, A. (1999). Antioxidants, but not B-group vitamins increase the resistance of low-density lipoprotein to oxidation: a randomized, factorial design, placebo-controlled trial, *Atherosclerosis*, 144(2), 419-427.

World Health Organization, WHO (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Food and Agriculture Organization of the United Nations. WHO technical report series 916. Geneva, Switzerland.

[http:// www.fao.org/docrep/005/AC911E/AC911E00.HTM#Contents](http://www.fao.org/docrep/005/AC911E/AC911E00.HTM#Contents).

Yamada, K., Abe, T. y Tanizawa, Y. (2007). Black tea stain forme don the Surface of teacups and pots. Part 2-Study of the structure change caused by aging and calcium addition. *Food Chemistry*, 103, 8-14.

Yoo, S.H., Song, Y.B., Chang, P.S. y Lee, H.G. (2006). Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38(1), 25-30.

Zhang, F.J., Cheng, G.X., y Ying, X.G. (2006). Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres, *Reactive and Functional Polymers*, 66(7), 712-719.

Zhao, Y., Carvajal, M.T., Won, Y., y Harris, M.T. (2007). Preparation of calcium alginate microgel beads in an electrodispersion reactor using an internal source of calcium carbonate nanoparticles. *Langmuir*, 23(25), 12489-12496.

Zhou, P. y Regenstein, J.M. (2007). Comparison of water gel dessert from fish skin and pork gelatins using Instrumental measurements. *Food Chemistry and Toxicology*, 72(4), 196-201.

Zuidam, N.J. y Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. En: *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. New York, NY, USA: Springer Science+Business Media, LLC.

8. GLOSARIO

Símbolos

\dot{A}	tamaño de poro del hidrogel en las columnas empleadas para CET
\AA	Angstrom, unidad de longitud de onda
A_1	área bajo la curva fuerza-tiempo de un TPA dada por la primera compresión
A_2	área bajo la curva fuerza-tiempo de un TPA dada por la segunda compresión
A_3	área de fuerza negativa dada al final de la primera compresión en un TPA
b	fracción total del compuesto liberado por el efecto estallido [-]
BS_{in}	back scattering inicial
BS_f	back scattering final
C	concentración de sólido en solución libre a un tiempo t [g.dL ⁻¹]
C_s	concentración de saturación del sólido en el medio de disolución [g.dL ⁻¹]
C_i	concentración inicial
C_f	concentración final
C_{sol}	concentración en solución de polifenoles totales liberados
CTF_{lib}	contenido total fenólico liberado
D	número de Deborah [-] coeficiente de difusión del compuesto activo [cm ² .s ⁻¹]
D_e	diámetro de esfera (μm)
D_g	diámetro de gota de la emulsión (μm)
$D[4,3]$	diámetro medio del volumen equivalente (μm)
D_{10}	diámetro medio volumen acumulado para 10% de las partículas
D_{50}	diámetro medio volumen acumulado para 50% de las partículas

D_{90}	diámetro medio volumen acumulado para 90% de las partículas
F	fuerza normal [N]
F_M	frecuencia mónada del ácido β -D-manurónico [-]
F_G	frecuencia mónada del ácido α -L-gulurónico [-]
F_{GG}	frecuencia díada sección del homopolímero tipo de bloque-G [-]
F_{MM}	frecuencia díada sección del homopolímero tipo de bloque-M [-]
F_{GM}	frecuencia díada sección del heteropolímero donde los bloques G y M se alternan [-]
F_{MG}	frecuencia díada sección del heteropolímero donde los bloques M y G se alternan [-]
F_{MGM}	frecuencia tríada sección del heteropolímero donde los bloques M y G se alternan [-]
F_{GGM}	frecuencia tríada sección del heteropolímero donde los bloques M y G se alternan [-]
f_t	fracción del compuesto liberado en el tiempo t en el modelo <i>Gallagher-Corrigan</i> [-]
f_{tmax}	fracción máxima de compuesto liberado durante el proceso en el modelo <i>Gallagher-Corrigan</i> [-]
f_B	fracción del compuesto activo liberado durante la primera etapa o “efecto estallido” en el modelo <i>Gallagher-Corrigan</i> [-]
G	monómeros de ácido α -L-gulurónico o 1-4 enlace ácido α -gulopyranosyluronic [-]
	constante de proporcionalidad o módulo elástico de la Ley de <i>Hooke</i> [Pa]
GG	enlace glucosídico diaxial del monómero ácido α -L-gulurónico
MG	enlace glucosídico ecuatorial-axial de los monómeros M y G

- G^* módulo complejo en cizalla [Pa]
- G' módulo de almacenamiento en cizalla [Pa]
- G'' módulo de pérdidas en cizalla [Pa]
- H masa molecular de los grupos hidrofílicos de la molécula tensioactiva [Da]
- $J(t)$ capacitancia en cizalla [1/Pa]
- k índice de consistencia [-]
- número de factores en un diseño factorial [-]
- constante cinética que depende de las condiciones experimentales y refleja las características estructurales y geométricas del sistema polimérico/compuesto activo [s^{-1} , min^{-1}]
- k_I constante de proporcionalidad para el modelo de primer orden [s^{-1} , min^{-1}]
- k' constante cinética al modelo de *Higuchi* empleada hasta un 60% de liberación del compuesto activo [s^{-1} , min^{-1}]
- k_1 constante que representa el proceso de difusión en el modelo *Peppas-Sahlin* [s^{-1} , min^{-1}]
- constante cinética de primer orden en el modelo *Gallagher-Corrigan* [s^{-1} , min^{-1}]
- k_2 constante que refleja la relajación del polímero en el modelo *Peppas-Sahlin* [s^{-1} , min^{-1}]
- constante cinética de la segunda etapa de liberación en el modelo *Gallagher-Corrigan* [s^{-1} , min^{-1}]
- K_{cg} factor de contracción por gelificación
- L masa molecular de los grupos lipofílicos de la molécula tensioactiva [Da]
- M monómeros de ácido β -D-manurónico o 1,4-enlace ácido β -D-mannopyranosyluronic [-]
- MM enlace glucosídico diecuatorial del monómero ácido β -D-manurónico

M_t	cantidad de compuesto activo liberado en el tiempo t [mg]
M_0	cantidad de compuesto activo inicial en solución [mg]
M_∞	cantidad de compuesto activo que se liberaría a tiempo infinito [mg]
M/G	relación entre los bloques M y G en la estructura polimérica del alginato [-]
m	exponente de difusión Fickiano válido para cualquier geometría del sistema de liberación modelo de <i>Peppas y Sahlin</i> [-]
n	exponente cinético que describe el mecanismo de liberación [-]
n_1, n_2	tamaño de las muestras
$N_{G>1}$	longitud media de bloques-G mayores de 1 [-]
S_p	desviación estándar ponderada
t	tiempo [s, min]
t_{ret}	tiempo de retraso en el que se percibe una cantidad de compuesto activo liberado una vez ocurrido el efecto estallido [s, min]
t_{2max}	tiempo máximo del ratio de liberación del compuesto activo en el modelo <i>Gallagher-Corrigan</i> [s, min]
w	fracción en peso [-]
x_1, x_2	variables de estudio en un diseño experimental
y	deformación [-]

Griegas

α	primer átomo unido al grupo funcional, enlace O-glucosídico mediante el cual se unen entre sí dos o más monosacáridos [-]
	distancia desde un punto central a un punto del diseño axial o estrella [-]
	factor de probabilidad estadístico dado para un nivel de confianza

β	segundo átomo unido al grupo funcional, enlace O-glucosídico mediante el cual se unen entre sí dos o más monosacáridos [-]
δ	desfase entre el error y la deformación [rad]
ε	porosidad de la matriz
τ	factor de tortuosidad del sistema
γ	deformación instantánea [-]
$\dot{\gamma}$	gradiente de velocidad o velocidad de deformación [s^{-1}]
γ_0	amplitud máxima de deformación en cizalla oscilatoria [-]
n	viscosidad [Pa.s] índice de comportamiento [-]
n'	viscosidad aparente [Pa.s]
φ	fracción de volumen ocupada por la fase dispersa [-]
μ	viscosidad dinámica [Pa.s]
σ	esfuerzo cortante [Pa]
σ_0	esfuerzo umbral [Pa]
$\dot{\sigma}$	velocidad de cambio del esfuerzo cortante [Pa/s]
\emptyset	diámetro de gota en emulsiones
ω	frecuencia de oscilación [$rad.s^{-1}$, Hz]

Acrónimos

ANOVA	análisis de varianza
BS	back scattering o retrodifusión de la luz dispersada en una muestra
CAD	consumo aceptable diaria en peso corporal por día [mg/kg]
CCD	diseño central compuesto

CET	cromatografía de exclusión por tamaño
DE	desviación estándar
DRX	difracción de rayos X
DSC	calorimetría diferencial de barrido
EAG	equivalentes de ácido gálico análisis de <i>Folin-Ciocalteu</i>
ER	ensayo de resistencia
GCL	gelatina con extracto de cacao libre o sin encapsular
GE	mecanismo de gelificación externa
GEC	gelatinas con esferas de alginato/cacao
GEA	gelatinas con esferas de alginato
GI	mecanismo de gelificación interna
GN	gelatina natural neutra
GPE	gelatinas tipo postre enriquecidas con las esferas alginato/cacao
HLB	balance hidrofílico-lipofílico de los tensioactivos
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IP	índice de polidispersidad respecto a los peso moleculares
IR	índice de refracción
LC	límite de cedencia
RMN	resonancia magnética nuclear o espectroscopía de alta resolución
S80	tensioactivo Span 80
S85	tensioactivo Span 85
SEM	microscopía electrónica de barrido

SPAN	factor de polidispersidad o amplitud de la distribución de tamaño de la muestra
T20	tensioactivo Tween 20
T80	tensioactivo Tween 80
TPA	análisis de perfil de textura para medición de propiedades mecánicas
O/W	emulsiones aceite en agua
O/W/O	emulsión de aceite en agua en aceite
PGPR	polirricinoleato de poliglicerol
UPLC	cromatografía líquida de ultra resolución
W/O	emulsiones agua en aceite
W/O/W	emulsión de agua en aceite en agua

9. APÉNDICES

9.1 Datos para la caracterización del alginato sódico por RMN, CET, DSC y Refractometría.

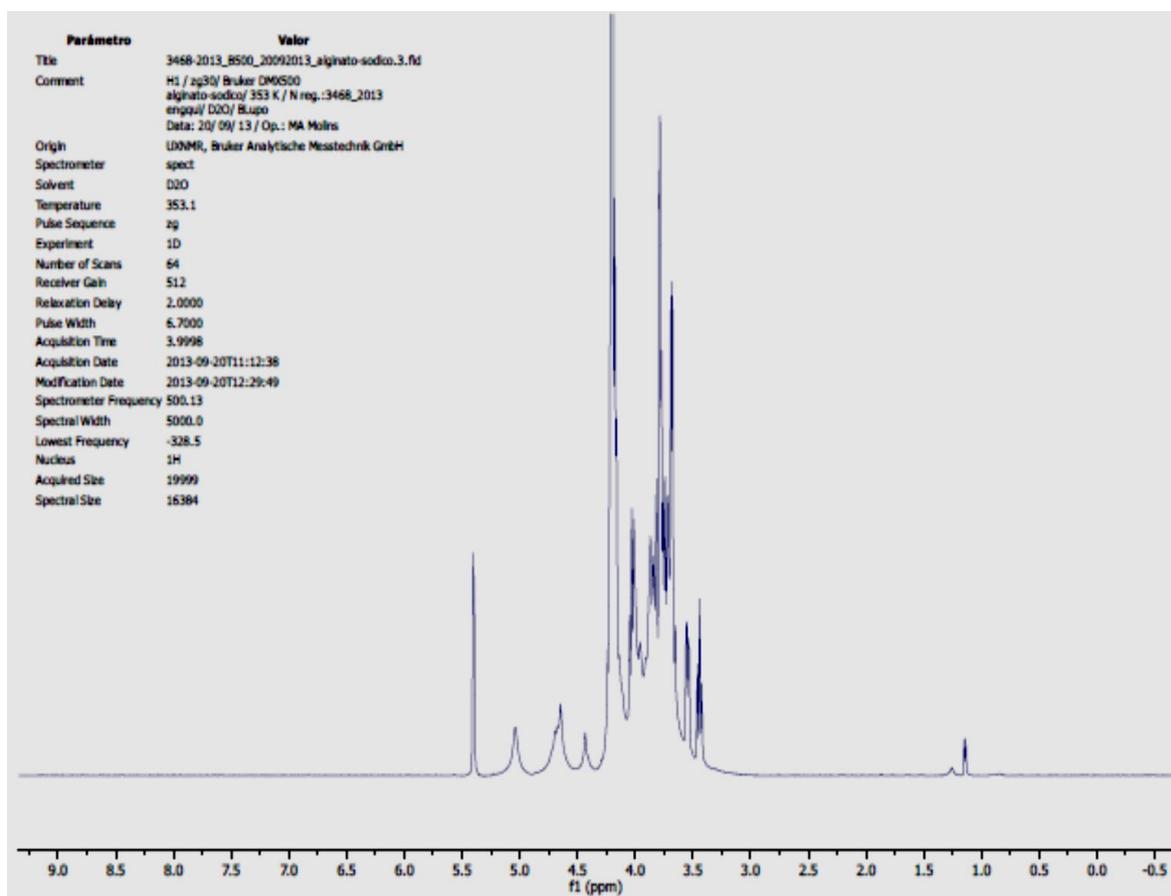


Figura 9.1 Espectro del alginato sódico (20 mg/ml) sin hidrolizar a partir de la adquisición del espectro H1 a 80 °C obtenido por RMN.

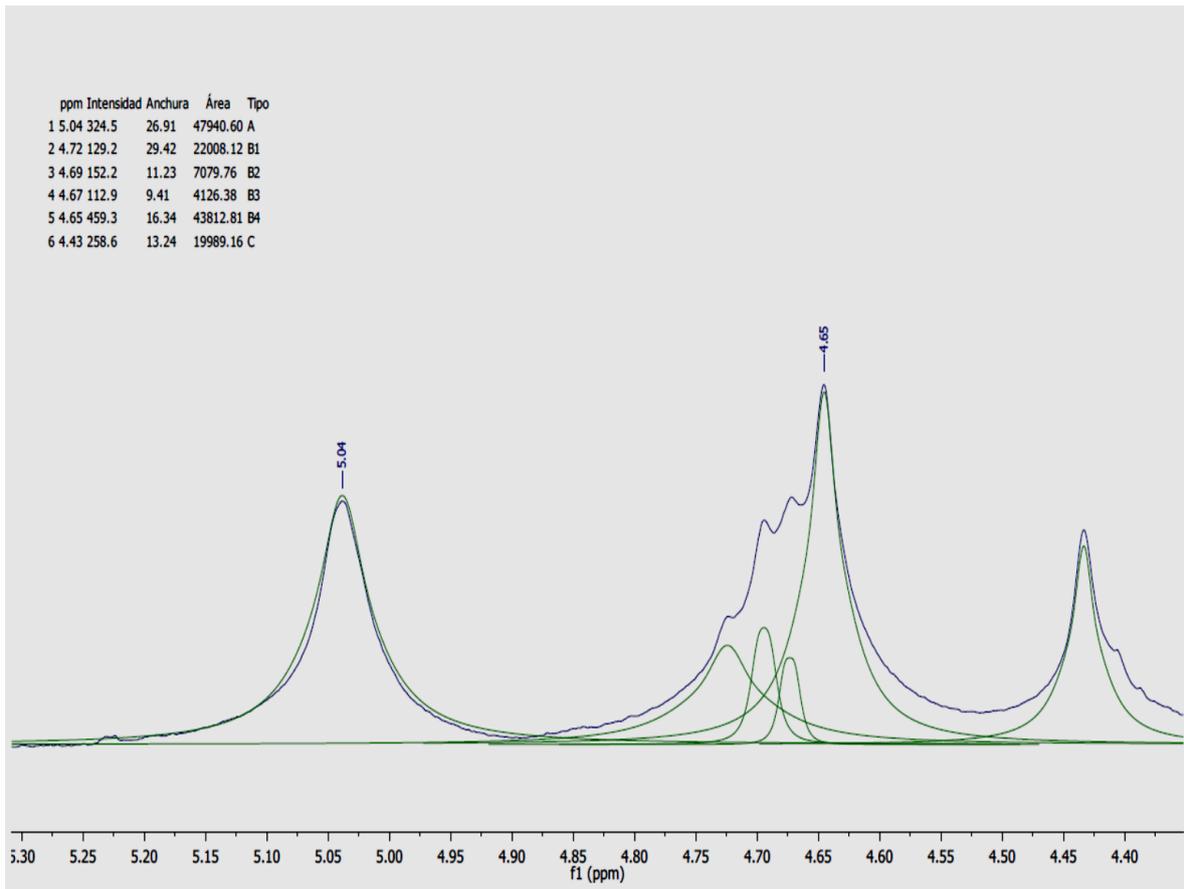
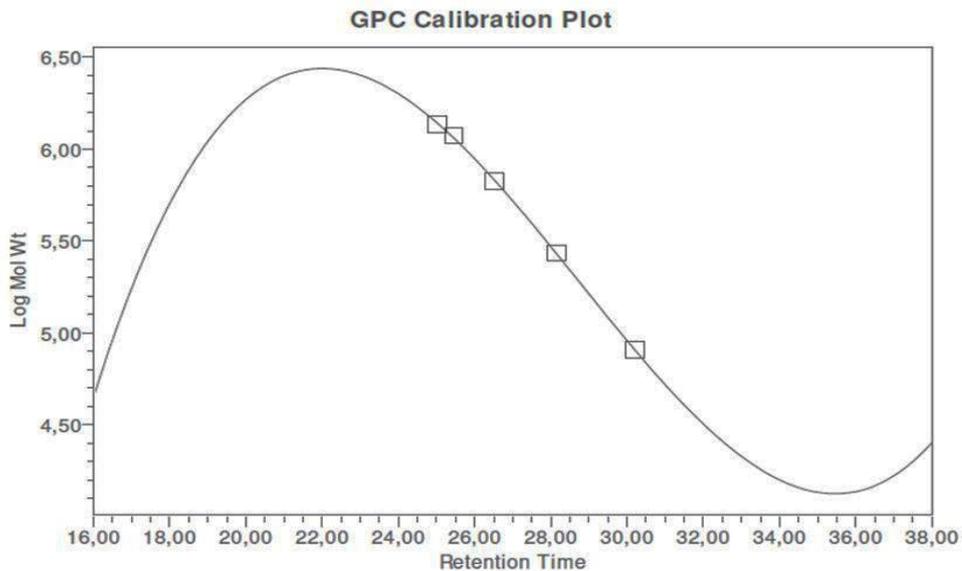


Figura 9.2 Espectro del alginato de sodio (20 mg/ml) deconvolución de los picos a partir del programa MestreNova v.8.1.2 para el cálculo de su composición monomérica.



$$\text{Equation Log Mol Wt} = -3,23e+001 + 4,44e+000 T^1 - 1,64e-001 T^2 + 1,90e-003 T^3$$

Figura 9.3 Ecuación de ajuste obtenida del calibrado con dextrans para la determinación del peso molecular del alginato sódico por CET.

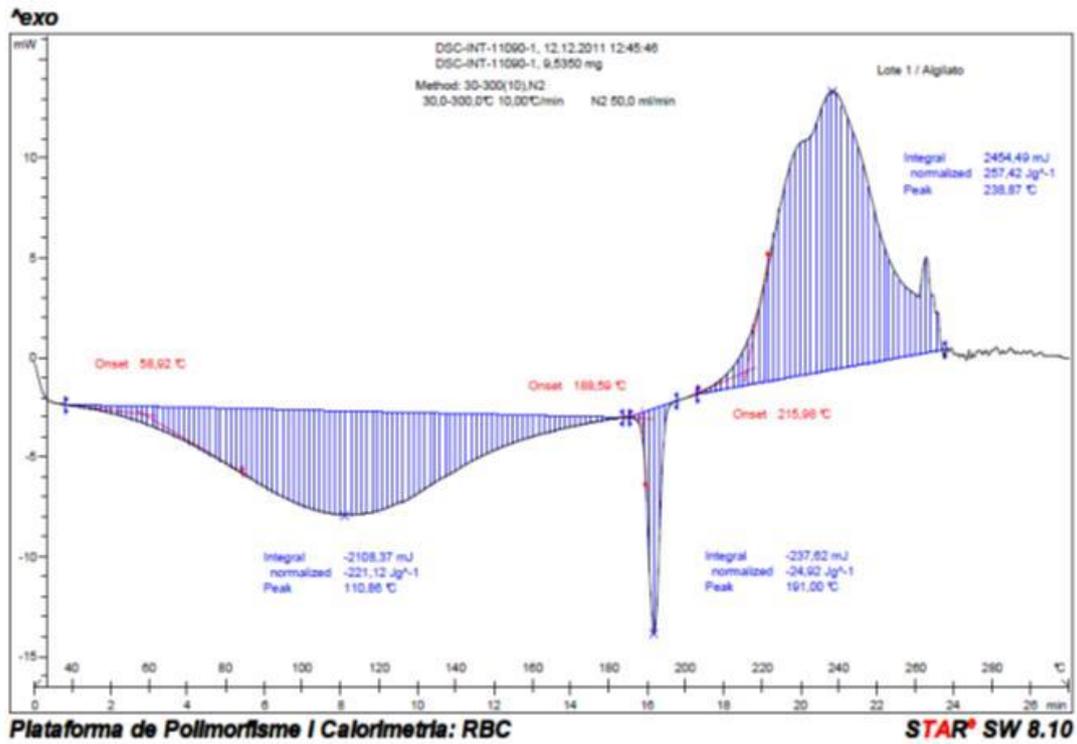


Figura 9.4 Termograma del alginato sódico Lote 1 (Panreac).

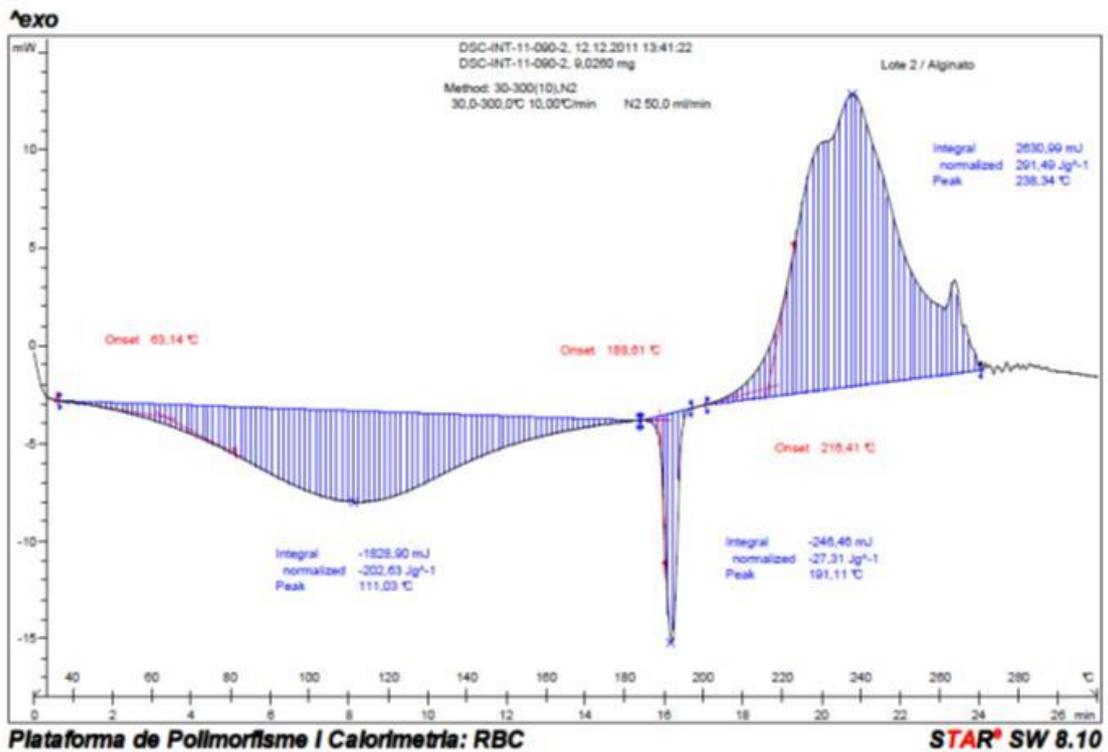


Figura 9.5 Termograma del alginato sódico Lote 2 (Panreac).

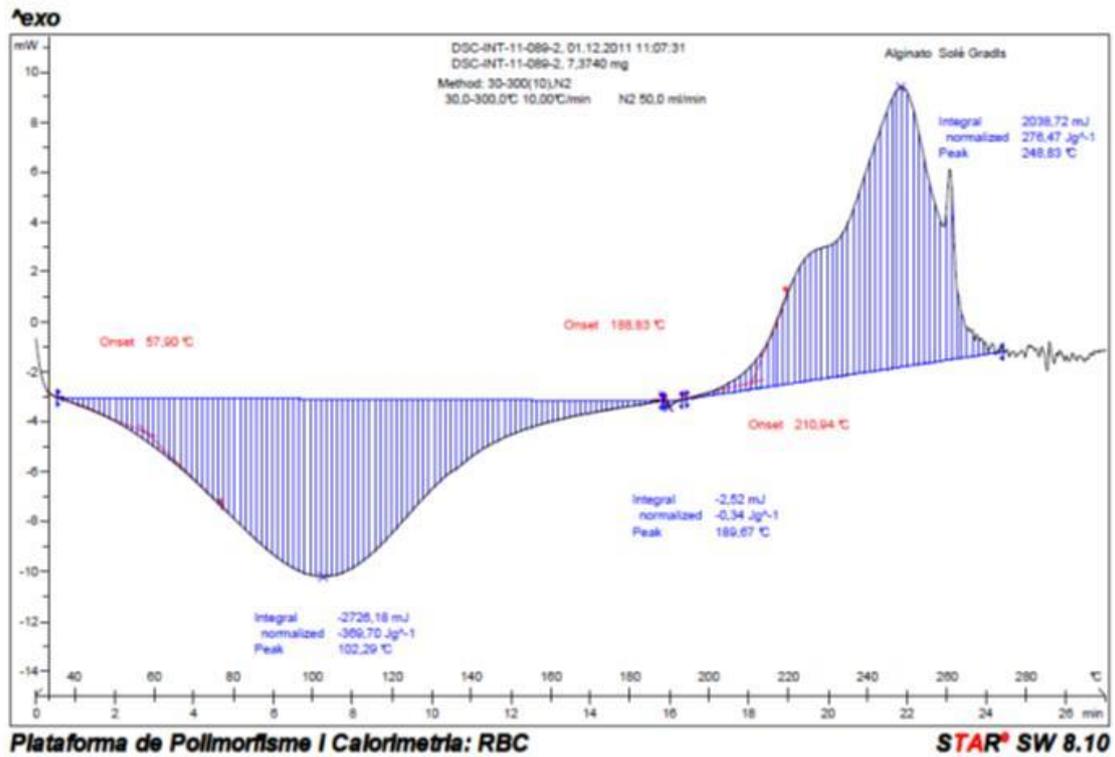


Figura 9.6 Termograma del alginato sódico (Solé Graell).

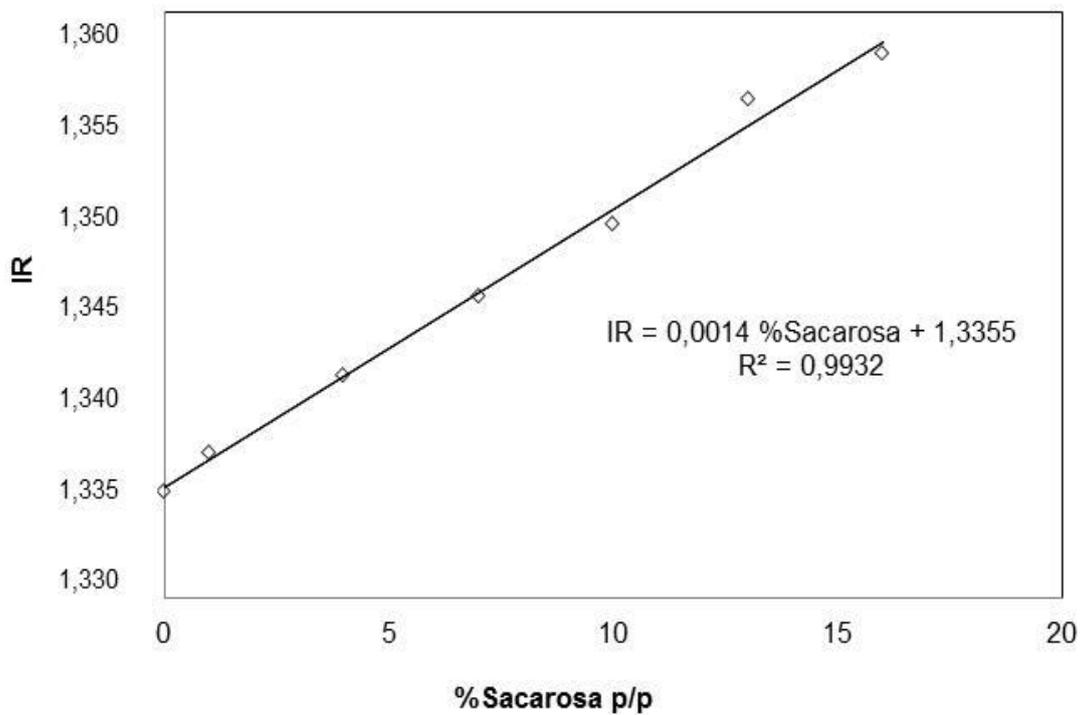


Figura 9.7 Recta de calibrado realizada a partir de alginato sódico 2% p/p (Solé Graell) y sacarosa comercial a diferentes concentraciones. IR: índice de refracción.

9.2 Propiedades reológicas de los geles de alginato preparados con diferentes fuentes de calcio y mecanismos de gelificación.

Tabla 9.1 Geles preparados por gelificación externa con diferentes concentraciones de calcio a partir de soluciones acuosas de CaCl₂.

f (Hz)	1,2·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato						0,6·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato					
	G ₁ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G ₁ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' Prom	DS	G ₁ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G ₁ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' Prom	DS
0,01	4601	670,4	5849	2011	5225,0	624,0	1138	115,8	985,7	92,25	1061,9	76,15
0,014	4580	1345	7167	88,34	5873,5	1293,5	1158	94,03	989,8	77,25	1073,9	84,10
0,022	5107	971,6	7305	619,1	6206,0	1099,0	1175	88,97	995,3	68,72	1085,2	89,85
0,032	5247	687,4	7220	1041	6233,5	986,5	1190	85,78	1003	65,60	1096,5	93,50
0,046	5338	755,2	7348	795,7	6343,0	1005,0	1206	85,10	1010	62,74	1108,0	98,0
0,068	5439	523,0	7757	800,7	6598,0	1159,0	1222	85,25	1018	61,80	1120,0	102,0
0,1	5545	498,9	8025	818,9	6785,0	1240,0	1239	86,05	1027	60,49	1133,0	106,0
0,147	5627	519,1	8299	790,6	6963,0	1336,0	1257	89,69	1036	64,38	1146,5	110,5
0,215	5716	481,3	8533	794,6	7124,5	1408,5	1276	94,42	1047	65,49	1161,5	114,5
0,316	5808	472,1	8740	802,6	7274,0	1466,0	1296	98,01	1058	65,56	1177,0	119,0
0,464	5911	478,6	8970	836,9	7440,5	1529,5	1317	104,7	1070	69,29	1193,5	123,5
0,681	6001	475,1	9174	853,7	7587,5	1586,5	1339	111,2	1084	73,30	1211,5	127,5
1,0	6102	501,5	9378	890,2	7740,0	1638,0	1371	123,1	1099	80,75	1235,0	136,0
1,468	6217	514,1	9586	914,8	7901,5	1684,5	1372	146,3	1115	87,51	1243,5	128,5
2,154	6296	582,5	9801	932,4	8048,5	1752,5	1505	94,54	1135	98,52	1320,0	185,0
3,162	6400	567,2	10020	902,5	8210,0	1810,0	1491	291,0	1160	101,5	1325,5	165,5
4,642	6654	1121	10280	1085	8467,0	1813,0	1342	220,7	1200	117,0	1271,0	71,0
6,813	6477	1050	10090	778,5	8283,5	1806,5	1369	501,7	1254	64,53	1311,5	57,5
10,0	6142	777,0	11330	1503	8736,0	2594,0	1639	1663	1255	262,2	1447,0	192,0

f (Hz)	0,4·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato						0,1·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato					
	G ₁ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G ₁ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' Prom	DS	G ₁ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G ₁ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' Prom	DS
0,01	61,34	48,42	280,5	89,19	170,9	109,6	21,41	13,09	0,048	0,385	10,73	10,60
0,014	68,54	52,59	330,8	49,44	199,7	131,1	26,17	13,34	0,058	0,478	13,11	13,01
0,022	81,86	56,14	342,9	44,52	212,4	130,5	30,14	13,99	0,088	0,651	15,11	15,03
0,032	97,24	59,57	353,2	42,80	225,2	127,9	33,65	14,82	0,145	0,916	16,89	16,75
0,046	113,1	62,07	362,4	42,85	237,8	124,7	37,25	15,78	0,234	1,292	18,74	18,51
0,068	128,9	64,04	371,3	43,70	250,1	121,2	41,05	16,88	0,378	1,822	20,71	20,34
0,1	144,9	65,43	380,3	44,60	262,6	117,7	45,02	18,13	0,611	2,557	22,82	22,20
0,147	160,6	67,19	389,6	46,78	275,1	114,5	49,18	19,77	0,967	3,555	25,07	24,11
0,215	175,8	69,47	399,5	49,51	287,7	111,9	53,61	21,79	1,497	4,891	27,55	26,06
0,316	191,7	71,86	410,2	52,0	300,9	109,3	58,47	24,28	2,296	6,660	30,38	28,09
0,464	207,3	75,68	421,7	55,86	314,5	107,2	63,76	27,61	3,425	8,968	33,59	30,17
0,681	223,5	80,59	434,3	60,09	328,9	105,4	69,70	31,82	5,031	11,92	37,37	32,33
1,0	239,1	87,02	447,9	66,37	343,5	104,4	75,28	36,20	7,248	15,69	41,26	34,02
1,468	256,4	96,85	462,7	72,54	359,6	103,2	85,57	43,62	10,30	20,33	47,94	37,64
2,154	257,5	115,1	478,6	80,80	368,1	110,6	109,6	12,66	14,43	25,82	62,02	47,59
3,162	326,3	136,6	500,1	88,90	413,2	86,89	444,6	90,47	20,08	32,41	23,23	212,3
4,642	39,75	409,8	517,2	95,78	278,5	238,7	163,6	196,2	25,42	37,55	94,51	69,09
6,813	575,8	2044	550,6	116,6	563,2	12,60	783,7	444,3	28,65	46,53	406,18	377,5
10,0	150,8	1047	524,8	147,3	337,8	187,0	335,4	514,9	54,41	53,92	194,91	140,5

prom: promedio; DS: desviación estándar.

Tabla 9.2 Barrido de frecuencia para la cuantificación de calcio mínimo requerido para la gelificación de los geles de alginato preparados por gelificación externa.

f (Hz)	0,1			1,0			1,5		
moles Ca⁺²/g alginato ($\cdot 10^{-3}$)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G* (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G* (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G* (Pa)
0,011	0,36	2,25	2,28	5,13	15,7	16,5	6,32	19,6	20,6
0,034	45,0	18,1	48,5	75,3	36,2	83,5	85,6	43,6	96,1
0,056	87,5	29,8	92,4	137,1	55,1	147,8	145,1	63,4	158,3
0,079	145,0	65,4	159,0	239,1	87,0	254,4	256,4	96,9	274,0
0,113	1239	86,1	1242	1371	123,1	1376	1372	146,3	1380
0,146	1027	60,5	1029	1099	80,8	1102	1115	87,5	1118
0,169	1093	80,7	1096	1168	94,4	1172	1198	103,6	1203
0,203	3042	316,2	3059	3349	289,6	3362	3408	296,1	3421
0,225	5545	498,9	5567	6102	501,5	6123	6217	514,1	6239
0,338	8025	818,9	8067	9378	890,2	9420	9586	914,8	9630
0,451	22670	3244	22900	27480	3355	27680	28290	3357	28480

f (Hz)	2,0			5,0		
moles Ca⁺²/g alginato ($\cdot 10^{-3}$)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G* (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G* (Pa)
0,011	12,3	27,3	29,9	43,1	43,1	60,9
0,034	109,6	12,7	110,3	163,6	196,2	255,5
0,056	177,0	82,4	195,3	327,5	5,35	327,5
0,079	257,5	115,1	282,1	39,8	409,8	411,7
0,113	1505	94,5	1508	1342	220,7	1360
0,146	1135	98,5	1139	1200	117,0	1206
0,169	1197	98,6	1201	1241	80,72	1244
0,203	3464	317,6	3478	3819	405,4	3840
0,225	6296	582,5	6323	6654	1121	6748
0,338	9801	932,4	9845	10280	1085	10330
0,451	28970	3725	29210	30590	3762	30820

Tabla 9.3 Propiedades reológicas de los geles de alginato a diferentes pH.

pH	0,5	3	4	5	6	8	11	13
f (Hz)	G* (Pa)							
0,01	5668	3181	3591	3166	1947	2254	1087	638,6
0,014	6118	3356	3612	1909	2129	2272	1075	647,4
0,022	6304	3468	3628	2665	2177	2293	1077	653,1
0,032	6401	3536	3613	2167	2222	2324	1092	659,4
0,046	6546	3623	3644	2970	2260	2338	1107	667,3
0,068	6671	3696	3673	3024	2297	2378	1123	676,1
0,10	6777	3771	3710	3115	2329	2406	1136	685,8
0,147	6883	3842	3750	3212	2366	2434	1149	697,1
0,215	6986	3928	3790	3237	2401	2464	1165	710,1
0,316	7082	4009	3833	3269	2436	2504	1180	725,2
0,464	7170	4087	3876	3302	2472	2536	1195	742,1
0,681	7263	4169	3923	3352	2511	2568	1218	760,5
1,0	7356	4252	3961	3398	2538	2611	1216	777,8
1,468	7467	4340	3988	3389	2565	2616	1300	819,8
2,154	7587	4462	3888	3465	2719	2790	1168	837,2
3,162	7555	4573	4072	3607	2556	2724	1412	801,6
4,642	8072	4538	4049	3372	3108	3466	1242	919,1
6,813	7538	4560	3637	3263	2601	2636	2103	5027
10,0	7001	4598	4831	3694	4511	4739	2158	2387

Tabla 9.4 Geles preparados por gelificación interna con diferentes concentraciones de Ca(OH)₂.

f (Hz)	1,2·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato						0,6·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato					
	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE
0,01	2609	496,8	4438	474,1	3523,5	914,5	681,1	47,0	2243	315,8	1462,1	780,9
0,014	2705	475,5	4480	473,7	3592,5	887,5	673,0	40,2	2299	236,4	1486,0	813,0
0,022	2789	423,8	4528	454,8	3658,5	869,5	671,0	37,9	2320	205,3	1495,5	824,5
0,032	2870	412,6	4581	431,3	3725,5	855,5	672,2	37,9	2343	200,3	1507,6	835,4
0,046	2950	402,9	4645	413,2	3797,5	847,5	675,1	37,4	2370	188,8	1522,6	847,5
0,068	3035	395,9	4713	400,6	3874,0	839,0	678,9	38,1	2400	186,4	1539,5	860,6
0,1	3117	388,6	4788	386,1	3952,5	835,5	684,4	37,7	2434	181,3	1559,2	874,8
0,147	3200	390,5	4864	386,4	4032,0	832,0	690,4	39,1	2467	181,4	1578,7	888,3
0,215	3283	392,7	4943	390,6	4113,0	830,0	697,0	41,6	2503	185,6	1600,0	903,0
0,316	3368	391,3	5026	386,8	4197,0	829,0	704,6	43,0	2540	186,1	1622,3	917,7
0,464	3453	398,1	5111	397,2	4282,0	829,0	711,8	46,9	2577	193,6	1644,4	932,6
0,681	3541	402,6	5199	406,9	4370,0	829,0	721,9	51,3	2617	198,6	1669,5	947,6
1,0	3628	421,3	5287	435,5	4457,5	829,5	743,4	58,0	2655	215,4	1699,2	955,8
1,468	3719	432,6	5383	452,2	4551,0	832,0	722,0	66,8	2712	221,6	1717,0	995,0
2,154	3827	442,7	5503	468,8	4665,0	838	740,4	87,5	2747	240,8	1743,7	1003,3
3,162	3944	470,2	5624	483,2	4784,0	840,0	750,0	18,8	2750	323,5	1750,0	1000,0
4,642	4038	406,7	5556	474,2	4797,0	759,0	774,5	168,7	2755	242,4	1764,8	990,3
6,813	4622	983,9	5599	497,0	5110,5	488,5	1718	497,0	2566	199,4	2142,0	424,0
10,0	4051	796,8	5346	456,7	4698,5	647,5	3234	1066	3123	516,3	3178,5	55,50

f (Hz)	0,4·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato						0,1·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato					
	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE
0,01	757,4	140,4	2396	759,2	1576,7	819,3	247,8	34,46	921,1	77,97	584,5	336,7
0,014	772,2	116,5	2712	555,3	1742,1	969,9	270,4	34,09	939,4	54,55	604,9	334,5
0,022	783,3	106,2	2826	479,5	1804,7	1021,4	283,9	32,92	944,5	48,24	614,2	330,3
0,032	795,9	99,78	2920	408,4	1857,9	1062,1	294,0	32,93	949,6	46,38	621,8	327,8
0,046	809,0	95,33	2995	369,4	1902,0	1093,0	302,7	33,47	956,3	46,39	629,5	326,8
0,068	822,8	92,13	3066	348,1	1944,4	1121,6	310,6	34,50	963,3	46,72	636,9	326,4
0,1	837,3	88,75	3134	331,8	1985,7	1148,4	318,3	36,03	971,9	48,71	645,1	326,8
0,147	852,1	87,91	3195	323,2	2023,6	1171,5	325,9	38,17	981,5	51,89	653,7	327,8
0,215	867,3	88,44	3261	314,7	2064,2	1196,9	333,8	41,04	992,1	56,15	662,9	329,2
0,316	883,3	88,06	3323	312,7	2103,2	1219,9	342,3	44,75	1004	61,46	673,2	330,9
0,464	899,8	90,71	3386	314,3	2142,9	1243,1	351,5	49,39	1017	68,0	684,3	332,8
0,681	916,1	93,62	3450	316,2	2183,1	1266,9	361,5	55,06	1032	76,16	696,8	335,3
1,0	938,4	99,56	3518	322,4	2228,2	1289,8	373,0	62,86	1046	86,37	709,5	336,5
1,468	952,2	113,6	3583	333,4	2267,6	1315,4	379,9	73,62	1068	95,63	723,9	344,1
2,154	1009	68,70	3655	351,0	2332,0	1323,0	394,1	78,47	1079	116,5	736,6	342,5
3,162	1090	116,8	3704	370,7	2397,0	1307,0	425,3	113,6	1140	129,6	782,7	357,4
4,642	941,7	197,2	3726	340,3	2333,9	1392,2	559,1	53,47	1089	195,0	824,1	264,9
6,813	1425	139,6	3866	356,7	2645,5	1220,5	388,5	63,10	1413	80,62	900,8	512,3
10,0	1174	3691	4016	567,9	2595,0	1421,0	547,7	108,7	882,4	62,56	715,1	167,4

prom: promedio; DE: desviación estándar.

Tabla 9.5 Geles preparados por gelificación interna con diferentes concentraciones de CaCO₃.

f (Hz)	1,2·10 ⁻³ moles Ca ⁺² /g alginato						0,6·10 ⁻³ moles Ca ⁺² /g alginato					
	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE
0,01	4063	612,6	3747	742,2	3905,0	158,0	517,0	16,52	483,7	23,16	500,4	16,65
0,014	4032	506,5	3760	543,3	3896,0	136,0	513,0	15,55	479,3	20,95	496,2	16,85
0,022	4046	449,3	3775	450,3	3910,5	135,5	511,7	15,56	478,2	20,49	494,9	16,75
0,032	4079	399,4	3811	394,0	3945,0	134,0	511,8	15,99	478,8	20,45	495,3	16,50
0,046	4120	358,2	3855	355,8	3987,5	132,5	513,0	16,80	480,5	20,95	496,8	16,25
0,068	4166	328,2	3901	327,4	4033,5	132,5	514,9	17,96	482,7	21,71	498,8	16,10
0,1	4213	303,9	3951	302,7	4082,0	131,0	517,4	18,70	485,6	22,11	501,5	15,90
0,147	4261	291,7	4004	291,1	4132,5	128,5	520,7	20,86	489,1	23,91	504,9	15,80
0,215	4312	287,3	4057	287,1	4184,5	127,5	524,4	23,63	493,2	26,33	508,8	15,60
0,316	4366	274,4	4114	277,6	4240,0	126,0	529,0	25,73	497,8	28,24	513,4	15,60
0,464	4419	276,0	4171	280,2	4295,0	124,0	535,4	29,65	503,2	31,85	519,3	16,10
0,681	4474	277,2	4227	282,0	4350,5	123,5	538,0	35,23	512,8	36,15	525,4	12,60
1,0	4520	296,1	4296	297,5	4408,0	112,0	538,4	44,55	512,1	46,25	525,3	13,15
1,468	4567	299,4	4335	311,3	4451,0	116,0	587,3	53,68	569,9	42,33	578,6	8,69
2,154	4598	389,5	4439	316,6	4518,5	79,5	555,3	68,41	527,4	072,4	541,4	13,95
3,162	4586	449,0	4374	502,6	4480,0	106,0	544,2	71,05	522,2	73,0	533,2	11,0
4,642	4970	745,4	4736	482,7	4853,0	117,0	598,0	191,4	587,4	245,1	592,7	5,30
6,813	4542	669,0	4512	1151	4527,0	15,0	1406,0	538,6	1211	302,0	1308,5	97,5
10,0	4484	723,7	4341	674,6	4412,5	71,5	2855	1379	3214	1103	3034,5	179,5

f (Hz)	0,4·10 ⁻³ moles Ca ⁺² /g alginato						0,1·10 ⁻³ moles Ca ⁺² /g alginato					
	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE
0,01	135,2	57,47	101,7	38,96	118,5	16,8	85,13	19,48	43,29	11,92	64,21	20,92
0,014	143,6	52,56	101,6	33,77	122,6	21,0	86,67	15,99	45,42	10,09	66,05	20,63
0,022	154,1	48,85	105,0	29,96	129,6	24,5	88,01	13,95	46,98	9,29	67,49	20,52
0,032	163,8	45,89	106,8	27,43	135,3	28,5	89,81	13,42	48,63	9,121	69,22	20,59
0,046	172,9	43,58	111,0	25,79	141,9	30,9	91,90	13,51	50,19	9,321	71,05	20,86
0,068	181,6	41,59	115,3	24,99	148,5	33,2	94,24	14,33	51,86	10,03	73,05	21,19
0,1	189,9	39,69	119,8	24,86	154,9	35,1	96,87	15,69	53,71	11,13	75,29	21,58
0,147	197,7	38,80	124,3	25,72	161,0	36,7	99,84	17,72	55,74	12,72	77,79	22,05
0,215	205,4	38,82	129,2	27,41	167,3	38,1	103,3	20,45	58,11	14,83	80,71	22,59
0,316	213,2	39,30	134,5	29,67	173,9	39,4	107,3	23,92	60,91	17,53	84,11	23,19
0,464	221,2	41,27	140,4	33,16	180,8	40,4	112,1	28,26	64,33	20,96	88,22	23,89
0,681	229,6	44,26	147,0	37,63	188,3	41,3	117,8	33,54	68,43	25,14	93,12	24,69
1,0	240,8	49,37	154,6	43,51	197,7	43,1	124,7	39,95	73,22	30,03	98,96	25,74
1,468	253,6	57,38	165,8	48,87	209,7	43,9	130,9	49,24	78,29	35,68	104,59	26,31
2,154	243,7	61,55	173,2	72,57	208,5	35,3	143,3	56,71	67,37	38,74	105,34	37,97
3,162	274,1	87,95	266,7	64,40	270,4	3,70	159,2	59,37	66,64	70,61	112,92	46,28
4,642	2977	3694,0	204,8	130,6	1591,0	1386,1	135,2	202,9	73,07	47,29	104,14	31,07
6,813	274,2	1693,0	649,5	1040,0	461,9	187,7	290,0	47,33	44,87	37,31	167,44	122,6
10,0	584,0	404,50	37,42	825,3	310,7	273,3	490,5	207,4	1039	475,3	764,75	274,3

prom: promedio; DE: desviación estándar.

Tabla 9.6 Geles preparados por gelificación interna con diferentes concentraciones de citrato de calcio.

f (Hz)	1,2·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato						0,6·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato					
	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE
0,01	3698	635,9	3691	457,9	3694,5	3,50	1496	107,9	1576	91,10	1536,0	40,0
0,014	3746	525,6	3701	396,4	3723,5	22,5	1489	93,36	1561	78,39	1525,0	36,0
0,022	3794	456,6	3727	354,3	3760,5	33,5	1489	88,75	1557	72,61	1523,0	34,0
0,032	3838	402,9	3764	318,9	3801,0	37,0	1496	81,51	1558	67,90	1527,0	31,0
0,046	3885	371,1	3806	296,4	3845,5	39,5	1504	79,10	1563	65,02	1533,5	29,5
0,068	3935	345,7	3851	283,0	3893,0	42,0	1515	77,47	1571	63,92	1543,0	28,0
0,1	3986	325,0	3900	269,2	3943,0	43,0	1526	74,33	1580	61,24	1553,0	27,0
0,147	4039	316,8	3950	265,6	3994,5	44,5	1538	75,29	1590	62,0	1564,0	26,0
0,215	4094	312,7	4002	266,9	4048,0	46,0	1552	77,86	1602	64,83	1577,0	25,0
0,316	4152	304,2	4056	260,0	4104,0	48,0	1566	77,73	1614	64,76	1590,0	24,0
0,464	4210	307,2	4111	264,6	4160,5	49,5	1582	81,68	1627	69,35	1604,5	22,5
0,681	4268	309,3	4164	267,7	4216,0	52,0	1595	85,97	1638	74,03	1616,5	21,5
1,0	4337	326,9	4228	281,6	4282,5	54,5	1611	98,29	1646	87,94	1628,5	17,5
1,468	4377	344,1	4266	306,4	4321,5	55,5	1637	108,8	1692	91,40	1664,5	27,5
2,154	4479	363,6	4404	283,1	4441,5	37,5	1657	80,04	1706	52,42	1681,5	24,5
3,162	4406	557,4	4303	552,0	4354,5	51,5	1623	93,01	1647	97,14	1635,0	12,0
4,642	4753	251,1	4583	162,3	4668,0	85,0	1648	114,9	1650	220,0	1649,0	1,0
6,813	4614	1155,0	4593	1420,0	4603,5	10,5	1709	307,1	1733	307,8	1721,0	12,0
10,0	4347	723,4	4259	647,2	4303,0	44,0	3799	440,4	3704	375,7	3751,5	47,5

f (Hz)	0,4·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato·						0,1·10 ⁻³ moles Ca ²⁺ /g alginato					
	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE	G ₁ ' (Pa)	G ₁ " (Pa)	G ₂ ' (Pa)	G ₂ " (Pa)	G' prom	DE
0,01	1036	49,69	1125	75,76	1080,5	44,50	388,2	55,84	427,1	58,13	407,65	19,45
0,014	1021	40,15	1100	59,15	1060,5	39,50	354,5	57,52	430,5	37,51	392,50	38,0
0,022	1014	36,17	1089	52,25	1051,5	37,50	364,5	34,12	430,7	34,4	397,60	33,10
0,032	1011	34,05	1085	49,56	1048,0	37,0	365,0	28,65	432,1	30,02	398,55	33,55
0,046	1012	33,24	1085	48,56	1048,5	36,50	367,0	26,88	434,0	29,06	400,50	33,50
0,068	1014	33,42	1088	48,30	1051,0	37,0	370,5	26,29	437,1	29,73	403,80	33,30
0,1	1018	32,54	1093	48,73	1055,5	37,50	374,7	26,91	440,4	30,95	407,55	32,85
0,147	1023	34,38	1099	49,73	1061,0	38,0	379,3	28,42	445,2	32,11	412,25	32,95
0,215	1029	37,16	1106	51,61	1067,5	38,5	384,6	30,80	450,8	34,47	417,70	33,10
0,316	1036	38,35	1115	54,31	1075,5	39,5	390,6	34,07	457,2	37,97	423,90	33,30
0,464	1042	42,86	1125	57,90	1083,5	41,5	397,5	38,20	464,5	42,61	431,0	33,50
0,681	1051	47,13	1135	62,28	1093,0	42,0	405,6	43,25	473,1	48,61	439,35	33,75
1,0	1074	54,09	1141	70,32	1107,5	33,50	410,8	51,21	481,8	55,01	446,30	35,50
1,468	1044	78,97	1172	64,14	1108,0	64,0	416,8	60,94	492,6	60,34	454,70	37,90
2,154	1187	19,05	1161	69,43	1174,0	13,0	434,4	63,69	507,2	83,65	470,80	36,40
3,162	1134	243,1	1225	64,07	1179,5	45,50	457,5	105,0	502,6	115,6	480,05	22,55
4,642	1027	125,1	1136	195,8	1081,5	54,50	580,1	338,0	676,5	191,8	628,30	48,20
6,813	1556	442,1	1554	134,6	1555,0	1,0	364,5	81,26	499,0	70,81	431,75	67,25
10,0	8629	14100	3972	1590	6300,5	2328,5	644,0	2049	1139	243,1	891,50	247,5

prom: promedio; DE: desviación estándar.

Tabla 9.7 Influencia de la concentración de acético en los geles preparados con citrato de calcio a diferentes concentraciones para 1 Hz de frecuencia a partir de una solución de ácido acético al $4,02 \cdot 10^{-3}$ M (A).

A	$0,16 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato				$0,32 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato				$0,39 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato			
	f (Hz)	G ₁ *	G ₂ *	G*prom	DS	G ₁ *	G ₂ *	G*prom	DS	G ₁ *	G ₂ *	G*prom
0,01	0,16	0,16	0,16	0,001	0,37	0,32	0,35	0,025	93,5	90,1	91,8	1,71
0,014	0,25	0,25	0,25	0,002	0,54	0,54	0,54	0,004	97,7	95,9	96,8	0,89
0,022	0,37	0,37	0,37	0,002	0,77	0,72	0,75	0,025	101,0	99,9	100,5	0,56
0,032	0,55	0,55	0,55	0,001	1,11	1,78	14,45	0,339	103,6	102,4	103,0	0,59
0,046	0,82	0,82	0,82	0,003	1,57	1,56	1,56	0,006	106,6	105,4	106,0	0,59
0,068	1,21	1,22	12,13	0,005	2,22	2,68	24,49	0,234	109,9	108,5	109,2	0,70
0,100	1,77	1,79	1,78	0,008	311	3,42	3,26	0,156	113,8	112,2	113,0	0,79
0,147	2,59	2,60	25,95	0,006	432	4,43	43,76	0,059	118,3	116,3	117,3	1,0
0,215	3,75	3,85	3,80	0,053	5,94	5,82	5,88	0,058	123,4	120,9	122,2	1,25
0,316	5,37	5,49	5,43	0,057	8,12	7,71	79,12	0,207	129,4	126,4	127,9	1,50
0,464	7,61	7,49	75,47	0,061	10,98	10,22	10,59	0,381	136,5	132,7	134,6	1,90
0,681	10,61	10,98	10,79	0,185	14,72	13,53	14,13	0,595	144,9	140,1	142,5	2,40
1,0	14,58	15,68	15,13	0,550	19,55	17,85	18,70	0,850	154,5	148,1	151,3	3,20
1,468	19,64	21,65	20,65	1,005	25,65	23,38	2,45	1,135	166,5	158,6	162,6	3,95
2,154	25,91	28,94	27,43	1,515	33,18	30,24	31,71	1,470	180,0	170,2	175,1	4,90
3,162	33,34	38,97	36,16	2,815	42,71	38,82	40,77	1,945	194,9	183,0	188,9	5,95
4,642	41,02	47,68	44,35	3,330	52,64	46,04	49,34	3,300	211,9	198,7	205,3	6,60
6,813	52,16	59,77	55,97	3,805	61,18	53,05	57,12	4,065	234,0	214,3	224,2	9,85
10,0	59,80	76,33	68,07	8,265	81,27	75,92	78,59	2,675	285,6	277,5	281,6	4,05

A	$0,43 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato				$0,45 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato				$0,47 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato			
	f (Hz)	G ₁ *	G ₂ *	G*prom	DS	G ₁ *	G ₂ *	G*prom	DS	G ₁ *	G ₂ *	G*prom
0,01	262,5	322,1	292,3	29,8	241,1	235,1	238,1	3,0	665,9	465,2	565,6	100,4
0,014	286,4	311,5	298,9	12,6	250,0	246,0	248,0	2,0	675,8	500,5	588,2	87,7
0,022	296,5	314,8	305,7	9,15	257,3	255,1	256,2	1,1	666,2	511,0	588,6	77,6
0,032	303,7	317,8	310,8	7,05	262,2	260,8	261,5	0,69	675,7	517,1	596,4	79,3
0,046	309,1	321,6	315,4	6,25	265,1	263,7	264,4	0,70	676,4	524,2	600,3	76,1
0,068	314,7	326,1	320,4	5,70	268,8	267,3	268,1	0,75	681,3	532,3	606,8	74,5
0,100	321,0	331,2	326,1	5,09	273,5	272,0	272,8	0,75	690,5	541,2	615,9	74,7
0,147	327,8	337,1	332,5	4,65	279,1	277,5	278,3	0,80	697,9	551,2	624,6	73,4
0,215	335,6	343,6	339,6	4,0	285,4	283,4	284,4	1,0	707,2	561,9	634,6	72,7
0,316	344,6	350,9	347,8	3,15	292,7	290,5	291,6	1,09	716,8	573,7	645,3	71,6
0,464	354,7	359,4	357,1	2,35	301,1	298,3	299,7	1,40	727,8	586,5	657,2	70,7
0,681	366,0	368,9	367,5	1,45	311,0	307,5	309,3	1,75	740,1	600,4	670,3	69,9
1,0	378,0	379,8	378,9	0,90	322,3	318,0	320,2	2,15	753,7	616,0	684,9	68,9
1,468	397,0	392,3	394,7	2,35	335,5	330,0	332,8	2,75	769,4	632,9	701,2	68,3
2,154	412,9	407,5	410,2	2,69	351,0	343,9	347,5	3,55	788,1	651,4	719,9	68,4
3,162	402,9	421,2	412,1	9,15	368,4	359,6	364,0	4,39	808,8	669,1	738,9	69,9
4,642	464,5	433,9	449,2	15,3	384,9	373,7	379,3	5,59	819,0	695,4	757,2	61,8
6,813	1384	470,5	927,3	456,8	401,7	392,6	397,2	4,55	823,4	702,0	762,7	60,7
10,0	2979	488,3	1733,7	1245,4	447,5	423,3	435,4	12,1	829,8	695,2	762,5	67,3

prom: promedio; DS: desviación estándar.

Tabla 9.8 Influencia de la concentración de acético en los geles preparados con citrato de calcio a diferentes concentraciones para 1 Hz de frecuencia a partir de una solución de ácido acético al $9,42 \cdot 10^{-5}$ M (B).

B	0,16·10 ⁻³ moles Ca ⁺² /g alginato				0,32·10 ⁻³ moles Ca ⁺² /g alginato				0,39·10 ⁻³ moles Ca ⁺² /g alginato			
	f (Hz)	G ₁ *	G ₂ *	G*prom	DS	G ₁ *	G ₂ *	G*prom	DS	G ₁ *	G ₂ *	G*prom
0,010	0,15	0,15	0,15	0,004	17,2	15,3	16,3	1,0	28,2	18,8	23,5	4,7
0,014	0,22	0,23	0,22	0,005	18,4	16,6	17,5	0,9	29,7	19,8	24,8	4,9
0,022	0,33	0,34	0,34	0,007	19,7	17,7	18,7	0,9	31,2	20,8	26,0	5,2
0,032	0,49	0,51	0,49	0,009	21,1	18,7	19,9	1,2	32,9	22,1	27,5	5,4
0,046	0,73	0,75	0,74	0,011	22,9	20,4	21,6	1,2	34,7	23,5	29,1	5,6
0,068	1,10	1,10	1,10	0,016	24,9	21,8	23,5	1,7	36,9	25,2	31,1	5,8
0,100	1,60	1,60	1,60	0,022	27,5	23,9	25,7	1,9	39,4	27,4	33,4	6,0
0,147	2,30	2,30	2,30	0,029	30,6	26,9	28,7	1,9	42,4	30,1	36,3	6,2
0,215	3,30	3,40	3,37	0,043	34,5	29,8	32,3	2,3	46,1	33,4	39,7	6,4
0,316	4,80	4,90	4,85	0,059	39,2	34,7	36,9	2,2	50,4	37,4	43,9	6,5
0,464	6,80	7,00	6,90	0,085	44,9	39,4	42,1	2,8	55,7	42,4	49,1	6,6
0,681	9,60	9,80	9,70	0,126	51,8	46,8	49,3	2,5	62,1	48,6	55,3	6,7
1,0	13,4	14	13,5	0,180	60,3	53,4	56,8	3,4	69,9	56,0	62,9	6,9
1,468	18,3	18,8	18,6	0,260	70,3	62,4	66,3	4,0	79,1	65,0	72,1	7,0
2,154	24,7	25,4	25,0	0,360	82,2	72,8	77,5	4,7	89,9	75,8	82,9	7,1
3,162	32,3	33,4	32,8	0,565	96,3	76,6	86,5	9,8	102,7	88,4	95,6	7,1
4,642	38,9	40,7	39,8	0,879	113,1	90,2	101,6	11,5	117,9	104,4	111,2	6,8
6,813	50,3	52,8	51,6	1,250	131,0	129,0	130,0	1,0	141,3	122,3	131,8	9,5
10,0	60,9	67,0	64,0	3,030	126,5	97,8	112,2	14,3	119,4	82,8	101,1	18,3

B	0,43·10 ⁻³ moles Ca ⁺² /g alginato				0,45·10 ⁻³ moles Ca ⁺² /g alginato				0,47·10 ⁻³ moles Ca ⁺² /g alginato			
	f (Hz)	G ₁ *	G ₂ *	G*prom	DS	G ₁ *	G ₂ *	G*prom	DS	G ₁ *	G ₂ *	G*prom
0,01	68,9	236,4	152,6	83,7	98,3	80,6	89,5	8,9	362,3	461,8	412,1	49,8
0,014	72,4	249,2	160,8	88,4	102,7	82,9	92,8	9,8	367,7	468,6	418,2	50,5
0,022	74,6	252,5	163,6	88,9	106,1	85,2	95,6	10,5	379,4	481,1	430,3	50,8
0,032	76,9	255,9	166,4	89,5	109,6	87,8	98,7	10,9	385,5	483,4	434,5	48,9
0,046	79,6	260,0	169,8	90,2	113,3	90,8	102,1	11,3	389,5	487,2	438,4	48,8
0,068	82,5	264,7	173,6	91,1	117,3	94,2	105,7	11,6	394,4	491,2	442,8	48,4
0,100	85,9	270,2	178,0	92,2	121,8	97,9	109,9	11,9	400,0	496,5	448,3	48,3
0,147	89,8	276,3	183,1	93,2	126,6	102,2	114,4	12,2	406,2	502,7	454,5	48,3
0,215	94,5	283,1	188,8	94,3	132,2	107,2	119,7	12,5	413,5	509,9	461,7	48,2
0,316	100,1	290,8	195,5	95,3	138,5	113,1	125,8	12,7	422,0	517,8	469,9	47,9
0,464	106,8	299,5	203,2	96,4	145,9	120,1	133,0	12,9	431,3	527,3	479,3	48,0
0,681	114,7	309,2	212,5	97,3	154,6	128,3	141,5	13,2	441,9	537,9	489,9	48,0
1,0	124,2	320,3	222,3	98,1	164,7	138,1	151,4	13,3	453,7	549,8	501,8	48,1
1,468	135,3	332,9	234,1	98,8	176,6	149,6	163,1	13,5	467,1	563,2	515,2	48,1
2,154	148,3	347,5	247,9	99,6	190,2	163,0	176,6	13,6	481,5	580,0	530,8	49,3
3,162	163,4	362,8	263,1	99,7	205,2	178,4	191,8	13,4	503,4	600,4	551,9	48,5
4,642	176,9	378,8	277,9	100,1	224,1	193,6	208,8	15,3	515,9	633,5	574,7	58,8
6,813	204,6	383,3	294,0	89,4	242,6	218,7	230,6	12,0	563,2	644,6	603,9	40,7
10,0	221,1	441,1	331,1	110,0	281,7	255,3	268,5	13,2	534,1	609,2	571,7	37,6

prom: promedio; DS: desviación estándar.

Tabla 9.9 Influencia de la concentración de acético en los geles preparados con citrato de calcio a diferentes concentraciones para 1 Hz de frecuencia a partir de una solución de ácido acético al $6,36 \cdot 10^{-6}$ M (C).

C	$0,16 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{2+}/g alginato				$0,32 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{2+}/g alginato				$0,39 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{2+}/g alginato			
	G_1^*	G_2^*	G^{prom}	DS	G_1^*	G_2^*	G^{prom}	DS	G_1^*	G_2^*	G^{prom}	DS
0,01	0,14	0,20	0,17	0,03	6,39	5,76	6,08	0,32	63,8	53,4	58,6	5,22
0,014	0,20	0,31	0,26	0,06	7,27	6,62	6,94	0,33	65,5	55,9	60,7	4,79
0,022	0,30	0,40	0,35	0,05	8,09	7,36	7,72	0,37	67,2	58,2	62,7	4,47
0,032	0,45	0,52	0,48	0,04	9,01	8,14	8,57	0,43	69,1	60,6	64,9	4,21
0,046	0,66	0,71	0,68	0,02	10,0	8,95	9,49	0,53	71,2	63,3	67,2	3,96
0,068	0,97	0,99	0,98	0,01	11,2	9,88	10,6	0,68	73,7	66,3	69,9	3,72
0,100	1,43	1,57	1,49	0,07	12,7	10,9	11,9	0,87	76,7	69,7	73,2	3,49
0,147	2,08	2,17	2,12	0,04	14,6	12,3	13,4	1,14	80,1	73,7	76,9	3,19
0,215	3,02	3,47	3,24	0,22	16,9	13,9	15,4	1,49	84,3	78,5	81,4	2,88
0,316	4,34	4,78	4,56	0,22	19,8	15,9	17,8	1,93	89,2	84,2	86,7	2,45
0,464	6,17	7,02	6,59	0,43	23,3	18,3	20,8	2,51	95,1	91,1	93,1	2,04
0,681	8,66	8,88	8,77	0,11	27,8	21,4	24,6	3,20	102,3	99,3	100,8	1,52
1,0	11,9	12,2	12,1	0,12	33,4	25,2	29,3	4,10	110,7	109,0	109,9	0,90
1,468	16,3	16,8	16,6	0,28	40,2	29,9	35,0	5,10	120,7	120,5	120,6	0,10
2,154	21,6	21,9	21,7	0,14	48,2	35,6	41,9	6,31	132,6	134,1	133,4	0,75
3,162	28,1	29,7	28,9	0,79	58,3	42,9	50,6	7,70	146,8	150,3	148,6	1,75
4,642	34,6	36,4	35,5	0,94	71,0	54,2	62,6	8,41	158,7	165,4	162,1	3,35
6,813	43,7	45,5	44,6	0,89	75,2	58,1	66,6	8,57	186,1	192,9	189,5	3,40
10,0	53,7	58,5	56,1	2,42	72,3	42,8	57,5	14,7	188,0	208,9	198,5	10,5

C	$0,43 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{2+}/g alginato				$0,45 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{2+}/g alginato				$0,47 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{2+}/g alginato			
	G_1^*	G_2^*	G^{prom}	DS	G_1^*	G_2^*	G^{prom}	DS	G_1^*	G_2^*	G^{prom}	DS
0,01	153,8	170,5	162,2	8,30	174,4	236,4	205,4	31,0	441,1	407,1	424,1	17,0
0,014	159,5	173,9	166,7	7,20	180,4	249,2	214,8	34,4	455,1	406,6	430,9	24,3
0,022	162,2	177,5	169,9	7,70	183,0	252,5	217,8	34,8	460,2	411,0	435,6	24,6
0,032	165,1	181,4	173,3	8,20	185,8	255,9	220,9	35,0	465,5	415,1	440,3	25,2
0,046	168,3	185,9	177,1	8,80	188,7	260,0	224,4	35,7	471,0	418,3	444,7	26,3
0,068	172,0	190,8	181,4	9,40	192,1	264,7	228,4	36,3	477,1	422,1	449,6	27,5
0,100	176,1	196,2	186,2	10,1	196,0	270,2	233,1	37,1	484,2	426,7	455,5	28,8
0,147	180,8	202,3	191,6	10,8	200,4	276,3	238,4	37,9	492,2	432,1	462,2	30,1
0,215	186,3	209,0	197,7	11,4	205,5	283,1	244,3	38,8	501,2	438,3	469,8	31,5
0,316	192,6	216,7	204,7	12,1	211,4	290,8	251,1	39,7	511,0	445,3	478,2	32,9
0,464	199,9	225,4	212,7	12,8	218,4	299,5	259,0	40,6	521,9	453,5	487,7	34,2
0,681	208,4	235,9	222,2	13,8	226,6	309,2	267,9	41,3	534,0	462,9	498,5	35,6
1,0	218,4	247,7	233,1	14,7	236,4	320,3	278,4	41,9	547,5	473,6	510,6	36,9
1,468	229,8	261,3	245,6	15,8	247,7	332,9	290,3	42,6	562,7	485,9	524,3	38,4
2,154	243,5	277,1	260,3	16,8	261,0	347,5	304,3	43,3	580,9	499,6	540,3	40,7
3,162	259,0	296,6	277,8	18,8	277,3	362,8	320,1	42,8	600,9	521,0	560,9	39,9
4,642	283,7	316,8	300,3	16,6	298,8	378,8	338,8	40,0	638,3	537,1	587,7	50,6
6,813	285,8	320,3	303,1	17,3	296,0	383,3	339,7	43,7	638,4	570,5	604,5	33,9
10,0	351,2	384,8	368,0	16,8	359,5	441,1	400,3	40,8	610,3	547,7	579,0	31,3

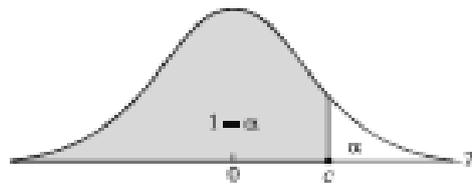
prom: promedio; DS: desviación estándar.

9.3 Datos para la caracterización de las microesferas de alginato preparadas en emulsión por gelificación interna.

Tabla 9.10 Diámetros de las microesferas de alginato analizadas por microscopía óptica a partir de diferentes concentraciones y sales de calcio.

Carbonato 0,05 M / Diámetro (µm)				Carbonato 0,15 M / Diámetro (µm)				Citrato 0,05 M / Diámetro (µm)			
5,6	37,9	60,2	83,2	3,9	35,0	57,5	82,7	3,7	15,7	27,9	44,2
7,1	38,1	60,2	84,0	7,0	35,0	58,8	82,7	5,4	16,3	28,0	44,2
8,4	39,0	60,2	84,1	7,0	35,1	58,9	84,0	5,5	16,3	28,0	44,9
8,9	39,2	60,3	84,1	7,0	35,3	58,9	84,3	6,1	16,4	28,6	44,9
9,4	39,2	61,6	85,4	7,0	35,8	58,9	85,1	6,1	16,9	28,6	44,9
9,9	39,3	61,6	85,4	7,1	36,4	60,2	85,4	6,1	16,9	28,8	45,0
10,0	39,4	61,6	85,4	7,1	36,4	60,2	85,6	6,8	16,9	29,4	45,5
11,2	40,6	61,6	85,4	7,1	36,5	60,3	86,0	6,8	17,0	29,4	46,2
11,2	40,7	61,6	85,5	8,4	36,5	60,4	86,1	6,8	17,0	29,4	46,9
12,0	40,7	61,6	86,8	8,4	37,8	60,5	86,9	7,0	17,0	30,6	47,6
12,6	40,7	61,7	86,8	8,9	37,9	60,6	86,9	7,1	17,7	30,6	47,6
12,6	40,7	61,7	86,9	9,8	37,9	61,6	86,9	7,5	17,7	30,6	47,6
12,7	42,0	61,7	87,1	9,9	38,9	61,6	87,1	7,5	17,7	30,6	47,6
12,9	42,1	63,0	88,2	10,2	39,2	61,6	87,1	7,5	17,8	30,8	47,7
14,0	43,4	63,0	88,2	11,2	39,2	61,6	87,4	8,2	18,2	30,8	49,0
14,1	43,4	63,1	91,0	11,3	39,2	61,6	88,2	8,2	18,2	30,8	50,3
14,1	43,5	63,1	91,0	11,3	39,4	61,7	88,6	8,2	18,2	30,8	50,9
15,0	43,6	63,1	92,5	12,3	40,6	62,0	89,1	8,2	18,4	30,8	51,1
15,0	44,8	64,4	92,6	12,6	40,6	63,0	89,6	8,2	18,4	30,9	52,0
15,4	44,9	64,4	95,2	12,7	42,0	63,0	91,0	8,5	18,4	31,3	52,3
16,8	44,9	64,5	96,6	12,9	42,0	63,0	91,1	8,8	18,4	31,9	52,4
16,8	45,0	65,0	96,6	14,0	42,0	63,0	92,1	8,8	19,0	31,9	52,4
17,0	46,2	65,1	96,6	14,0	42,2	63,1	92,4	8,9	19,0	32,1	53,2
18,2	46,2	65,8	96,7	14,0	42,2	63,1	92,4	8,9	19,0	32,2	53,2
18,3	46,2	65,8	98,0	14,1	43,4	63,1	92,4	8,9	19,6	32,3	53,7
19,6	46,2	65,8	98,0	14,3	43,4	64,5	92,4	9,1	19,7	32,6	54,6
19,7	46,2	65,8	98,0	15,4	43,4	64,5	92,6	9,5	19,7	32,7	54,7
19,8	47,0	65,9	98,1	15,4	43,5	65,5	93,8	9,5	19,7	32,7	55,1
21,1	47,9	66,0	98,2	15,4	43,5	65,8	93,8	9,5	19,7	33,6	56,1
21,2	49,0	67,2	99,4	15,5	43,6	65,8	95,2	9,5	19,7	33,6	56,1
22,4	49,0	67,2	99,8	16,8	44,2	65,9	95,2	9,5	19,8	33,9	56,1
23,8	49,0	67,3	100,0	16,8	44,8	65,9	95,2	9,5	19,8	33,9	57,4
23,8	49,0	67,3	100,8	16,9	44,8	66,8	95,3	9,6	20,4	33,9	57,4
23,8	49,1	67,3	100,9	17,0	44,8	67,2	96,5	9,6	20,4	34,7	57,8
23,8	50,1	67,4	102,2	18,2	44,8	67,3	96,6	9,7	20,4	35,0	58,5
23,9	50,3	68,6	103,6	18,2	44,9	67,3	98,0	10,2	21,0	35,0	60,2
23,9	50,4	68,7	103,6	18,2	45,3	67,3	99,4	10,2	21,0	35,0	60,3
25,2	50,4	68,7	105,0	18,3	46,2	68,6	100,8	10,9	21,0	35,3	61,0
26,2	50,4	68,7	105,2	19,6	46,2	68,6	100,8	10,9	21,1	35,4	62,0
26,6	51,8	68,8	105,3	21,0	46,3	68,6	100,8	10,9	21,8	35,4	62,5
26,6	51,8	69,0	106,1	21,0	46,4	70,0	102,2	10,9	22,4	36,4	62,5
26,6	51,8	70,0	106,4	21,1	47,6	70,0	103,6	11,1	22,4	36,5	63,1
28,0	51,9	70,0	107,9	21,6	47,7	70,1	103,6	11,1	22,4	36,7	64,4
28,0	51,9	70,1	109,2	22,4	49,0	70,1	103,8	11,2	22,4	37,0	64,4
28,0	51,9	70,2	109,2	22,4	49,0	72,8	105,0	11,2	22,4	37,4	65,9
28,0	52,1	71,4	109,2	22,4	49,1	72,8	105,0	11,2	22,5	37,4	65,9
28,1	53,0	71,4	109,2	22,4	49,1	72,8	106,6	11,3	23,1	37,4	65,9
28,1	53,2	71,4	110,6	23,8	50,4	72,9	107,8	11,3	23,8	37,8	66,3
29,4	53,2	71,4	114,8	23,8	50,4	73,5	109,2	11,6	23,9	37,8	67,2
29,4	53,2	71,9	115,1	24,7	50,4	74,2	109,2	11,8	24,0	37,8	67,2
29,4	53,3	72,0	116,2	25,2	50,4	74,3	109,3	11,6	24,5	37,8	67,3
29,4	53,5	72,1	116,2	25,2	50,4	74,3	110,6	11,6	24,5	38,1	67,9
29,4	54,6	73,0	116,6	25,2	50,5	74,3	112,0	12,0	24,5	38,1	68,6
30,8	54,6	74,2	117,6	25,2	51,8	74,3	112,0	12,2	25,0	38,1	68,7
30,8	54,7	75,7	118,0	25,2	51,8	75,4	112,6	12,2	25,2	38,7	70,1
32,2	54,7	75,7	119,0	26,6	51,9	75,6	113,5	12,3	25,2	38,8	70,7
32,2	54,8	75,7	119,1	26,6	51,9	75,7	114,8	12,3	25,2	39,2	71,4
32,3	54,9	75,7	120,4	26,6	52,3	75,7	117,6	12,6	25,2	39,2	74,7
33,1	56,0	75,9	121,8	26,8	53,2	76,8	119,0	12,6	25,2	39,2	77,0
33,6	56,0	77,0	121,8	28,0	53,2	77,0	119,0	12,9	25,8	39,4	78,0
33,6	56,0	77,0	122,0	28,0	53,3	77,1	120,4	12,9	25,9	40,1	81,3
33,7	56,0	77,0	123,2	28,0	54,6	77,1	120,6	12,9	26,5	40,2	84,2
35,0	56,1	77,1	126,1	28,1	54,6	77,1	120,6	13,0	26,5	40,6	84,9
35,0	56,1	78,7	126,1	29,4	54,7	77,9	134,4	13,6	26,5	41,5	85,0
35,0	57,4	78,7	135,8	29,4	54,7	78,0	135,9	13,6	26,6	42,0	89,6
35,0	57,6	79,8	135,8	29,4	56,0	78,4	138,9	13,6	26,6	42,0	89,9
36,4	57,7	79,9	135,9	29,7	56,0	78,4	138,9	13,7	26,6	42,1	91,1
36,4	57,7	79,9	135,9	29,7	56,0	78,6	142,8	13,9	27,2	42,1	93,0
36,4	58,1	81,2	137,3	30,8	56,0	79,8	142,9	14,0	27,2	42,2	96,7
36,5	58,8	81,3	142,8	30,8	56,1	80,0	145,6	14,3	27,2	42,2	99,9
37,0	58,8	81,3	147,1	32,2	56,1	82,6	148,4	14,3	27,2	42,8	103,6
37,8	58,8	81,3	149,9	32,3	56,2	82,6	166,7	14,9	27,2	42,8	103,6
37,8	58,9	82,6	152,6	33,3	57,1	82,6	172,2	15,0	27,2	43,5	120,4
37,8	58,9	82,6	161,2	33,6	57,4	82,7	193,4	15,7	27,9	43,5	124,7
37,8	60,1	82,7	379,4	33,6	57,4	82,7	364,0	15,7	27,9	44,0	141,5

Tabla 9.11 Tabla de la Distribución t-Student con n grados de libertad.



$1 - \alpha$

n	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.975	0.99	0.995
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	0.679	0.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

Tabla 9.12 Valores de retrodifusión (BS) de las emulsiones preparadas con varios tensioactivos (S80, S85, S80T80 y PGPR) a 10% p/p para la preparación de microesferas.

Tensioactivo		10% p/p							
Tiempo (min)	$\overline{BS}, S80_1$	$\overline{BS}, S80_2$	$\overline{BS}, S80prom$	DS	$\overline{BS}, S85_1$	$\overline{BS}, S85_2$	$\overline{BS}, S85prom$	DS	
0	28,94	32,22	30,58	1,64	25,72	20,16	22,94	2,78	
1	24,02	27,74	25,88	1,86	24,03	18,86	21,45	2,58	
2	21,13	23,69	22,41	1,28	23,05	18,01	20,53	2,52	
3	20,08	21,38	20,73	0,65	22,28	17,41	19,85	2,44	
4	19,67	20,19	19,93	0,26	21,63	16,95	19,29	2,34	
5	19,44	19,48	19,46	0,01	21,01	16,55	18,78	2,23	
6	19,20	19,0	19,1	0,09	20,47	16,19	18,33	2,14	
7	19,05	18,60	18,83	0,23	20,01	15,84	17,94	2,09	
8	18,88	18,30	18,59	0,29	19,57	15,54	17,56	2,02	
9	18,74	18,09	18,42	0,32	19,13	15,31	17,22	1,91	
10	18,60	17,91	18,26	0,35	18,69	15,11	16,90	1,79	
11	18,48	17,74	18,11	0,37	18,23	14,94	16,59	1,65	
12	18,36	17,62	17,99	0,37	17,80	14,71	16,26	155	
13	18,24	17,50	17,87	0,37	17,41	14,51	15,96	1,45	
14	18,14	17,39	17,77	0,38	17,02	14,26	15,64	1,38	

Tiempo (min)	$\overline{BS}, (S80-T80)_1$	$\overline{BS}, (S80-T80)_2$	$\overline{BS}, (S80-T80)prom$	DS	$\overline{BS}, PGPR_1$	$\overline{BS}, PGPR_2$	$\overline{BS}, PGPRprom$	DS
0	28,03	29,08	28,56	0,52	23,39	22,21	22,79	0,84
1	27,56	28,46	28,01	0,45	23,38	22,12	22,75	0,89
2	27,08	28,02	27,55	0,47	23,17	22,15	22,66	0,72
3	26,68	27,64	27,16	0,48	23,36	22,13	22,74	0,86
4	26,34	27,21	26,78	0,44	23,28	22,12	22,69	0,82
5	25,96	26,80	26,38	0,42	23,18	21,99	22,59	0,84
6	25,68	26,47	26,08	0,39	23,20	22,09	22,65	0,79
7	25,39	26,13	25,76	0,37	23,27	22,01	22,64	0,89
8	25,14	25,80	25,47	0,33	23,20	21,98	22,59	0,86
9	24,93	25,54	25,24	0,31	23,13	22,08	22,60	0,74
10	24,71	25,26	24,99	0,28	23,15	21,99	22,57	0,82
11	24,48	24,98	24,73	0,25	23,15	22,09	22,62	0,74
12	24,30	24,73	24,52	0,22	23,12	22,11	22,61	0,72
13	24,03	24,46	24,25	0,22	23,18	21,99	22,58	0,84
14	23,81	24,20	24,01	0,19	23,27	21,98	22,63	0,91

BS: valor medio de Back Scattering; Span 80, S80; Span 85, S85; Span 80-Tween 80, S80-T80; Polirricinoleato de poliglicerol, PGPR.

Tabla 9.13 Valores de retrodifusión (BS) de las emulsiones preparadas con varios tensioactivos (S80, S85, S80T80 y PGPR) a 5% p/p para la preparación de microesferas.

Tensioactivo		5% p/p							
Tiempo (min)	$\overline{BS}, S80_1$	$\overline{BS}, S80_2$	$\overline{BS}, S80prom$	DS	$\overline{BS}, S85_1$	$\overline{BS}, S85_2$	$\overline{BS}, S85prom$	DS	
0	20,35	21,79	21,07	1,02	17,13	16,40	16,77	0,52	
1	18,05	18,34	18,19	0,21	15,91	15,09	15,50	0,58	
2	17,71	17,19	17,45	0,37	14,93	14,12	14,53	0,57	
3	17,06	16,46	16,76	0,42	14,01	13,39	13,70	0,44	
4	16,73	16,02	16,38	0,50	13,22	12,72	12,97	0,35	
5	16,45	15,67	16,06	0,55	12,65	12,23	12,44	0,29	
6	16,26	15,36	15,81	0,64	12,12	11,88	12,0	0,17	
7	16,14	15,17	15,66	0,69	11,77	11,56	11,67	0,15	
8	15,95	14,95	15,45	0,71	11,53	11,31	11,42	0,16	
9	15,77	14,76	15,27	0,71	11,29	11,06	11,18	0,16	
10	15,67	14,65	15,16	0,72	11,16	10,89	11,03	0,19	
11	15,56	14,52	15,04	0,74	11,04	10,75	10,89	0,21	
12	15,51	14,47	14,99	0,74	11,11	10,68	10,89	0,30	
13	15,50	14,40	14,95	0,78	10,90	10,59	10,75	0,22	
14	15,39	14,34	14,87	0,74	10,79	10,50	10,65	0,21	

Tiempo (min)	$\overline{BS}, (S80-T80)_1$	$\overline{BS}, (S80-T80)_2$	$\overline{BS}, (S80-T80)prom$	DS	$\overline{BS}, PGPR_1$	$\overline{BS}, PGPR_2$	$\overline{BS}, PGPRprom$	DS
0	19,11	19,21	19,16	0,07	25,85	25,90	25,88	0,04
1	18,11	18,20	18,16	0,06	25,76	25,82	25,79	0,04
2	17,56	17,20	17,38	0,25	25,67	25,69	25,68	0,01
3	17,06	16,54	16,80	0,37	25,59	25,60	25,59	0,01
4	16,55	16,09	16,32	0,33	25,50	25,52	25,51	0,01
5	16,18	15,59	15,89	0,42	25,35	25,42	25,39	0,05
6	15,81	15,18	15,49	0,45	25,31	25,35	25,33	0,03
7	15,50	14,89	15,19	0,43	25,21	25,28	25,25	0,05
8	15,22	14,63	14,93	0,42	25,16	25,16	25,16	0,0
9	14,90	14,40	14,65	0,35	25,07	25,05	25,06	0,01
10	14,63	14,23	14,43	0,28	24,98	24,99	24,99	0,01
11	14,38	13,88	14,13	0,35	24,85	24,84	24,85	0,01
12	14,22	13,51	13,87	0,50	24,76	24,73	24,75	0,02
13	14,04	13,24	13,64	0,57	24,71	24,63	24,67	0,06
14	13,87	13,07	13,47	0,57	24,59	24,34	24,47	0,18

BS: valor medio de Back Scattering; Span 80, S80; Span 85, S85; Span 80-Tween 80, S80-T80; Polirricinoleato de poliglicerol, PGPR.

Tabla 9.14 Valores de retrodifusión (BS) de las emulsiones preparadas con varios tensioactivos (S80, S85, S80T80 y PGPR) a 2% p/p para la preparación de microesferas.

Tiempo (min)	Tensioactivo 2% p/p							
	$\overline{BS}, S80_1$	$\overline{BS}, S80_2$	$\overline{BS}, S80prom$	DS	$\overline{BS}, S85_1$	$\overline{BS}, S85_2$	$\overline{BS}, S85prom$	DS
0	26,79	27,81	27,30	0,51	15,98	15,69	15,84	0,21
1	24,97	26,18	25,58	0,61	15,32	15,26	15,29	0,04
2	23,66	24,32	23,99	0,33	14,94	14,90	14,92	0,03
3	22,63	23,29	22,96	0,33	14,52	14,58	14,55	0,04
4	21,69	22,24	21,97	0,27	14,22	14,25	14,24	0,02
5	20,94	21,49	21,22	0,27	13,94	13,93	13,94	0,01
6	20,26	20,74	20,50	0,24	13,69	13,63	13,66	0,0
7	19,62	20,11	19,87	0,24	13,44	13,38	13,41	0,04
8	19,07	19,44	19,26	0,19	13,25	13,13	13,19	0,08
9	18,57	18,82	18,69	0,13	13,04	12,92	12,98	0,08
10	18,14	18,24	18,19	0,05	12,81	12,72	12,77	0,06
11	17,72	17,85	17,79	0,07	12,69	12,56	12,63	0,09
12	17,33	17,46	17,39	0,07	12,51	12,38	12,45	0,09
13	16,93	16,99	16,96	0,03	12,34	12,20	12,27	0,09
14	16,59	16,63	16,61	0,02	12,20	12,07	12,14	0,09

Tiempo (min)	Tensioactivo 2% p/p							
	$\overline{BS}, (S80-T80)_1$	$\overline{BS}, (S80-T80)_2$	$\overline{BS}, (S80-T80)prom$	DS	$\overline{BS}, PGPR_1$	$\overline{BS}, PGPR_2$	$\overline{BS}, PGPRprom$	DS
0	13,10	13,13	13,12	0,02	25,57	25,53	25,55	0,03
1	12,83	12,46	12,65	0,26	25,45	25,44	25,45	0,01
2	12,67	12,19	12,43	0,34	25,38	25,36	25,37	0,01
3	12,41	12,01	12,21	0,28	25,29	25,3	25,29	0,01
4	12,28	11,80	12,04	0,34	25,18	25,23	25,21	0,04
5	12,13	11,64	11,88	0,35	25,14	25,16	25,15	0,01
6	12,05	11,51	11,78	0,38	25,03	25,05	25,04	0,01
7	11,87	11,39	11,63	0,34	24,94	24,97	24,96	0,02
8	11,75	11,24	11,49	0,36	24,83	24,89	24,86	0,04
9	11,62	11,12	11,37	0,35	24,76	24,78	24,77	0,01
10	11,55	11,03	11,29	0,37	24,65	24,68	24,67	0,02
11	11,48	10,90	11,19	0,41	24,56	24,63	24,59	0,05
12	11,37	10,80	11,09	0,40	24,41	24,53	24,47	0,08
13	11,31	10,69	11,0	0,44	24,35	24,51	24,43	0,11
14	11,22	10,57	10,89	0,46	24,34	24,44	24,39	0,07

BS: valor medio de Back Scattering; Span 80, S80; Span 85, S85; Span 80-Tween 80, S80-T80; Polirricinoleato de poliglicerol, PGPR.

Tabla 9.15 Diámetros de las microesferas preparadas a partir de citrato de calcio y 5% p/p de varios tensioactivos (S80, S85, S80-T80 y PGPR).

S80					S85					S80-T80				
3,66	12,91	22,52	33,86	50,30	4,76	11,55	16,37	21,75	29,90	7,14	26,56	37,90	51,82	75,60
5,44	12,93	23,12	33,98	50,98	4,76	11,55	16,37	21,76	29,91	9,0	26,60	38,03	51,97	75,61
5,48	13,0	23,80	33,98	51,13	4,81	11,55	16,99	21,76	29,91	9,80	26,93	38,44	54,60	75,61
6,12	13,59	23,94	34,66	52,0	4,90	11,55	16,99	21,76	29,93	9,80	28,0	39,20	54,62	77,0
6,12	13,59	24,02	35,0	52,33	5,44	11,55	16,99	21,76	30,58	11,29	28,0	39,22	54,62	77,01
6,12	13,61	24,47	35,0	52,37	5,48	11,55	16,99	21,76	30,59	12,0	28,03	39,22	54,62	77,11
6,83	13,74	24,48	35,03	52,37	5,48	11,57	17,0	21,76	30,61	12,60	28,03	39,42	54,67	77,32
6,83	13,86	24,48	35,25	53,20	5,48	11,57	17,0	21,76	30,70	12,68	28,14	39,42	54,67	78,40
6,83	14,0	25,0	35,35	53,22	6,12	11,63	17,0	21,76	31,26	12,68	28,86	40,09	54,76	78,41
7,0	14,27	25,15	35,35	53,71	6,12	11,73	17,0	21,79	31,29	14,0	29,43	40,60	56,0	78,41
7,10	14,29	25,15	36,43	54,62	6,12	12,23	17,0	21,84	31,94	14,07	29,43	40,60	56,0	78,45
7,48	14,97	25,18	36,51	54,67	6,12	12,23	17,04	22,43	31,97	14,28	29,43	40,82	56,02	79,80
7,48	15,01	25,23	36,70	55,05	6,15	12,23	17,68	22,43	33,33	14,62	29,53	41,77	56,16	79,81
7,51	15,65	25,24	37,0	56,07	6,27	12,23	17,68	22,44	33,99	15,40	29,53	42,0	56,28	81,21
8,16	15,69	25,83	37,38	56,07	6,80	12,25	17,68	22,44	33,99	15,40	29,53	42,0	57,40	81,21
8,16	15,69	25,86	37,40	56,07	6,80	12,25	17,68	22,44	34,01	15,46	29,93	42,0	57,47	81,31
8,16	16,31	26,50	37,40	57,40	6,80	12,25	17,68	22,44	34,04	15,65	30,83	42,02	57,47	81,79
8,16	16,32	26,54	37,80	57,42	6,80	12,25	17,68	22,44	35,34	15,65	30,83	42,02	58,8	81,97
8,18	16,37	26,54	37,80	57,83	6,80	12,91	17,68	22,44	35,57	15,65	30,93	42,02	58,82	82,61
8,52	16,86	26,60	37,83	58,46	6,80	12,91	17,72	22,44	36,02	16,80	30,93	42,09	58,82	82,71
8,83	16,99	26,60	37,83	60,22	7,48	12,91	17,72	23,79	36,04	16,86	30,93	43,40	58,82	83,18
8,83	16,99	26,64	38,06	60,27	7,51	12,91	18,35	23,80	36,70	16,86	32,20	43,42	58,82	84,0
8,86	17,0	27,18	38,06	61,01	7,51	12,91	18,36	24,47	37,38	18,20	32,23	43,42	58,87	85,45
8,86	17,0	27,18	38,11	62,01	8,16	12,93	18,36	24,48	38,74	18,20	32,23	43,49	58,87	86,98
8,94	17,04	27,19	38,74	62,53	8,16	12,93	18,40	24,48	39,42	18,20	32,32	43,60	58,87	87,08
9,06	17,68	27,19	38,79	62,54	8,16	12,93	18,46	24,48	39,42	18,25	33,60	44,80	59,07	88,20
9,51	17,72	27,22	39,20	63,06	8,16	13,59	18,46	24,48	39,42	18,41	33,60	44,82	60,20	88,30
9,51	17,72	27,22	39,22	64,42	8,18	13,59	18,46	24,48	39,44	18,41	33,60	44,82	60,20	89,61
9,51	17,79	27,86	39,22	64,42	8,18	13,61	19,03	24,50	40,40	19,60	33,60	44,89	60,22	89,61
9,51	18,20	27,87	39,42	65,92	8,83	13,61	19,03	24,50	40,78	19,60	33,63	45,0	60,27	89,61
9,51	18,20	27,9	40,12	65,94	8,83	13,61	19,03	25,18	42,14	19,60	33,63	45,0	61,62	91,17
9,54	18,20	28,0	40,20	65,95	8,83	13,74	19,03	25,29	42,82	19,60	33,63	45,0	61,66	92,41
9,61	18,35	28,03	40,60	66,27	8,83	14,01	19,04	25,83	42,84	19,65	33,63	46,20	61,66	93,81
9,61	18,36	28,58	41,48	67,21	8,83	14,27	19,08	25,83	43,50	19,65	33,72	46,20	63,06	93,97
9,73	18,36	28,58	42,0	67,21	8,86	14,29	19,08	25,83	43,52	19,65	33,72	46,20	63,14	98,09
10,19	18,41	28,75	42,0	67,26	8,86	14,42	19,08	25,83	43,54	20,81	33,72	46,20	63,14	100,0
10,19	19,0	29,35	42,14	67,96	8,86	14,53	19,33	26,50	44,18	21,0	33,86	46,22	64,4	100,8
10,87	19,03	29,43	42,14	68,61	8,86	14,95	19,71	26,51	44,87	21,05	33,86	46,22	64,46	102,2
10,89	19,04	29,43	42,16	68,66	8,94	14,95	19,72	26,54	45,55	21,05	34,06	46,22	64,46	103,6
10,89	19,6	30,58	42,22	70,13	9,51	14,95	19,72	27,18	45,55	21,05	34,06	46,28	64,46	103,6
10,89	19,65	30,59	42,82	70,69	9,51	14,97	20,39	27,18	46,21	21,42	35,0	46,28	65,81	105,5
11,05	19,65	30,61	42,84	71,37	9,51	14,97	20,39	27,19	47,59	22,40	35,0	46,39	65,86	106,4
11,06	19,71	30,61	43,49	74,67	9,54	14,97	20,39	27,22	48,25	22,40	35,0	47,0	65,86	106,4
11,20	19,71	30,80	43,50	77,0	9,54	14,97	20,40	27,22	48,94	22,44	35,03	47,60	65,93	109,2
11,20	19,72	30,83	44,0	78,01	9,61	15,63	20,40	27,86	49,61	22,44	35,03	47,60	67,20	112,0
11,20	19,76	30,83	44,17	81,25	10,19	15,63	20,40	27,87	50,31	22,44	35,45	47,60	67,21	112,1
11,29	19,76	30,83	44,17	84,19	10,19	15,65	20,40	27,90	51,67	23,84	36,35	47,60	67,33	113,4
11,29	20,39	30,83	44,85	84,96	10,19	15,65	20,40	27,90	51,87	23,84	36,40	47,60	68,61	114,8
11,55	20,4	30,93	44,85	85,01	10,22	15,65	20,49	27,90	52,33	23,84	36,40	47,62	68,61	116,7
11,57	20,43	31,29	44,86	89,61	10,22	15,65	20,67	28,54	52,35	23,84	36,43	47,62	68,66	120,6
11,63	21,0	31,94	45,04	89,87	10,22	15,65	21,07	28,54	54,41	23,96	36,43	47,68	68,66	123,3
11,63	21,0	31,97	45,54	91,05	10,28	15,69	21,08	28,55	56,41	24,45	36,43	47,93	68,73	124,7
12,04	21,0	32,06	46,22	93,02	10,87	16,31	21,08	28,55	56,41	25,0	36,64	49,0	70,0	126,1
12,23	21,07	32,23	46,89	96,69	10,87	16,31	21,08	28,58	58,45	25,20	36,83	49,02	70,0	138,6
12,23	21,75	32,32	47,58	99,91	10,89	16,31	21,11	28,58	58,48	25,20	37,80	50,40	70,35	148,0
12,31	22,40	32,62	47,60	103,6	10,96	16,31	21,11	29,23	60,49	25,20	37,83	50,42	72,81	151,4
12,31	22,40	32,65	47,60	103,6	11,55	16,31	21,11	29,23	61,20	25,24	37,83	50,48	73,02	154,0
12,60	22,40	32,68	47,62	120,4	11,55	16,31	21,75	29,25	63,90	25,36	37,83	50,48	73,14	219,8
12,60	22,40	33,60	47,68	124,7	11,55	16,31	21,75	29,25	63,97	25,55	37,83	50,57	74,20	219,9
12,91	22,43	33,60	49,0	141,5	11,55	16,32	21,75	29,25	73,41	25,81	37,90	50,57	74,32	260,5
PGPR														
1,66	3,13	3,66	4,10	4,76	5,44	6,12	6,80	7,48	8,18	8,86	10,87	12,25	14,95	21,84
1,66	3,15	3,71	4,13	4,76	5,44	6,12	6,80	7,48	8,18	8,96	10,87	12,25	14,97	21,92
1,99	3,15	3,71	4,13	4,81	5,44	6,12	6,80	7,48	8,21	8,96	10,87	12,32	15,26	22,60
2,02	3,32	3,78	4,13	4,81	5,44	6,15	6,80	7,51	8,27	9,29	10,95	12,44	15,63	23,12
2,10	3,32	3,87	4,20	4,81	5,48	6,27	6,83	7,51	8,29	9,37	10,95	12,62	15,76	26,75
2,10	3,32	3,87	4,31	4,98	5,64	6,30	6,83	7,60	8,29	9,51	10,96	12,91	16,31	27,0
2,15	3,32	3,88	4,31	4,98	5,64	6,31	6,97	7,60	8,30	9,54	10,97	12,91	16,32	27,18
2,32	3,33	3,98	4,31	4,98	5,64	6,31	6,97	7,63	8,32	9,54	11,06	13,59	16,37	32,54
2,39	3,33	3,98	4,31	4,99	5,65	6,31	7,0	7,64	8,35	9,54	11,30	13,59	16,95	33,41
2,65	3,33	3,98	4,33	4,99	5,65	6,34	7,0	7,64	8,41	9,61	11,30	13,60	17,26	33,99
2,65	3,33	3,98	4,33	5,02	5,68	6,34	7,0	7,69	8,41	9,61	11,55	13,61	17,79	42,14
2,67	3,40	3,98	4,33	5,31	5,68	6,64	7,09	7,75	8,63	9,63	11,55	13,66	17,91	59,13
2,67	3,40	3,98	4,36	5,31	5,88	6,64	7,10	7,96	8,63	9,63	11,55	14,03	17,94	75,44
2,67	3,40	4,04	4,36	5,32	5,98	6,64	7,30	8,16	8,83	10,19	11,55	14,27	18,46	84,27
2,74	3,40	4,04	4,66	5,35	6,05	6,67	7,31	8,16	8,83	10,19	11,57	14,27	18,91	91,95
2,74	3,65	4,04	4,66	5,35	6,05	6,80	7,33	8,16	8,83	10,22	11,63	14,28	19,08	97,87
2,99	3,66	4,08	4,66	5,35	6,12	6,80	7,33	8,16	8,83	10,22	11,63	14,34	19,58	106,0
3,0	3,66	4,08	4,69	5,36	6,12	6,80	7,42	8,16	8,83	10,31	11,73	14,34	19,76	115,1
3,0	3,66	4,08	4,69	5,40	6,12	6,80	7,48	8,16	8,83	10,40	11,95	14,53	19,91	188,3
3,0	3,66	4,08	4,75	5,44	6,12	6,80	7,48	8,18	8,86	10,64	12,23	14,73	21,76	313,4

9.4 Datos para caracterización del extracto de cacao.

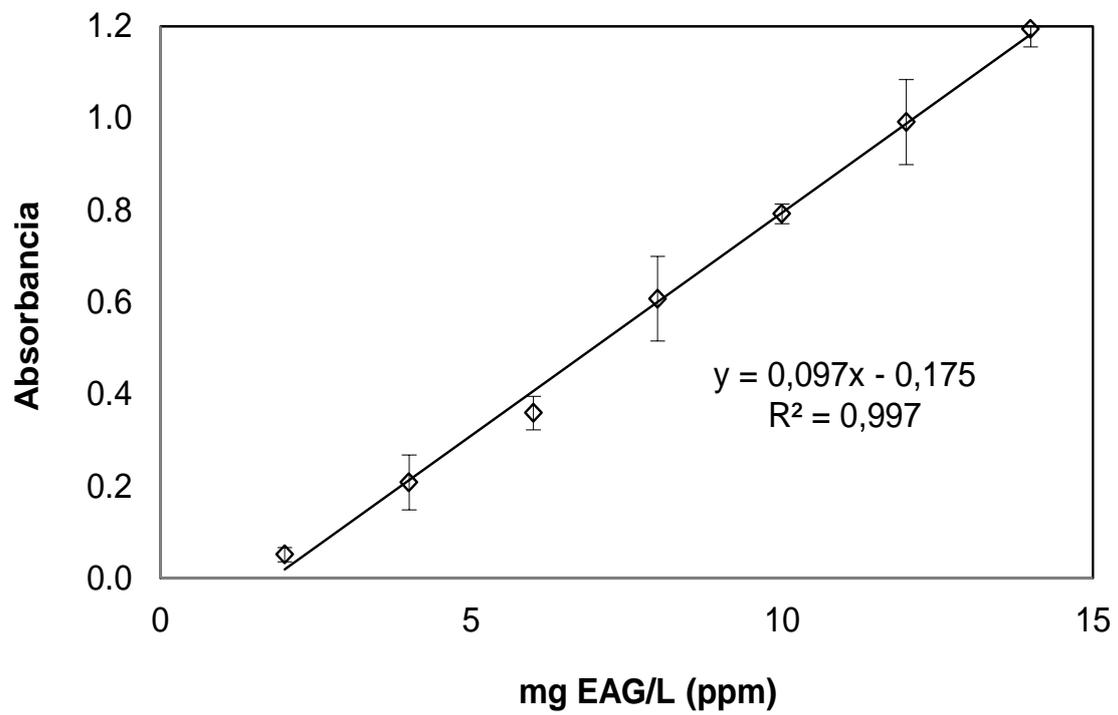


Figura 9.8 Recta de calibrado con ácido gálico para el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de los polifenoles totales en el extracto de cacao encapsulado.

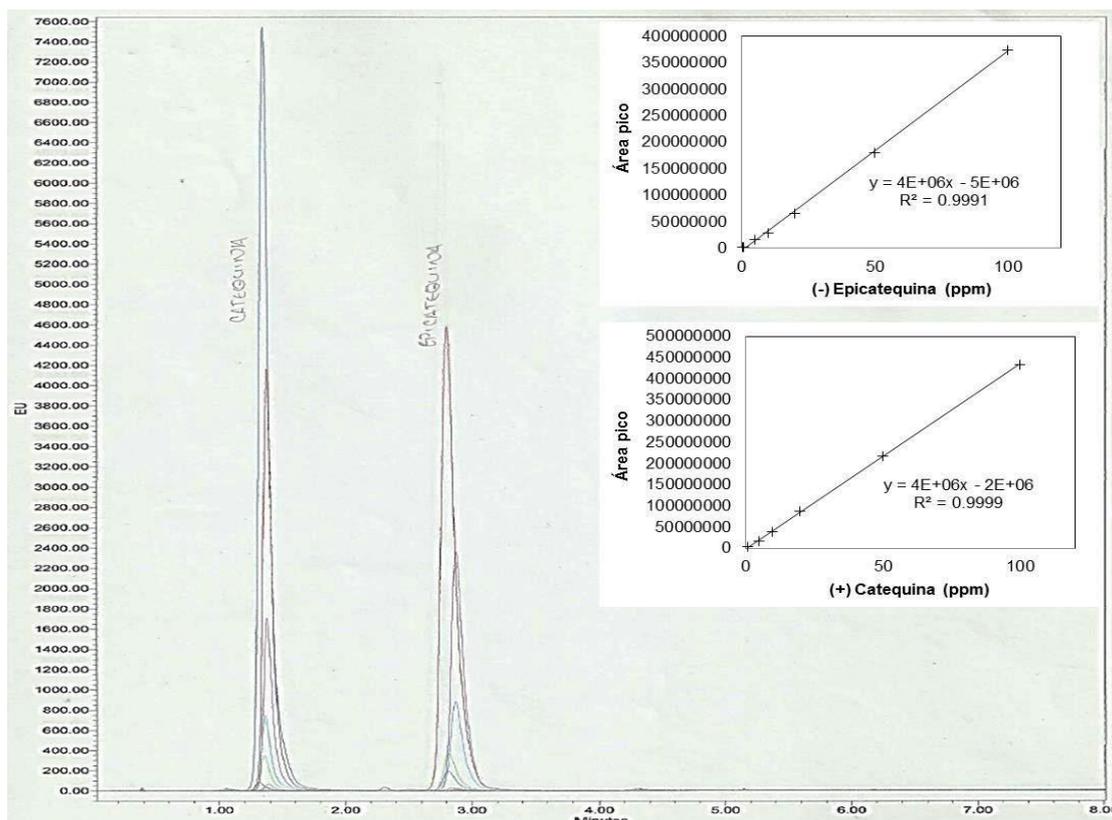


Figura 9.9 Espectros UPLC de los patrones de (-) Epicatequina y (+) Catequina.

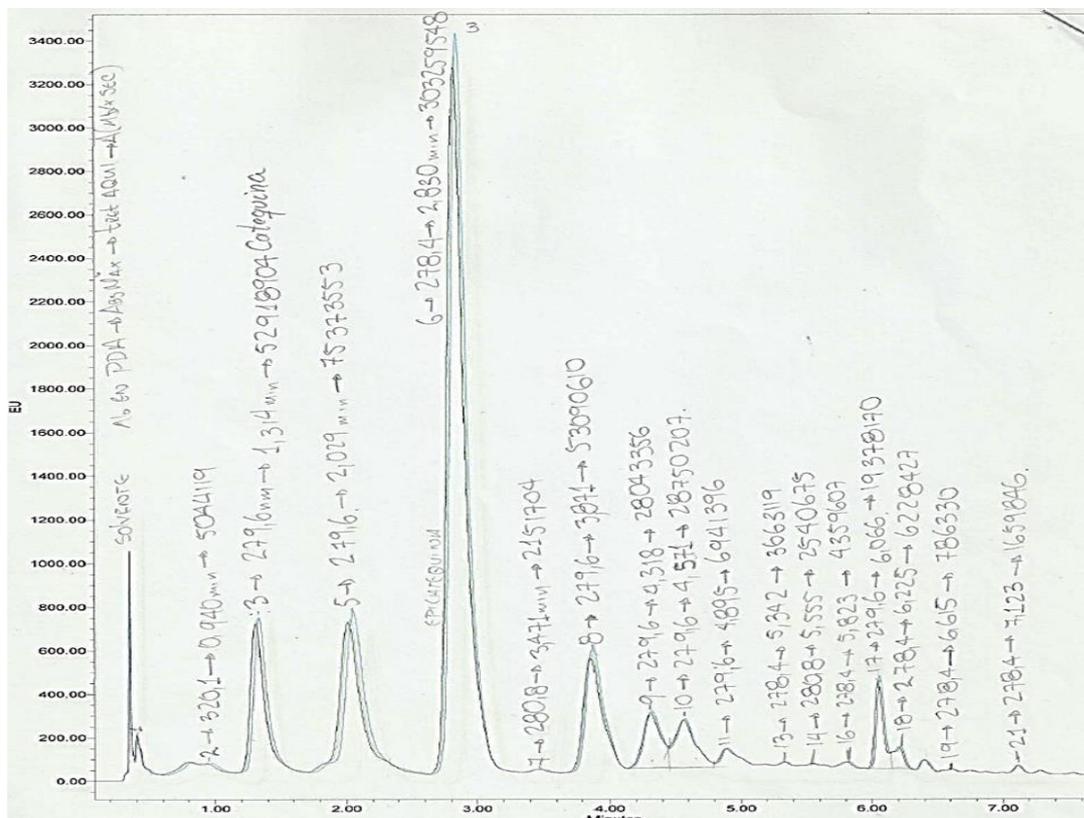


Figura 9.10 Espectros UPLC del extracto de cacao en solución de 1000 ppm.

9.5 Viscosidad estacionaria de la fase dispersa para el estudio de preparación de las microesferas en emulsión con el extracto de cacao.

Tabla 9.16 Viscosidad estacionaria de la fase dispersa a pH ácido y neutro y su evolución con el tiempo.

γ (1/s)	<i>FD pH neutro</i>		<i>FD pH ácido</i>	
	t_1 η (Pa.s)	t_2 η (Pa.s)	t'_1 η' (Pa.s)	t'_2 η' (Pa.s)
0,01	2,159	2,881	10,01	89,90
0,015	2,390	3,021	14,14	151,9
0,022	2,575	2,887	16,03	163,5
0,033	2,706	2,792	14,66	135,2
0,049	2,857	2,831	15,66	120,8
0,074	2,915	2,707	13,75	102,8
0,111	2,873	2,612	11,28	80,28
0,165	2,888	2,542	9,835	63,66
0,246	2,901	2,536	8,615	50,58
0,368	2,895	2,508	7,727	36,03
0,549	2,878	2,550	7,418	28,25
0,819	2,838	2,514	6,746	21,67
1,222	2,779	2,503	6,235	17,07
1,824	2,687	2,495	5,674	13,90
2,722	2,561	2,453	5,054	10,93
4,062	2,410	2,393	4,441	8,147
6,063	2,227	2,309	3,855	5,911
9,049	2,022	2,198	3,270	4,356
13,51	1,845	2,058	2,758	3,465
20,16	1,721	1,904	2,226	3,012
30,08	1,515	1,721	1,868	2,38
44,9	1,295	1,515	1,544	1,977
67,01	1,106	1,295	1,265	1,556
100,0	1,089	1,089	1,028	1,236

FD: fase dispersa; pH ácido, 4,5 pH; pH neutro, 6,5-6,8; t_1 , tiempo 6 min; t_2 , tiempo 32 min; γ , gradiente de velocidad y η , viscosidad estacionaria.

9.6 Caracterización de las esferas de alginato/cacao preparadas por extrusión con diferentes mecanismos de gelificación: diámetros, morfología y textura.

Tabla 9.17 Diámetros de las esferas de alginato/cacao.

Esferas	Diámetros número-longitud (mm)							
	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄
1	3,17	3,38	3,05	4,12	4,5	4,15	4,49	4,68
2	4,01	3,35	4,08	3,57	4,37	4,46	4,23	4,93
3	3,95	3,19	4,59	3,12	4,63	3,99	5,18	4,52
4	4,04	3,08	3,48	3,46	4,29	4,19	4,5	4,75
5	3,96	3,76	4,75	3,58	4,55	3,72	5,07	4,29
6	4,08	3,88	4,56	4,24	3,94	4,29	4,48	3,96
7	3,46	3,7	3,91	3,77	4,6	4,45	4,4	4,27
8	3,28	3,64	3,92	3,69	4,37	4,23	4,3	3,89
9	3,49	3,87	3,58	3,53	4,25	4,07	4,01	4,23
10	3,03	3,51	3,69	3,68	4,69	4,99	4,27	3,78
11	3,54	2,72	4,37	3,9	4,73	4,08	4,22	4,41
12	3,42	3,38	4,51	3,42	3,72	3,67	4,41	4,89
13	4,1	3,55	3,7	4,02	4,40	3,61	4,04	4,19
14	3,37	3,59	3,93	3,67	4,88	4,42	3,84	4,29
15	3,8	3,35	4,34	3,29	4,31	4,2	4,1	3,89
d_i medio	3,65	3,46	4,03	3,67	4,42	4,17	4,37	4,33
DE	0,36	0,31	0,48	0,31	0,30	0,35	0,36	0,35

Gelificación externa, E; Gelificación interna, I; Subíndices 1 y 2 para 1% p/p y subíndices 3 y 4 para 3% p/p extracto de cacao encapsulado; Además, subíndices 1 y 3 para las esferas preparadas con $0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato y los subíndices 2 y 4 para las esferas preparadas con $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato; Diámetro medio número-longitud, d_i (\pm desviación estándar, DE).

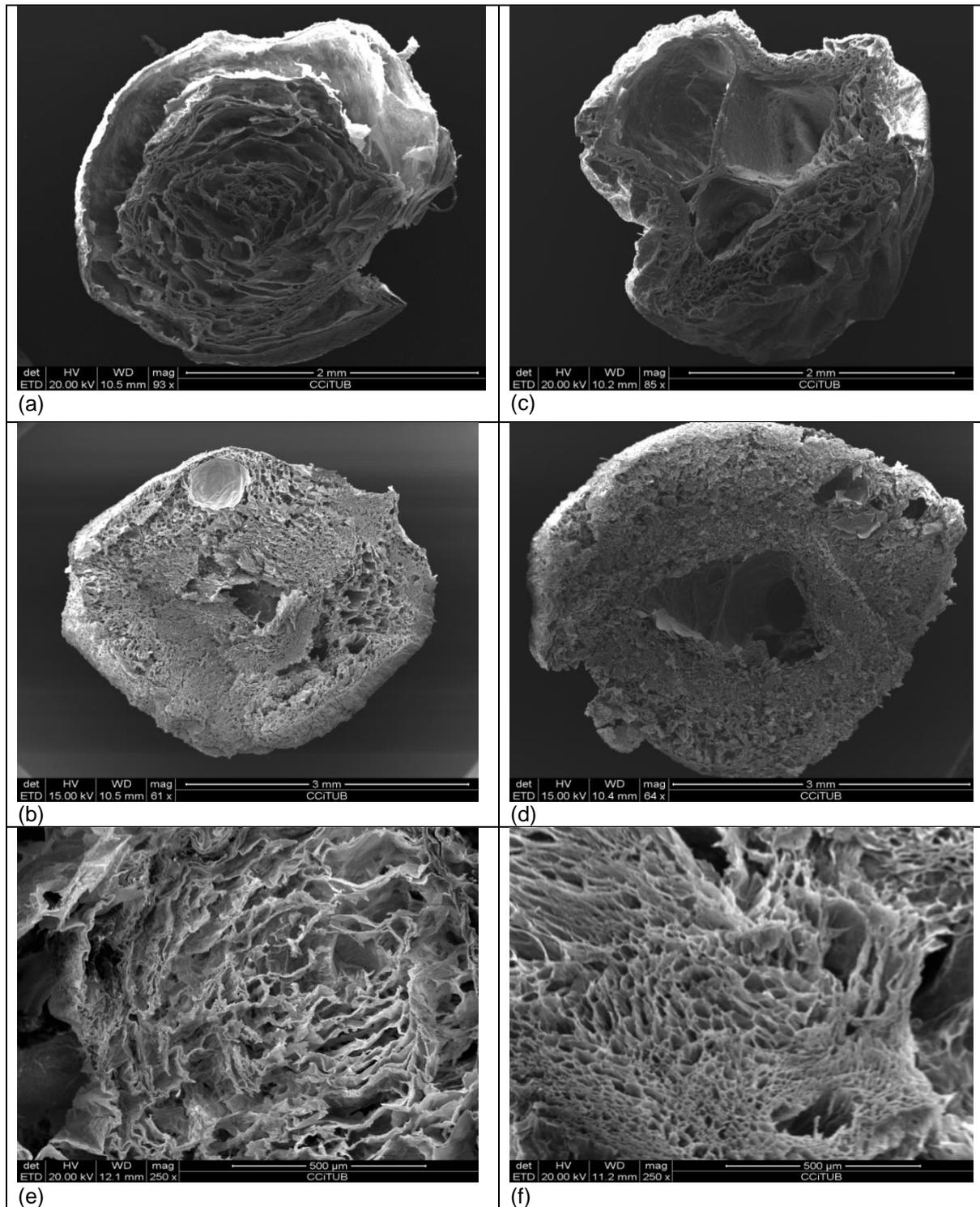


Figura 9.11 Imágenes de SEM para las esferas liofilizadas obtenidas a partir de $0,4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2}/g alginato (baja concentración de calcio). Alginato 2%/cacao 1% p/p por GE, (a); Alginato 2%/cacao 1% p/p por GI, (b); Alginato 2%/cacao 3% p/p por GE, (c); Alginato 2%/cacao 3% p/p por GI, (d); Esferas de alginato 2% p/p control por GE, (e) y Esferas de alginato 2% p/p control por GI, (f).

Tabla 9.18 Propiedades mecánicas de textura de las esferas alginato/cacao para las diferentes formulaciones.

Formulación	Dureza (N)					Elasticidad					
	F _n	D ₁	D ₂	D ₃	D _{prom}	DE	E ₁	E ₂	E ₃	E _{prom}	DE
E ₁	2,811	2,291	3,039	2,714	0,383		0,792	0,792	0,792	0,792	0,000
E ₂	2,579	3,213	3,714	3,169	0,569		0,80	0,799	0,799	0,799	0,001
I ₁	0,256	0,218	0,199	0,224	0,029		0,792	0,792	0,792	0,792	0,000
I ₂	0,911	0,986	0,971	0,956	0,040		0,808	0,833	0,842	0,828	0,018
E ₃	3,141	2,290	3,08	2,837	0,475		0,792	0,792	0,808	0,797	0,009
E ₄	2,247	2,056	2,541	2,281	0,244		0,799	0,792	0,808	0,800	0,008
I ₃	0,574	0,552	0,275	0,467	0,167		0,799	0,799	0,833	0,810	0,020
I ₄	1,111	0,869	0,869	0,950	0,140		0,834	0,825	0,800	0,820	0,018
Formulación	Cohesividad					Gomosidad (N)					
	F _n	C ₁	C ₂	C ₃	C _{prom}	DE	G ₁	G ₂	G ₃	G _{prom}	DE
E ₁	0,534	0,506	0,482	0,507	0,026		2,635	1,538	1,354	1,842	0,693
E ₂	0,489	0,470	0,465	0,475	0,013		1,262	1,747	1,495	1,501	0,243
I ₁	0,628	0,607	0,726	0,654	0,064		0,327	0,132	0,161	0,207	0,105
I ₂	0,622	0,641	0,724	0,662	0,054		0,567	0,632	0,703	0,634	0,068
E ₃	0,496	0,478	0,467	0,480	0,015		1,556	1,094	1,836	1,495	0,375
E ₄	0,431	0,459	0,448	0,446	0,014		0,886	1,909	0,952	1,249	0,573
I ₃	0,619	0,559	0,574	0,584	0,031		0,409	0,416	0,164	0,329	0,144
I ₄	0,714	0,754	0,604	0,619	0,078		0,452	0,151	0,438	0,347	0,170
Formulación	Masticabilidad										
	F _n	M ₁	M ₂	M ₃	M _{prom}	DE					
E ₁	0,821	1,084	1,230	1,045	0,207						
E ₂	2,286	1,384	1,184	1,618	0,587						
I ₁	0,127	0,105	0,269	0,167	0,089						
I ₂	0,458	0,526	0,592	0,525	0,067						
E ₃	0,701	1,476	0,866	1,014	0,408						
E ₄	1,749	1,543	1,233	1,508	0,259						
I ₃	0,342	0,343	0,361	0,349	0,011						
I ₄	0,700	0,661	0,781	0,714	0,061						

Formulación, F_n; Gelificación externa, E; Gelificación interna, I; Subíndice 1 y 2 para las esferas con 1% p/p y subíndices 3 y 4 para las esferas con 3% p/p de extracto de cacao encapsulado; Donde subíndice 1 y 3 se utiliza 0,4·10⁻³ moles Ca⁺²/g alginato y subíndices 2 y 4 se utiliza 1·10⁻³ moles Ca⁺²/g alginato para la preparación de esferas alginato/cacao; Dureza de las muestras 1, 2, 3 (D₁, D₂, D₃) y su valor medio, D_{prom}; Cohesividad de las muestras 1, 2, 3 (C₁, C₂, C₃) y su valor medio, C_{prom}; Elasticidad de las muestras 1, 2, 3 (E₁, E₂, E₃) y su valor medio, E_{prom}; Gomosidad de las muestras 1, 2, 3 (G₁, G₂, G₃) y su valor medio, G_{prom}; Masticabilidad de las muestras 1, 2, 3 (M₁, M₂, M₃) y su valor medio, M_{prom}; Desviación estándar, DE; Unidad de Fuerza, N.

Tabla 9.19 Datos estadísticos para el Test Triangular.

Table 2: Minimum Numbers of Correct Judgments to Establish Significance at Various Probability Levels for the Triangle tests (one tailed, $p = 1/3$)

No. of trials (n)	Probability Levels						
	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.005	0.001
5	4	5	5	5	5	5	
6	5	5	5	5	6	6	
7	5	6	6	6	6	7	7
8	6	6	6	6	7	7	8
9	6	7	7	7	7	8	8
10	7	7	7	7	8	8	9
11	7	7	8	8	8	9	10
12	8	8	8	8	9	9	10
13	8	8	9	9	9	10	11
14	9	9	9	9	10	10	11
15	9	9	10	10	10	11	12
16	9	10	10	10	11	11	12
17	10	10	10	11	11	12	13
18	10	11	11	11	12	12	13
19	11	11	11	12	12	13	14
20	11	11	12	12	13	13	14
21	12	12	12	13	13	14	15
22	12	12	13	13	14	14	15
23	12	13	13	13	14	15	16
24	13	13	13	14	15	15	16
25	13	14	14	14	15	16	17
26	14	14	14	15	15	16	17
27	14	14	15	15	16	17	18
28	15	15	15	16	16	17	18
29	15	15	16	16	17	17	19
30	15	16	16	16	17	18	19
31	16	16	16	17	18	18	20
32	16	16	17	17	18	19	20
33	17	17	17	18	18	19	21
34	17	17	18	18	19	20	21
35	17	18	18	19	19	20	22
36	18	18	18	19	20	20	22
37	18	18	19	19	20	21	22
38	19	19	19	20	21	21	23
39	19	19	20	20	21	22	23
40	19	20	20	21	21	22	24
41	20	20	20	21	22	23	24
42	20	20	21	21	22	23	25
43	20	21	21	22	23	24	25
44	21	21	22	22	23	24	26
45	21	22	22	23	24	24	26
46	22	22	22	23	24	25	27
47	22	22	23	23	24	25	27
48	22	23	23	24	25	26	27
49	23	23	24	24	25	26	28
50	23	24	24	25	26	26	28
60	27	27	28	29	30	31	33
70	31	31	32	33	34	35	37
80	35	35	36	36	38	39	41
90	38	39	40	40	42	43	45

9.7 Publicaciones.



Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 3 (1): 130-151. Enero-Junio, 2012
<http://www.rvcta.org>
ISSN: 2218-4384 (versión en línea)
© Asociación RVCTA, 2012. RIF: J-29910863-4. Depósito Legal: ppi201002CA3536.

Revisión

Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones

Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications

Bryshila Lupo Pasin^{1*}, Carmen González Azón², Alicia Maestro Garriga²

¹Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Núcleo Obelisco, Programa de Ingeniería Agroindustrial. Av. Florencio Jiménez, Barquisimeto, Lara, Venezuela.

²Universitat de Barcelona, Facultat de Química. Calle Martí i Franquès, 1-11, 08028, Barcelona, Cataluña, España.

*Autora para correspondencia: bryshilalupo@ucla.edu.ve

Aceptado 03-Julio-2012

Resumen

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de las técnicas de microencapsulación con alginato para aplicaciones en alimentos. El alginato ha sido uno de los polímeros más empleado en la microencapsulación, este forma una matriz altamente versátil, biocompatible y no tóxica para la protección de componentes activos, células o microorganismos sensibles al calor, pH, oxígeno y luz, entre otros factores, a los que son expuestos los alimentos durante el procesamiento y almacenaje. El proceso de microencapsulación con alginato se lleva a cabo a través de dos mecanismos de gelificación iónica: la gelificación externa y la gelificación interna, dependiendo de si el calcio se suministra desde fuera de las cápsulas o en el interior de las mismas. Para la preparación de microcápsulas de alginato de calcio con aplicaciones alimentarias, se tienen las técnicas por extrusión, en emulsión y secado por atomización. Aunque el secado por atomización ha sido para la industria un proceso práctico y económico, su aplicación con alginato se ha visto limitada por la viscosidad y velocidad de gelificación. Por el contrario, la técnica por extrusión ha sido la técnica tradicional empleada en las últimas décadas, debido a la uniformidad de las microcápsulas en su forma y tamaño. En este sentido, la técnica en emulsión es la aplicada más recientemente, la cual ha demostrado ser sencilla y de producción a gran escala. En la actualidad se desarrollan nuevas tecnologías a fin de disminuir el tamaño de las microcápsulas para así ampliar sus usos en la industria. Entre las últimas tendencias de

microencapsulación, se estudian sistemas mixtos de matrices poliméricas con la finalidad de obtener propiedades físico-químicas combinadas, permitiendo hacer el proceso de encapsulación más eficiente tanto para la protección como para la liberación controlada del principio activo.

Palabras claves: alginato, emulsión, extrusión, gelificación, microencapsulación y secado por atomización.

Abstract

The objective of the work was to review the alginate microencapsulation techniques for food applications. Alginate has been one of the most widely used polymers in microencapsulation, the matrix forms a highly versatile, biocompatible and nontoxic for the protection of active components, cells or microorganisms sensitive to heat, pH, oxygen, light and others factors which are exposed to foods during processing and storage. The gelation process of calcium alginate for the preparation of the microcapsules is possible by two mechanisms of ionic gelation: external and internal gelation depending on whether the calcium is supplied from outside the capsule or within the same. For preparing calcium alginate microcapsules into food applications, there are techniques such as: extrusion, emulsion and spray drying. Although spray drying has been a simple and economic process for industry, the application with alginate has been limited by the viscosity of solution and the speed of gelation. Moreover, the technique by extrusion has been traditionally used due of the homogeneity of the microcapsules in shape and sizes. While the emulsion technique has been used more recently, proving to be easy to apply and mass production. Nowadays new technologies are developed to decrease the size of the microcapsules thus extending its application in industry. Among the latest trends in microencapsulation, new systems are studied by using mixed polymers matrices in order to obtain combined physical-chemical properties, that allowing microencapsulation process being more efficient for the protection and controlled release of active ingredient.

Keywords: alginate, emulsion, extrusion, gelation, microencapsulation and spray drying.

INTRODUCCIÓN

El alginato ha sido usado debido a sus múltiples ventajas tanto para el consumo humano como versatilidad en aplicaciones industriales. Tales aspectos han sido compilados en la literatura por Imeson (2010) resaltando el efecto prebiótico de los alginatos de bajo peso molecular, los beneficios de su ingesta como fibra diaria para la reducción de los niveles de azúcar y colesterol en sangre, así como, la capacidad para prolongar la vida útil en productos. Las nuevas tendencias tecnológicas se han enfocado en la producción

de alimentos reestructurados y funcionales a partir de compuestos activos como antioxidantes, vitaminas, aminoácidos, minerales e incluso de pequeñas moléculas como células, enzimas y microorganismos probióticos beneficiosos para la salud, y por tanto, de su conservación en los alimentos durante el procesamiento y almacenaje (Parras-Huertas, 2010). Estas ventajas del alginato y las recientes tendencias tecnológicas se han fusionado en la técnica de microencapsulación, resultando en un producto final que permite proteger a los compuestos encapsulados de factores adversos como el calor y la humedad,

mejorando así su estabilidad y biodisponibilidad. En este sentido, la microencapsulación puede ser usada como medio para enmascarar o preservar sabores y aromas al hacer funciones de aislante.

El concepto de encapsulación se ha fundamentado en la incorporación de una matriz polimérica, la cual forma un ambiente capaz de controlar su interacción con el exterior. La técnica de microencapsulación ha sido descrita como un proceso en donde pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento homogéneo o heterogéneo integrado a las cápsulas con variadas aplicaciones (Borgogna *et al.*, 2010). Una definición general de encapsulación dada por Desai y Park (2005) se refirió al empaquetado de materiales sólidos, líquidos o gaseosos mediante cápsulas que liberan su contenido de forma controlada bajo condiciones determinadas. Estas especificaciones han llevado a describir la microencapsulación como, la técnica de obtención de una barrera que retarda las reacciones químicas con el medio que lo rodea promoviendo un aumento en la vida útil del producto, la liberación gradual del compuesto encapsulado e incluso facilitando su manipulación al convertir un material líquido o gaseoso a una forma sólida llamada microcápsula (Fang y Bhandari, 2010). Una microcápsula consiste en una membrana esférica, semipermeable, delgada y fuerte que rodea un núcleo sólido o líquido, con un diámetro que varía de pocos micrones a 1000 μm . El núcleo que compone la microcápsula es también denominado fase interna o principio activo, así como a la membrana se puede nombrar capa externa o matriz. En este sentido, las micropartículas, microcápsulas o microesferas son definidas como el producto del proceso de microencapsulación dependiendo de cual sea su morfología y estructura interna (Anal y Singh, 2007; Saez *et al.*, 2007). Las microcápsulas se han diferenciado de las microesferas principalmente

por la distribución del principio activo. En el primer caso, el núcleo puede ser de naturaleza líquida o sólida incluido en una especie de reservorio recubierto por una película del material. Mientras que, en las microesferas, el principio activo se encuentra altamente disperso en forma de partículas o moléculas en una matriz. La obtención de un tipo de estructura u otra depende de las propiedades físico-químicas del principio activo y de la matriz, así como de la técnica empleada para su preparación (Lopretti *et al.*, 2007). Las microcápsulas pueden tener forma esférica o irregular. Asimismo, pueden estar constituidas por una membrana simple, múltiples capas e incluso núcleos múltiples cuya matriz puede ser del mismo material o una combinación de varios tal como se muestra en la Fig.1 (Gibbs *et al.*, 1999).

Los hidrocoloides han sido empleados como matriz debido a su capacidad para absorber agua, fácil manipulación e inocuidad. El alginato es un hidrocoloide que posee tanto estas características como propiedades gelificantes, estabilizantes y espesantes, razones por las cuales ha sido de gran interés para la industria alimentaria. El alginato es descrito como un polisacárido lineal poliiónico e hidrofílico proveniente de algas marinas conformado por dos monómeros en su estructura, el ácido α -L-gulurónico (G) y el ácido β -D-manurónico (M) que se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo G-bloques (-GGG-), M-bloques (-MMM-) o heteropolímeros donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-). Tanto la distribución de sus monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen de los grupos carboxílicos confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido en G. Si en su estructura polimérica se tiene mayor cantidad de G-bloques, generalmente el gel es fuerte y frágil, mientras que con la presencia de mayor proporción de M-bloques el gel formado se presenta suave y

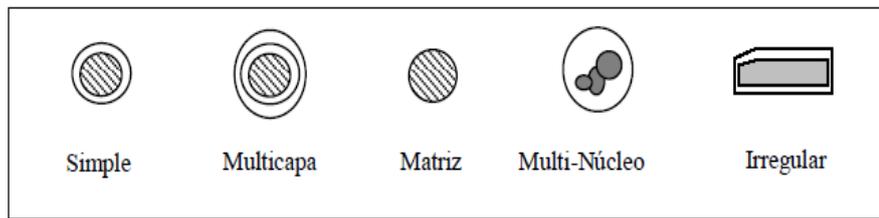


Figura 1.- Tipos de microcápsulas.

elástico. El proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes (excepto el magnesio) donde el ión calcio es el más empleado por la industria alimentaria. La gelificación tiene lugar al producirse una zona de unión entre un G-bloque de una molécula de alginato que se enlaza físicamente a otro G-bloque contenido en otra molécula de alginato a través del ión calcio. La visualización de la estructura física es denominada modelo “caja de huevos” por Draget (2000), mostrada en la Fig. 2 (Reddy-K. y Reddy, P., 2010).

Entre las sales de alginato más empleadas se han encontrado la sal de sodio debido a su alta solubilidad en agua fría y característica transición sol-gel de forma instantánea e irreversible ante el ión calcio (Funami *et al.*, 2009). También, se han desarro-

llado alginatos modificados químicamente tales como el alginato de propilenglicol empleado en la fabricación de cervezas y aderezos para ensaladas por su alta solubilidad a bajos pH. Así como otras dos nuevas familias, los derivados de la sal de amonio cuaternaria del ácido alginico y los obtenidos de injertos con acrilato caracterizados por la obtención de geles fuertes y altamente deformables (Draget *et al.*, 1997; Helgerud *et al.*, 2010). En contraste con la mayoría de los polisacáridos, el alginato forma geles prácticamente independientes de la temperatura, aspecto que lo ha hecho atractivo en la elaboración de cremas, quesos, salsas, y aderezos. Sin embargo, la exposición prolongada a tratamientos de calor y variaciones extremas de pH degrada al polímero, presentado como consecuencia

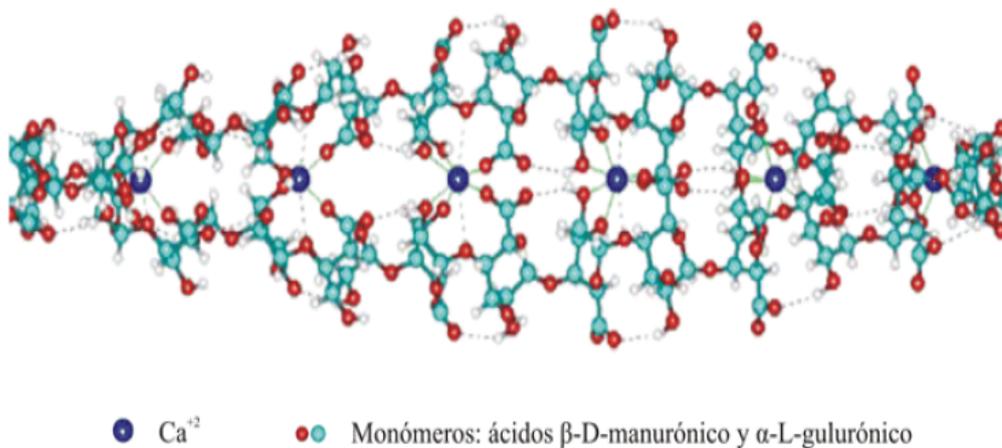


Figura 2.- Modelo “caja de huevos”.

pérdidas en las propiedades del gel (Mancini *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 2004). Adicionalmente, la condición de polielectrolito le ha conferido la capacidad de interactuar con otras moléculas permitiendo formar sistemas mixtos que muestran mejoras en las propiedades estructurales del gel de alginato. Por tanto, al seleccionar una matriz polimérica para la microencapsulación deben considerarse sus propiedades físico-químicas, solubilidad, transición sol-gel (cinética) y permeabilidad (Champagne y Fustier, 2007).

La microencapsulación aplicada en alimentos con el objetivo de preparar productos funcionales, debe tener en cuenta que la incorporación de microcápsulas, micropartículas o microesferas no puede interferir con la textura ni sabor original del alimento (de Vos *et al.*, 2010). En este sentido, se han descrito diferentes aplicaciones de microencapsulación empleando como principio activo: vitaminas, minerales, ácidos grasos, microorganismos probióticos, proteínas, aminoácidos, polifenoles, fibras y enzimas (Sanguansri y Augustin, 2010). Su versatilidad incluso ha llegado a ser aplicada en la alta cocina con el término “Sferificación”, técnica culinaria con el propósito de modificar las propiedades texturales de los alimentos para así desarrollar nuevas sensaciones en el comensal (Corell *et al.*, 2007).

CONTENIDO

- 1.- Mecanismos de gelificación con alginato
 - 1.1.- Gelificación externa
 - 1.2.- Gelificación interna
- 2.- Técnicas de microencapsulación
 - 2.1.- Encapsulación por extrusión
 - 2.2.- Encapsulación en emulsión
 - 2.3.- Encapsulación mediante secado por atomización
- 3.- Tratamientos especiales
- 4.- Aplicaciones
 - 4.1.- Microorganismos probióticos
 - 4.2.- Compuestos activos no microbianos

REVISIÓN DE LA LITERATURA

1.- Mecanismos de gelificación con alginato

El proceso de formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de calcio externa o interna desde donde el ión calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica, como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel. El grado de gelificación depende de la hidratación del alginato, la concentración del ión calcio y el contenido de los G-bloques (Funami *et al.*, 2009). La transición sol-gel se ha visto esencialmente controlada por la habilidad de introducir el ión vinculante al alginato. También se ha observado que la cinética de gelificación y las propiedades del gel pueden depender del tipo de contra-ión, es decir, el ión monovalente de la sal de alginato (K o Na). De hecho, se ha encontrado que los alginatos de potasio presentan un proceso de transición sol-gel más rápido respecto a los alginatos de sodio preparados a bajas concentraciones calcio. Y a pesar que los geles de alginato de calcio obtenidos mostraron semejante estabilidad a simple vista, al ser analizadas sus propiedades reológicas se evidenciaron marcadas diferencias en los módulos elásticos; siendo menores los valores de módulos elásticos para los geles preparados a partir del alginato de sodio que en aquellos con alginato de potasio. En este sentido, se ha señalado que este aspecto de las propiedades viscoelásticas de los geles puede ser contrarrestado utilizando alginatos con mayor composición de ácido gúlorónico en su estructura (Draget, 2000).

Los mecanismos de gelificación iónica se han llevado a cabo fundamentalmente por dos procesos: la gelificación externa y la gelificación interna.

1.1.- Gelificación externa

El proceso de gelificación externa ocurre con la difusión del ión calcio desde una fuente que rodea al hidrocóide hacia la solución de alginato de pH neutro. La formación del gel se inicia en la interfase y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio, de manera que el ión sodio proveniente de la sal de alginato es desplazado por el catión divalente solubilizado en agua. Este interacciona con los G-bloques de diferentes moléculas poliméricas, enlazándolas entre sí. Aunque, la fuente de calcio más usada ha sido el CaCl_2 debido a su mayor porcentaje de calcio disponible, existen otras sales empleadas con menor frecuencia tales como el acetato monohidratado y el lactato de calcio (Helgerud *et al.*, 2010).

1.2.- Gelificación interna

El proceso de gelificación interna consiste en la liberación controlada del ión calcio desde una fuente interna de sal de calcio insoluble o parcialmente soluble dispersa en la solución de alginato de sodio. Donde la liberación del ión calcio puede ocurrir de dos formas, si se tiene una sal de calcio insoluble a pH neutro pero soluble a pH ácido, por lo que es necesario adicionar un ácido orgánico que al difundirse hasta la sal permita la acidificación del medio consiguiendo solubilizar los iones calcio. En este caso, las sales de calcio más empleadas son el carbonato de calcio y el fosfato tricálcico, y en casos específicos el fosfato dicálcico y el citrato tricálcico. Para la acidificación del medio se cuenta con ácidos orgánicos como el acético, adípico y el glucono delta-lactona. Si la sal de calcio es parcialmente soluble, el proceso de gelificación interna consiste en la adición a la mezcla alginato-sal de calcio, un agente secuestrante como el fosfato, sulfato o citrato de sodio. Al adicionar

un secuestrante este se enlaza con el calcio libre retardando así el proceso de gelificación, el sulfato de sodio ha sido comúnmente el más empleado debido a su bajo costo y conveniente solubilidad. Los mecanismos de gelificación iónica son descritos en la Fig. 3 (Helgerud *et al.*, 2010).

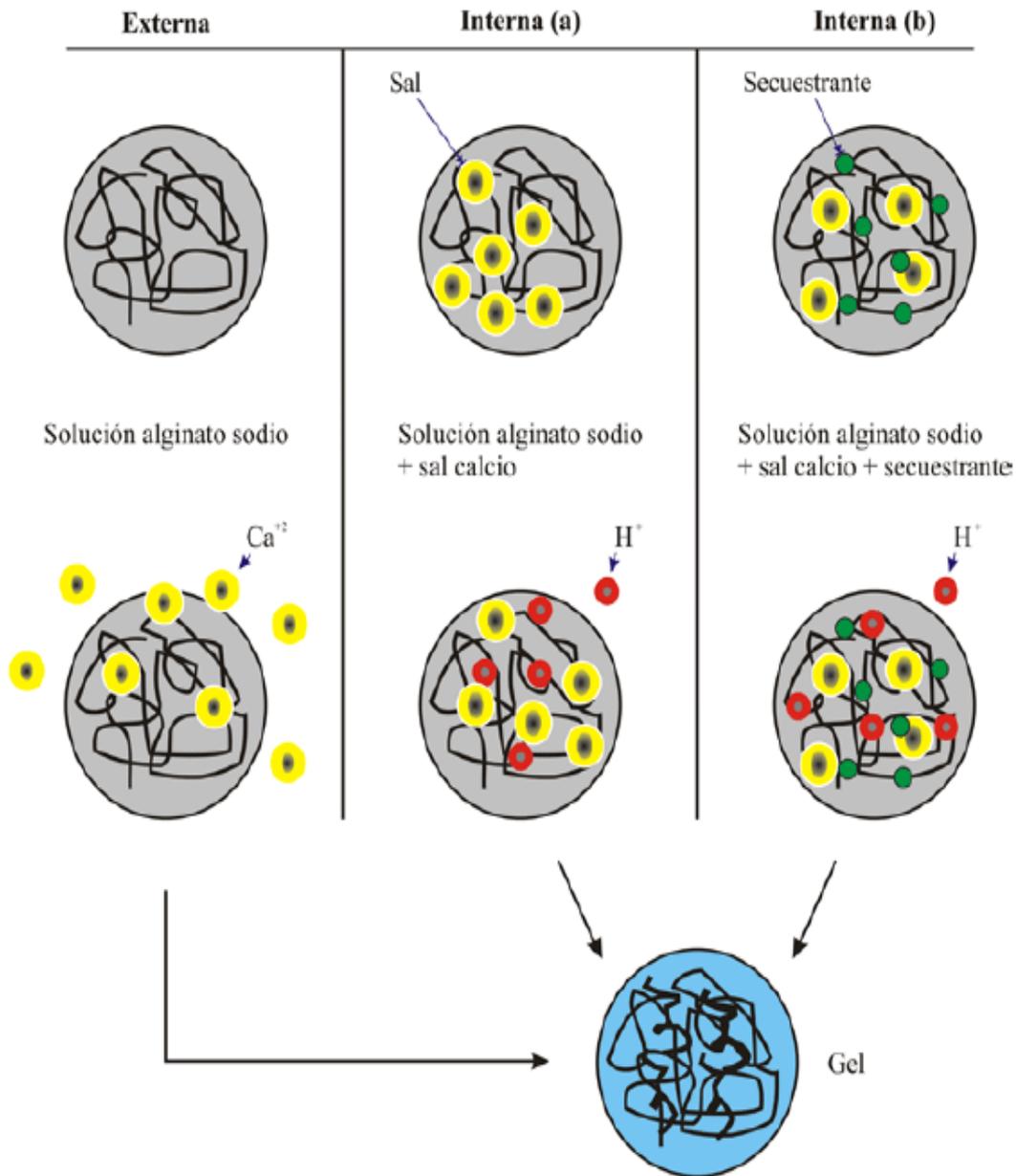
La principal diferencia entre el mecanismo de gelificación externa e interna es la cinética del proceso. Si lo que se pretende es el control de la transición sol-gel, en el proceso de gelificación externa los factores a manipular son la concentración de calcio y composición del polímero. Mientras que, para el proceso de gelificación interna se deben considerar la solubilidad y concentración de la sal de calcio, concentración del agente secuestrante y del ácido orgánico empleado (Draget, 2000).

2.- Técnicas de microencapsulación

La microencapsulación de pequeñas moléculas como enzimas hasta células y microorganismos puede realizarse por diferentes técnicas. La selección de la técnica de encapsulación adecuada se ve determinada por las propiedades físico-químicas del material soporte y la aplicación final deseada con el objeto de asegurar la biodisponibilidad de los compuestos, su funcionalidad e incluso su fácil incorporación en los alimentos sin la alteración de sus propiedades sensoriales (Pal *et al.*, 2009). Al emplear el alginato como matriz polimérica, las técnicas de microencapsulación en aplicaciones alimentarias se reducen a: extrusión, emulsión y secado por atomización.

2.1.- Encapsulación por extrusión

La técnica consiste en la formación de gotas de la solución de alginato que contiene el componente a encapsular al hacer pasar dicha solución por un dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de goteo controlado. Estas gotas caen sobre un baño que contiene la fuente del



(a) Sal insoluble. (b) Sal parcialmente soluble.

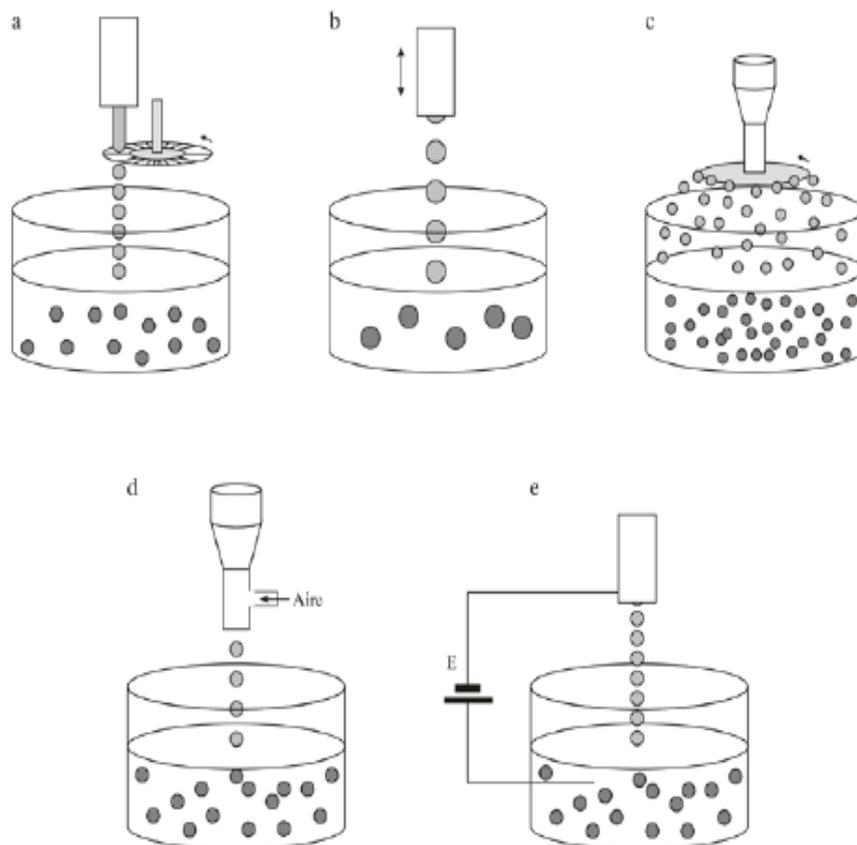
Figura 3.- Mecanismos de gelificación iónica.

ión divalente, quien induce la gelificación mediante el mecanismo de gelificación externa (Chan *et al.*, 2009). La principal limitación presentada por esta técnica ha sido el gran

tamaño de las microcápsulas, lo cual depende del diámetro de la boquilla del dispositivo extrusor. Entre otras desventajas, la dificultad de producción a gran escala debido a que la

formación de las microcápsulas se logra una una lo cual trae como consecuencia largos tiempos de gelificación (Mofidi *et al.*, 2000). Adicionalmente, es de considerar aspectos que influyen en su forma esférica y tamaño como la distancia de separación de la boquilla al baño, el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución que induce la gelificación (Chan *et al.*, 2009). A pesar de todos estos factores, la técnica de microencapsulación por extrusión ha sido empleada tradicionalmente al permitir la producción de microcápsulas con tamaños uniformes.

Recientes estudios, demuestran que la aplicación de esta técnica mejora notablemente al incorporar dispositivos extrusores como boquillas múltiples y discos aspersores (Champagne *et al.*, 2000), inyectores con impulsos vibratorios (Dohnal y Štěpánek, 2010) e incluso con flujo de aire incorporado (Mark *et al.*, 2009), todos diseñados bajo el mismo objetivo, la producción masiva de microcápsulas. Como ejemplo, en la Fig. 4 se muestran diferentes tipos de dispositivos extrusores para la preparación de microcápsulas (Zuidam y Shimoni, 2010).



a: Atomizador con corte sistemático del chorro. b: Boquilla vibratoria. c: Disco atomizador. d: Flujo de aire coaxial. e: Potencial electrostático.

Figura 4.- Tipos de dispositivos extrusores.

2.2.- Encapsulación en emulsión

La técnica de encapsulación en emulsión se ha definido como el proceso de dispersión de un líquido en otro líquido inmiscible donde la fase dispersa consta de la matriz que incluye el componente a encapsular. La adición de un tensioactivo mejora la formación y estabilidad de la emulsión, así como la distribución de tamaño de las gotas (Poncelet, 2001; de Vos *et al.*, 2010). En este sentido, la preparación de microcápsulas por emulsificación puede llevarse a cabo empleando el mecanismo de gelificación externa o interna. Para el primer caso, la gelificación externa en emulsión consta en la dispersión de una mezcla solución de alginato-compuesto en una fase continua no acuosa, seguido de la adición de una fuente de calcio

que al difundirse a la fase dispersa inicie la gelificación permitiendo la encapsulación, y a su vez, la desestabilización de la emulsión para la separación de las cápsulas formadas. Mientras que, la técnica en emulsión por gelificación interna se fundamenta en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble o parcialmente soluble en cuyo caso se adiciona un agente secuestrante, contenido en una solución de alginato-compuesto el cual es dispersado en una fase continua no acuosa generando una emulsión agua en aceite (W/O) (Gouin, 2004; Chan *et al.*, 2006). La liberación del ion calcio ocurre con la adición de un ácido orgánico soluble en la fase continua que al difundirse disminuye el pH del medio solubilizando la sal y produciendo la gelificación. Las técnicas de microencapsulación en emulsión se describen en la Fig. 5 (Champagne y Fustier, 2007).

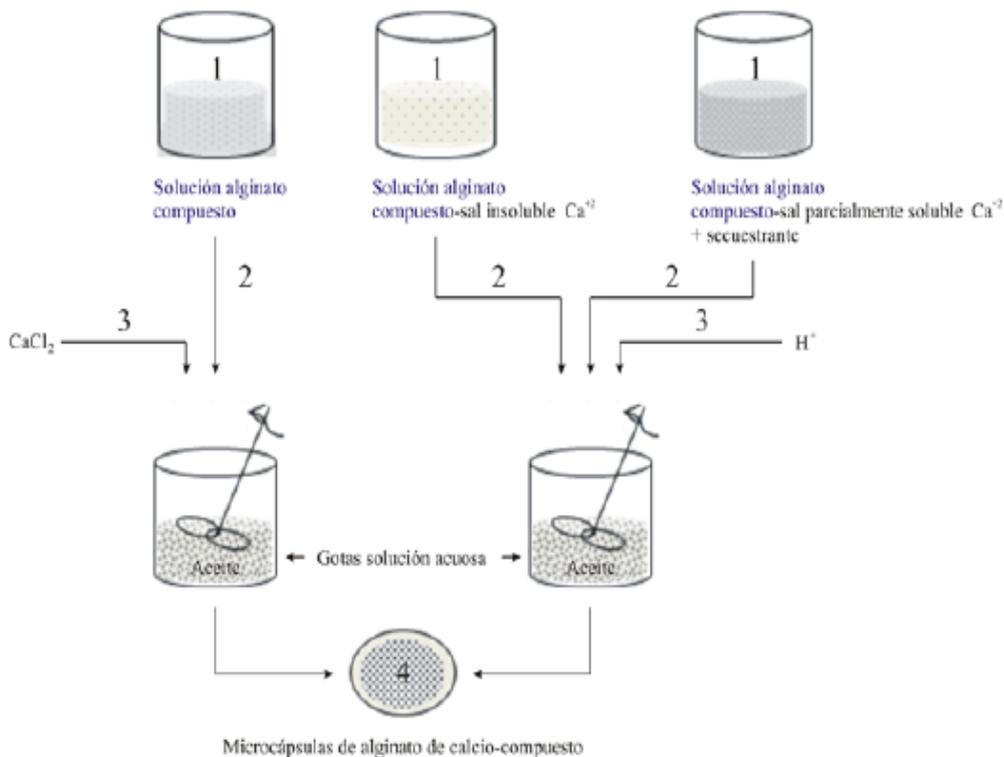


Figura 5.- Técnica de microencapsulación en emulsión.

En este orden de ideas, investigaciones recientes han determinado la posibilidad de combinar las técnicas de microencapsulación o modificar las propuestas, al incorporar dispositivos mecánicos más efectivos e incluso procesos físico-químicos adicionales que los optimicen. Como ejemplo, se aplicó la técnica por extrusión con la incorporación de un dispositivo atomizador para la solución de alginato, que permitió la formación de matrices cuyos núcleos estaban conformados a su vez por nanopartículas compuestas por el principio activo de interés pero preparadas en una matriz polimérica distinta a la membrana más externa. La propuesta de esta técnica demostró ser una alternativa para el control gradual en la liberación de fármacos, enzimas y componentes activos; así como para la preparación de sistemas multifuncionales (Joshi *et al.*, 2010). En este sentido, en un estudio previo se informa que con el desarrollo de nuevas técnicas para la producción de microesferas de tamaños uniformes y diámetro medio entre 18 y 22 μm , fue altamente viable combinar la técnica en emulsión y el mecanismo de gelificación externa a través del diseño de un módulo compuesto por microcanales de 8 μm de diámetro por los cuales se forzó el paso de la solución de alginato en una fase continua no acuosa. Para propiciar la formación de una emulsión W/O, el equipo fue acondicionado con láminas de vidrio y silicona tratadas previamente en soluciones que le confiriesen un carácter hidrofóbico. La investigación demostró que, el mejor diámetro medio de gota se obtuvo usando altas concentraciones de alginato y bajos caudales de la fase dispersa asegurando durante todo el proceso un flujo de caudal constante para la fase continua (Chuah *et al.*, 2009).

2.3.- Encapsulación mediante secado por atomización

El secado por atomización ha sido una

tecnología ampliamente usada por la industria debido a su reproducibilidad y economía. Su aplicación principal se ha usado para enmascarar sabores, aromas y la encapsulación de vitaminas. El procedimiento consiste en la preparación de una emulsión o suspensión que contenga al compuesto a encapsular y el material polimérico, el cual es pulverizado sobre un gas caliente que generalmente es aire promoviendo así la evaporación instantánea del agua, permitiendo que el principio activo presente quede atrapado dentro de una película de material encapsulante. Las micropartículas en polvo obtenidas son separadas del gas a bajas temperaturas. Una de las grandes ventajas de este proceso es, además de su simplicidad, que es apropiado para materiales sensibles a altas temperaturas debido a que los tiempos de exposición son muy cortos (5 a 30 s) (Martín-Villena *et al.*, 2009; de Vos *et al.*, 2010; López-Hernández, 2010).

A pesar, que la suspensión o emulsión a pulverizar con la técnica de secado por atomización se ha limitado a formulaciones acuosas, trabajos recientes han demostrado que la combinación de distintos biopolímeros de fuentes naturales como las gomas (carregenato, goma arábiga y alginato), proteínas (suero, caseinatos y gelatina), maltodextrinas, dextrosas, ceras y sus mezclas, crean nuevas matrices poliméricas altamente versátiles y que por tanto facilitan ser empleadas con otras formulaciones. La preparación de microcápsulas con esta técnica requiere primeramente, la selección del tipo de atomizador considerando la viscosidad de la solución, así como el tamaño de gota deseado a fin de generar la mayor superficie de contacto entre el aire caliente y el líquido, la forma de contacto entre las gotas y el aire caliente dependiendo de la sensibilidad al calor del producto, el tiempo de contacto gota-aire, la temperatura del aire y por último el tipo de método de separación de los sólidos secos (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Básicamente su

aplicación con alginato se resume en tres etapas: dispersión del principio activo en el alginato, atomización de la mezcla y deshidratación (Zuidam y Shimoni, 2010).

3.- Tratamientos especiales

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 micropartículas (Pal *et al.*, 2009). Diversas investigaciones mostraron mejoras en las propiedades físico-químicas del alginato al preparar matrices mixtas con quitosano y polilisina aplicando diferentes técnicas de encapsulación (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2007; 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 (Wang y He, 2002; Guérin *et al.*, 2003; Madziva *et al.*, 2006). Incluso formulaciones de matrices con alginato y alcohol polivinílico para la encapsulación de aromas (Levi *et al.*, 2001).

4.- Aplicaciones

4.1.- Microorganismos probióticos

Las bacterias probióticas han sido adicionadas a una gama de productos alimentarios como yogurt, bebidas lácteas, quesos, cremas, helados y postres lácteos. A pesar de las ventajas que implica su ingesta, el mayor problema se ha presentado en la viabilidad de supervivencia de los microorganismos al procesamiento y almace-

je de los alimentos e incluso en procesos posteriores a su consumo como las agresivas condiciones gastrointestinales.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han definido los probióticos como microorganismos vivos (bacterias o levaduras) que al ser ingeridos o con aplicaciones localizadas en una cantidad suficiente confieren uno o más beneficios previamente demostrados para la salud del huésped (FAO/WHO, 2001). Las bacterias probióticas más empleadas por la industria pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. bulgaricus*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus* y *L. plantarum*), *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum* y *B. thermophilum*) y cocos Gram positivos (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*) (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

La microencapsulación ha permitido inmovilizar bacterias probióticas en una matriz de alginato debido a la simplicidad del proceso de preparación de las microcápsulas, su biocompatibilidad y alta retención de microorganismos como consecuencia del tamaño de poro mostrado por la matriz estimado en 17 nm, mientras que el tamaño promedio de las bacterias oscila entre 1-3 μm . Por estas razones, la microencapsulación de probióticos ha sido investigada con la finalidad de proteger y mejorar la biodisponibilidad de los microorganismos tanto en los productos alimentarios como en el tracto intestinal (Krasaekoopt *et al.*, 2003; 2004). Por otra parte, se han encontrado trabajos donde el objetivo ha sido producir mayor cantidad de biomasa para mejorar el proceso de fermentación, así como la obtención de metabolitos secundarios de interés industrial, tal como la vitamina B12 (Gardner y Champagne, 2005).

La técnica por extrusión ha sido la más antigua y empleada para la microencapsulación

de bacterias probióticas en hidrocoloides. Diferentes estudios obtuvieron diámetros de cápsulas superiores a 2 mm al inmovilizar diversas bacterias ácido lácticas. Los resultados mostraron una influencia importante de la viscosidad de la solución de alginato, la distancia desde el dispositivo extrusor al baño de calcio y del diámetro del orificio sobre el tamaño y esfericidad de las cápsulas. Por el contrario, al aplicar la técnica en emulsión se lograron producir micropartículas con tamaños entre 25 μm y 2 mm; mostrando ser las variables de influencia significativa sobre la distribución de tamaño la velocidad de agitación y el tipo de emulsionante (Krasaekoop *et al.*, 2003). En un estudio posterior sobre microencapsulación con *B. longum* por extrusión, mostró mayor cantidad de bacterias existentes en un ambiente gástrico simulado frente a las células libres. Este índice de resistencia se incrementó con la concentración de alginato y el tamaño de las cápsulas. Por otra parte, las microcápsulas con *Lactobacillus* preparadas en emulsión presentaron tamaños inferiores a 100 μm y poca supervivencia de las células frente a fluidos gástricos, aun así, al ser agregadas en productos refrigerados como yogurt y crema agraria mostraron estabilidad durante el almacenamiento (Chandramouli *et al.*, 2004).

No obstante al éxito alcanzado por diferentes investigaciones, se han encontrado variados estudios que han empleado tratamientos especiales para elevar la eficiencia de encapsulación. Entre ellos, el uso de sistemas combinados de alginato-almidón aplicando la técnica por extrusión y la incorporación de bacterias del grupo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, resultando en un aumento importante de supervivencia para los *Lactobacillus* en ambientes ácidos pero no significativa para los *Bifidobacterium* (Jayalalitha *et al.*, 2012). Asimismo, en un trabajo anterior lograron incrementar la producción de bacterias ácido lácticas (*L. acidophilus*) con la misma técnica y combina-

ción de biopolímeros para la formación de la matriz. Lo que representó para el momento, una alternativa para la preparación de concentrados de bacterias, evitando así la etapa de centrifugación o filtración durante el proceso productivo de fermentación láctica a escala industrial (Dembczyński y Jankowski, 2000). En este sentido, en otro trabajo se refleja que produjeron microcápsulas usando un sistema alginato-péptido con prebióticos como matriz. Los resultados mostraron gran cantidad de bacterias inmovilizadas, biodisponibles aún luego de ser adicionadas en leches con una semana de almacenamiento y altamente resistentes a condiciones gástricas simuladas (Chen *et al.*, 2006). Igualmente, investigaciones recientes infieren el éxito de aplicar tratamientos especiales al efecto de las altas cargas de microorganismos encapsulados. Tal como, la microencapsulación de *Lactobacillus* spp. aislado del ensilaje de maíz y *L. plantarum* utilizado como sistema control en una matriz alginato-xantana para la obtención de microcápsulas por extrusión y posterior recubrimiento con quitosano. Los resultados demostraron alta tolerancia de los microorganismos a las sales biliares, así como una cantidad significativa de bacterias retenidas y un elevado índice de supervivencia durante el almacenamiento a temperaturas entre 4 y 25 °C por tiempos de 1 semana y 1 mes frente a las células libres (Kasra-Kermanshahi *et al.*, 2010). En el mismo sentido, también se obtuvieron buenos resultados en la producción de etanol a partir de la fermentación de melazas de caña con la microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae* en una matriz de alginato y tejido del tallo de la planta de maíz, al evidenciarse un incremento importante en la formación del metabolito primario y una disminución considerablemente de los secundarios (Razmovski y Vučurović, 2011). En este mismo orden de ideas, se muestran en el Cuadro 1, más aplicaciones de microencapsulación con bacterias probióticas empleado las técnicas por extrusión y en emulsión para la elaboración de alimentos funcionales (Burgain *et al.*, 2011).

Cuadro 1.- Aplicaciones de microencapsulación con probióticos.

Bacterias	Técnica	Matriz	Aplicación	Referencias
<i>L. acidophilus</i> , <i>B. lactis</i>	Em	Alginato	Leche; queso feta	1
<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	Ex y Em	Alginato	Quesos kasar y blanco	2
<i>L. plantarum</i>	Em	Alginato/pectina/quitosano	Yogurt	3
<i>L. acidophilus</i> , <i>B. lactis</i>	Ex	Alginato	Leche fermentada	4
<i>L. casei</i> , <i>B. lactis</i>		Alginato	Helados	5
<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i>	Em	Alginato	Postres congelados	6
<i>Lactobacillus</i> , <i>L. acidophilus</i>		Alginato/almidón	Yogurt	7
<i>L. acidophilus</i>	Ex	Alginato/xantana	Zumos vegetales	8
<i>L. reuteri</i>	Ex y Em	Alginato	Salchichas	9

Em: emulsion. Ex: extrusión. 1: (Talwalkar y Kailasaphaty, 2003; Kailasaphaty y Masondole, 2005). 2: (Özer *et al.*, 2008; Özer *et al.*, 2009). 3: (Brinques y Záchia-Ayub, 2011). 4: (Khosrokhavar y Mortazaviam, 2010). 5: (Homayouni *et al.*, 2008). 6: (Shah y Ravula, 2000). 7: (Iyer, C. and Kailasaphaty, 2005). 8: (King *et al.*, 2007; Nazzaro *et al.*, 2009). 9: (Muthukumarasamy y Holley, 2006).

En otro estudio aplicaron la técnica de secado por atomización para microencapsular microorganismos como el *L. brevis* usado ampliamente por la industria de los quesos. El proceso se llevó a cabo con la preparación de una suspensión de alginato-maltodextrina y las bacterias probióticas bajo continua agitación en

una solución de Ringer (solución con NaCl, K, Ca y Mg) para así evitar la formación de grumos. La suspensión homogenizada fue atomizada empleando una boquilla con ultrasonido para conseguir micropartículas finas a 130 °C. Los resultados mostraron tamaños medios entre 80 y 110 µm y una gran existencia

de bacterias encapsuladas frente a las células libres (Both *et al.*, 2012).

La mayoría de los trabajos realizados con la finalidad de proporcionar una protección microbiana, presentaron mejoras significativas al emplear sistemas mixtos de alginato con polilisina, hidroxipropil celulosa, pectina, proteína del suero y quitosano (Cui *et al.*, 2000; Guérin *et al.*, 2003; Chávarri *et al.*, 2010; Sohail *et al.*, 2011) frente a la matriz pura. Incluso al incorporar tratamientos especiales posteriores como el recubrimiento de las microcápsulas con otros biopolímeros (Kasra-Kermanshahi *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2011).

4.2.- Compuestos activos no microbianos

La protección de los compuestos activos con la técnica de microencapsulación ha sido importante para evitar la degradación química causada por factores como la oxidación e hidrólisis con la finalidad de mantener sus propiedades funcionales. En este sentido, si se considera que entre las propiedades sensoriales, el sabor y el aroma son las más importantes, se tiene que la tecnología de encapsulación ha sido empleada por la industria alimentaria para enmascarar sabores amargos o astringentes de componentes específicos o para su protección, ya que al degradarse debido a diversos factores, estos cambian su sabor u olor original. A saber, trabajos hacen referencia a la encapsulación de ácidos grasos como el omega-3 y omega-6 aplicados tradicionalmente para el enriquecimiento de productos alimenticios, los cuales son altamente oxidables y de sabor desagradable (Champagne y Fustier, 2007; Sanguansri y Augustin, 2010). También se tienen compañías como Denomega Nutritional Oils (Denomega Pure Health, Sarpsborg, Noruega) y GAT Food Essentials (Ebenfurth, Austria) que han encapsulado aceite de pescado en microesferas de alginato con tamaños entre 1 y 30 μm usando la técnica en emulsión y un

recubrimiento de goma xantana. Para la formación de las microesferas, primeramente se preparó una emulsión W/O con la sal de calcio en la fase acuosa, seguido de la adición bajo constante agitación de una solución de alginato de sodio hasta lograr una inversión de fases que a su vez facilita la deposición de las microesferas de alginato de calcio. Finalmente, la superficie de las microesferas es recubierta de goma xantana y un tensioactivo que minimiza el tamaño de las gotas de agua residual encontradas en el aceite hasta alcanzar la completa gelificación empleando altas temperaturas (Beindorff y Zuidam, 2010).

La vitamina E (α -tocoferol) ha sido un antioxidante usado frecuentemente por la industria farmacéutica y de gran interés para los procesos alimentarios pero de aplicación limitada debido a su carácter lipofílico, alta sensibilidad al calor y a la luz. Bajo estas consideraciones, se han propuesto otras técnicas para preparar microcápsulas con compuestos oleosos tal como aceites esenciales en alginato usando la técnica por extrusión y un dispositivo especial con doble boquilla para extruir la solución. En donde, el componente oleoso es canalizado a través de un tubo concéntrico en otro tubo donde fluye la solución de alginato y cuyas gotas extruidas caen sobre un baño de cloruro de calcio (Helgerud *et al.*, 2010). Al respecto, un trabajo previo refiere que microcápsulas con vitamina E han sido preparadas empleando la técnica en emulsión mediante la formación de una emulsión aceite en agua (O/W), donde la vitamina es solubilizada en la fase oleosa seguido de una dispersión en la fase acuosa constituida por la solución de alginato y un tensioactivo. Finalmente, la emulsión es extruida por atomización con aire comprimido sobre una solución de calcio para conseguir la gelificación de las gotas (Yoo *et al.*, 2006). Mientras que, en otra investigación prepararon microcápsulas con α -tocoferol en sistemas mixtos de β -lactoglobulina y albúmina como matriz en un

recubrimiento con alginato empleando la técnica por extrusión y solución de $ZnCl_2$ como agente gelificante. El estudio demostró la viabilidad del sistema mixto propuesto como matriz para la encapsulación de la vitamina, resaltando una marcada influencia de la concentración de proteína y del recubrimiento con alginato aplicado a las microcápsulas sobre la eficiencia de encapsulación y el control en los tiempos de liberación (Somchue *et al.*, 2009). Por otra parte, también se demostró la posibilidad de microencapsular vitamina A (retinol) con acetato, el proceso de obtención de las microcápsulas se fundamentó en estudios previos donde se evaluó la influencia en la estabilidad de emulsiones preparadas por ultrasonido de aceite con retinol en solución de alginato a diferentes concentraciones del polímero y para distintos ratios O/W. La emulsión más estable obtenida fue adicionada gota a gota sobre un baño de $CaCl_2$ donde se dejaron gelificar durante 25 a 30 min. Los resultados mostraron pérdidas menores del principio activo frente a una muestra control del mismo sistema sin encapsular, al evaluar la influencia de diferentes factores destructivos como iones metálicos pesados, luz UV, la exposición al oxígeno y al calor, con intervalos de temperatura entre 55 y 60 °C (Kislitz *et al.*, 2009).

En la última década, las investigaciones han mostrado un interés creciente por la encapsulación de extractos naturales con alto contenido en polifenoles provenientes de plantas medicinales, hierbas, flores y semillas. Dicho manifiesto ha surgido con la finalidad de alcanzar nuevas propuestas nutricionales que permitan el uso de antioxidantes como aditivos alimentarios sin cambiar el sabor, aroma y color de los productos originales. Así como, el aprovechamiento de sus beneficios protectores ante los efectos de los radicales libres y las enfermedades degenerativas. En sus aplicaciones destaca su gran carácter hidrofílico y por tanto rápida liberación en medios acu-

osos. En consecuencia, diversos trabajos señalan que tal efecto puede ser contrarrestado con la aplicación de tratamientos especiales para su microencapsulación. Así, la hierba mate (*Ilex paraguariensis*) fue microencapsulada en alginato, recubierta en quitosano y con posterior deshidratación de las microcápsulas utilizando diferentes métodos de secado. Demostrando que la matriz alginato-quitosano retarda los tiempos de liberación del compuesto respecto a las microcápsulas sin recubrir (Deladino *et al.*, 2008).

Otro ejemplo de aplicaciones en matrices mixtas, es la encapsulación del aroma de limoneno ampliamente usado por la industria de bebidas refrescantes en un sistema alginato-alcohol polivinílico. Considerando su gran sensibilidad al calor, se evaluó las pérdidas del olor a altas temperaturas y compararon con las correspondientes al limoneno libre, los resultados señalaron una alta resistencia frente a temperaturas por encima de las presentadas como críticas para el limoneno sin encapsular. Las microcápsulas fueron preparadas realizando un tratamiento térmico previo al alcohol polivinílico para asegurar la formación del crio-gel. Luego, se mezclaron el crio-gel, alginato y aroma, con la extrusión final de la suspensión sobre un baño de calcio. Se observó una fuerte dependencia entre las propiedades térmicas del aroma y la matriz mixta, produciéndose un gel estable para una concentración óptima del 20 % en alcohol polivinílico en la mezcla polimérica (Levi *et al.*, 2001).

Las enzimas, como catalizadores, siempre han sido una atractiva elección en vista de sus altos rendimientos y pocas exigencias de esfuerzos dentro de un proceso catalítico. Por estas razones, la inmovilización de enzimas ha propuesto ser una alternativa para el diseño de biocatalizadores. Asimismo, la microencapsulación de enzimas facilita su manipulación, recuperación y mayor estabilidad. Al respecto, el estudio sobre la hidrólisis del almidón a partir de la microencap-

sulación de las enzimas glucoamilasa y pululanasa en alginato mostró mayor estabilidad térmica y al pH respecto a las moléculas libres. El proceso de preparación de las microencápsulas se logró empleando la técnica por extrusión en forma individual de las enzimas, las cuales fueron mezcladas en relación 3:2 y colocadas sobre un sustrato en reactores de lecho fluidizado para iniciar sus funciones catalizadoras (Roy y Gupta, 2004). En este sentido, en un estudio posterior, prepararon cápsulas con el producto enzimático comercial Flavourzyme® (Novozymes® A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) empleado en el proceso de maduración de quesos, en matrices poliméricas de alginato, alginato-almidón y alginato-pectina aplicando la técnica por extrusión sobre una solución de calcio con y sin quitosano. Los resultados demostraron baja eficacia de encapsulación para todas las matrices estudiadas, sin embargo al adicionar quitosano al baño de calcio se evidenció un aumento significativo en la retención de las enzimas, por tanto este actuó como recubrimiento en las microcápsulas. Además, al ser evaluado su adición en productos alimenticios se observó un mayor control en la liberación, al permitir la cuantificación de células liberadas durante el desarrollo proteolítico del proceso de maduración de quesos (Anjani *et al.*, 2007).

La técnica de secado por atomización con alginato propone una alternativa para la formación de microcápsulas de tamaño uniforme y reproducible (Burey *et al.*, 2009). En este sentido, se prepararon microesferas de alginato empleando una matriz de alginato y almidón modificado para la encapsulación de aceite de pescado a fin de preservar los componentes de interés. El estudio mostró la habilidad de la matriz como tratamiento de protección ante la oxidación de los ácidos grasos presentes, al someter las microesferas a diferentes periodos de almacenamiento a 40 °C y 70 % de humedad relativa. Asimismo, se

consideraron distintas formulaciones para la elaboración de la matriz mediante la combinación de alginatos con altos y bajos contenidos en G e incluso varios intervalos de concentraciones. Los resultados mostraron la viabilidad del sistema mixto para la preservación de los principios activos frente a la muestra control, así como la obtención de microesferas con alto contenido de aceite de pescado (Tan *et al.*, 2009). Aunque la técnica ha sido la más empleada para encapsular aceites marinos, presenta la desventaja de la oxidación parcial de las grasas al ser expuestas a altas temperaturas durante su procesamiento, y periodos cortos de almacenamiento cuando la superficie de las micropartículas se presenta muy porosa (Beindorff y Zuidam, 2010).

Se ha logrado microencapsular péptidos y proteínas provenientes de la albúmina del suero en matrices de alginato-glicol-quitosano altamente resistentes a las condiciones gastrointestinales. La incorporación de estas microcápsulas en alimentos promete ser un suplemento proteico de usos nutricionales específicos (Erdinc y Neufeld, 2011).

CONCLUSIONES

Las técnicas de microencapsulación con alginato permiten la protección de diferentes principios activos como proteínas, aminoácidos, vitaminas, extractos, sabores, aromas, microorganismos y enzimas que en contacto con el medio circundante sufren degradación y pérdida de sus propiedades nutricionales y benéficas para la salud. El alginato es un material polimérico adecuado para la microencapsulación por ser biocompatible, no tóxico y degradable. Diversas investigaciones demostraron que los compuestos encapsulados se encuentran biodisponibles y por tanto pueden mantener sus actividades funcionales durante el procesamiento y almacenaje de los alimentos. Aspectos que pueden reforzarse con la incorporación de matrices mixtas de alginato y

xantana, polilisina, almidón, pectina, glucomanano konjac, alcohol polivinílico, proteína del suero, quitosano, maltodextrina, entre otros, al mostrar mejoras en las propiedades físico-químicas del sistema, incrementos en la eficiencia de encapsulación y mayores tiempos en la liberación del principio activo. La selección de la técnica de encapsulación por extrusión, en emulsión o secado por atomización con alginato o sistemas mixtos que lo contengan depende fundamentalmente de las propiedades del componente a encapsular, el tamaño deseado de las microcápsulas, la composición del alginato y la concentración de calcio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anal, Anil Kumar and Singh, Harjinder. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 18:240-251.
- Anjani, K.; Kailasaphaty, K. and Phillips, M. 2007. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. *International Dairy Journal*. 17(1):79-86.
- Beindorff, Christiaan and Zuidam, Nicolaas Jan. 2010. Microencapsulation of fish oil. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. (pp. 161-185). New York, NY, USA: Springer Science+Business Media, LLC.
- Borgogna, M.; Bellich, B.; Zorzin, L.; Lapasin, R. and Cesàro, A. 2010. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*. 122(2):416-423.
- Both, Emese; Gyenge, László; Bodor, Zsolt; György, Éva.; Lángy, Szabolcs and Ábrahám, Beáta. 2012. Intensification of probiotic microorganisms viability by microencapsulation using ultrasonic atomizer. *University Politehnica of Bucharest Scientific Bulletin. Series B*. 74(1):27-32.
- Brinques, Graciela Bruschi and Záchia-Ayub, Marco Antônio. 2011. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*. 103(2):123-128.
- Burey, Paulomi; Bhandari, Bhash R.; Howes, Tony and Gidley, Michael J. 2009. Gel particles from spray-dried disordered polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 76(2):206-213.
- Burgain, J.; Gaiani, C.; Linder, M. and Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104(4):467-483.
- Champagne, C.P.; Blahuta, N.; Brion, F. and Gagnon, C. 2000. A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*. 68(6):681-688.
- Champagne, Claude P. and Fustier, Patrick. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(2):184-190.
- Chan, Eng Seng; Lee, Boon Beng; Ravindra, Pogaku and Poncelet, Denis. 2009. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 338(1):63-72.
- Chan, Lai Wah; Lee, Huey Ying and Heng, Paul W.S. 2006. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*. 63(2):176-187.

- Chandramouli, V.; Kailasapathy, K.; Peiris, P. and Jones, M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*. 56(1):27-35.
- Chávarri, María; Marañón, Izaskun; Ares, Raquel; Ibáñez, Francisco C.; Marzo, Florencio and Villarán, María del Carmen. 2010. 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.
- Chen, Kun Nan; Chen, Ming Ju and Lin, Chin Wen. 2006. Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). *Journal of Food Engineering*. 76(3):313-320.
- Chen, Lingyun and Subirade, Muriel. 2006. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*. 27(26):4646-4654.
- Chuah, Ai Mey; Kuroiwa, Takashi; Kobayashi, Isao; Zhang, Xain and Nakajima, Mitsutoshi. 2009. Preparation of uniformly sized alginate microspheres using the novel combined methods of microchannel emulsification and external gelation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 351(1-3):9-17.
- Corell, P.; García-Segovia, Purificación; Sapiña, F.; Farré, I.; Castells, P. y Martínez-Monzó, J. 2007. Efecto del ión calcio sobre las propiedades texturales de esferas de alginato aplicadas a cocina. *Alimentaria*. 388:79-83.
- Cui, Jing Hao; Goh, Juhn Su; Kim, Pyung Hyun; Choi, Suk Ho and Lee Beom Jin. 2000. Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 210(1-2):51-59.
- de Vos, Paul; Faas, Marijke M.; Spasojevic, Milica and Sikkema, Jan. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 20(4):292-302.
- Deladino, Lorena; Anbinder, Pablo S.; Navarro, Alba S. and Martino, Miriam N. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*. 71(1):126-134.
- Dembczyński, R. and Jankowski, T. 2000. Growth of lactic acid bacteria in alginate/starch capsules. In *Food Biotechnology. Progress in Biotechnology*. Vol. 17. (pp. 291-294). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B. V.
- Desai, Kashappa Goud H. and Park, Hyun Jin. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*. 23(7):1361-1394.
- Dohnal, Jiří and Štěpánek, František. 2010. Inkjet fabrication and characterization of calcium alginate microcapsules. *Powder Technology*. 200(3):254-259.
- Draget, K.I. 2000. Alginates. In *Handbook of hydrocolloids*. (pp. 379-395). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited - Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC.
- Draget, Kurt Ingar; Skjåk-Bræk, Gudmund and Smidsrød, Olav. 1997. Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*. 21(1-2):47-55.
- Erdinc, B. and Neufeld, R.J. 2011. Protein micro and nanoencapsulation within glycol-chitosan/Ca²⁺/alginate matrix by spray drying. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 37(6):619-627.
- Fang, Zhongxiang and Bhandari, Bhesh. 2010. Encapsulation of polyphenols - a review.

- Trends in Food Science & Technology. 21(10):510-523.
- FAO/WHO. 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on evaluation of health and Nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 1-4 October. Córdoba, Argentina.
- Funami, Takahiro; Fang, Yapeng; Noda, Sakie; Ishihara, Sayaca; Nakauma, Makoto; Draget Kurt I. Nishinari, Katsuyoshi and Phillips, Glyn O. 2009. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*. 23(7):1746-1756.
- Gardner, N. and Champagne, C.P. 2005. Production of *Propionibacterium shermanii* biomass and vitamin B12 on spent media. *Journal of Applied Microbiology*. 99(5):1236-1245.
- Gharsallaoui, Adem; Roudaut, Gâelle; Chambin, Odile; Voilley, Andrée and Saurel, Rémi. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International*. 40(9):1107-1121.
- Gibbs, Bernard F.; Kermasha, Selim; Alli, Intez and Mulligan, Catherine N. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 50(3):213-224.
- Gouin, Sébastien. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*. 15(7-8):330-347.
- Guérin, D.; Vuilleumard, J.C. and Subirade, M. 2003. Protection of bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. *Journal of Food Protection*. 66(11):2076-2084.
- Helgerud, Trond; Gåserød, Olav; Fjæreide, Therese; Andersen, Peder O. and Larsen, Christian K. 2010. Alginates. In *Food stabilizers, thickeners and gelling agents*. (pp. 50-72). United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Homayouni, A.; Azizi, A.; Ehsani, M.R.; Yarmand, M.S. and Razavi, S.H. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*. 111(1):50-55.
- Imeson, A. 2010. *Food stabilizers, thickeners and gelling agents*. United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Iyer, C. and Kailasaphaty, K. 2005. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under *in vitro* acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of Food Science*. 70(1):M18-M23.
- Jayalalitha, V.; Balasundaram, B. and Palanidorai, R. 2012. *In vitro* assessment of microencapsulated probiotics beads. *International Journal of Agriculture: Research and Review*. 2(1):1-6.
- Joshi, Abhijeet; Keerthiprasad, R.; Jayant, Rajul Dev and Srivastava, Rohit. 2010. Nano-in-micro alginate based hybrid particles. *Carbohydrate Polymers*. 81(4):790-798.
- Kalasaphaty, K. and Masondole L. 2005. Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*. 60(3):252-258.
- Kasra-Kermanshahi, R.; Fooladi, J. and Peymanfar, S. 2010. Isolation and microencapsulation of *Lactobacillus* spp. from corn silage for probiotic application. *Iranian Journal of Microbiology*. 2(2):98-102.

- Khosrokhavar, R. and Mortazavian, A.M. 2010. Effects probiotic - containing microcapsules on viscosity, phase separation and sensory attributes of drink based on fermented milk. *Milchwissenschaft - Milk Science International*. 65(2):177-179.
- King, V. An-Erl; Huang, Hui Ying and Tsen, Jen Horng. 2007. Fermentation of tomato juice by cell immobilized *Lactobacillus Acidophilus*. *Mid-Taiwan Journal of Medicine*. 12(1):1-7.
- Kislitz, O.; Manaenkov, O. and Savin, A. 2009. Microencapsulation of retinol-acetate in alginate microspheres. In XVIIIth International Conference on Bioencapsulation. September 24-26. (pp. 1-4). Groningen, Netherlands.
- Krasaekoopt, Wunwisa; Bhandari, Bhesh and Deeth, Hilton. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13(1):3-13.
- Krasaekoopt, Wunwisa; Bhandari, Bhesh and Deeth, Hilton. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 14(8):737-743.
- Levi, Steva; Rac, Vladilav; Manojlovi, Verica; Raki, Vesna; Bugarski, Branko; Flock, Teresa; Krcyczmonik, Katarzyna Ewa and Nedovi, Viktor. 2001. Limonene encapsulation in alginate/poly (vinyl alcohol). *Procedia Food Science*. 1:1816-1820.
- López-Hernández, Orestes Darío. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*. 44(3):381-389.
- Lopretti, M.; Barreiro, F.; Fernandes, I.; Damboriarena, A.; Ottati C. y Olivera A. 2007. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. INNOTECH (Publicación anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay). 2:19-23.
- Madziva, H.; Kailasapathy, K. and Phillips, M. 2006. 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.
- Mancini, Marco; Moresi, Mauro and Rancini, Roberto. 1999. Mechanical properties of alginate gels: empirical characterisation. *Journal of Food Engineering*. 39(4):369-378.
- Mark, Daniel; Haerberle, Stefan; Zengerle, Roland; Ducree, Jens and Vladisavljević, Goran T. 2009. Manufacture of chitosan microbeads using centrifugally driven flow of gel-forming solutions through a polymeric micronozzel. *Journal of Colloid and Interface Science*. 336(2):634-641.
- Martin-Villena, M.J.; Morales-Hernández, M.E.; Gallardo-Lara, V. y Ruíz-Martínez, M.S. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*. 50(1):43-50.
- Mofidi, N.; Aghai-Moghadam, M. and Sarbolouki, M.N. 2000. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry*. 35(9):885-888.
- Muthukumarasamy, Parthiban and Holley, Richard A. 2006. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*. 111(2):164-169.
- Nazzaro, Filomena; Fratianni, Florinda; Coppola, Raffaele; Sada, Alfonso and Orlando, Pierangelo. 2009. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal

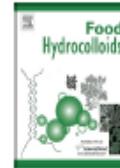
- conditions. *Journal of Functional Foods*. 1(3):319-323.
- Özer, Barbaros; Kirmaci, Hüseyin Avni; Şenel, Ebru; Atamer, Metin and Hayaloğlu, Adnan. 2009. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*. 19(1):22-29.
- Özer, Barbaros; Uzun, Yakup Salih and Kirmaci, Hüseyin Avni. 2008. Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during kasar cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 61(3):237-244.
- Pal, Kunal; Paulson, Allan T. and Rousseau, Dérick. 2009. Biopolymers in controlled-release delivery systems. In *Modern biopolymer science. Bridging the divide between fundamental treatise and industrial application*. (pp. 519-557). London-Burlington-San Diego: Academic Press.
- Parra-Huertas, Ricardo Adolfo. 2010. Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*. 63(2):5669-5684.
- Poncelet, D. 2001. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. In *Bioartificial organs III: tissue sourcing immunoisolation and clinical trials*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 944:74-82.
- Razmovski, R. and Vučurović, V. 2011. Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix. *Enzyme and Microbial Technology*. 48(4-5):378-385.
- Reddy-K, Ravindra and Reddy-P., Sabitha. 2010. Effect of different co-polymers on sodium alginate microcapsules containing isoniazid. *International Journal of PharmTech Research*. 2(4):2198-2203.
- Roy, Ipsita and Gupta, Munishwar Nath. 2004. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. *Enzyme and Microbial Technology*. 34(1):26-32.
- Saez, Vivian; Hernández, José Ramón y Peniche, Carlos. 2007. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotecnología Aplicada*. 24(2):98-107.
- Sanguansri, Luz and Augustin, Mary Ann. 2010. Microencapsulation in functional food product development. In *Functional food product development*. (pp. 1-23). United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Shah, N.P. and Ravula, R.R. 2000. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*. 55(3):139-144.
- Soares, J.P.; Santos, J.E.; Chierice, G.O. and Cavalheiro, E.T.G. 2004. Thermal behavior of alginate acid and its sodium salt. *Eclética Química*. 29(2):57-63.
- Sohail, Asma; Turner, Mark S.; Coombes, Allan; Bostrom, Thor and Bhandari, Bhesh. 2011. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology*. 145(1):162-168.
- Somchue, W.; Sermsri, W.; Shiowatana, J. and Siripinyanond, A. 2009. Encapsulation of α -tocopherol in protein-based delivery particles. *Food Research International*. 42(8):909-914.
- Talwalkar, A. and Kailasaphaty, K. 2003. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*. 58(1):36-39.
- Tan, Lai Hui; Chan, Lai Wah and Heng, Paul Wang Sia. 2009. Alginate/starch

- composites as wall material to achieve microencapsulation with high oil loading. *Journal of Microencapsulation*. 26(3):263-271.
- Wang, Kang and He, Zhmin. 2002. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. *International Journal of Pharmaceutics*. 244(1-2):117-126.
- Yoo, Sang Ho; Song, Young Bin; Chang, Pahn Shick and Lee, Hyeon Gyu. 2006. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 38(1):25-30.
- Zou, Qiang; Zhao, Jianxin; Liu, Xiaoming; Tian, Fengwei; Zhang, He ping; Zhang, Hao and Chen, Wei. 2011. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *International Journal of Food Science & Technology*. 46(8):1672-1678.
- Zuidam, Nicolaas Jan and Shimoni, Eyal. 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. (pp. 3-29). New York, NY, USA: Springer Science+Business Media, LLC.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd

Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols



Bryshila Lupo^{a,b,*}, Alicia Maestro^a, Montserrat Porras^a, José M. Gutiérrez^a, Carmen González^a

^a Group of Colloidal Systems Engineering, Department of Chemical Engineering, University of Barcelona, C/Martí i Franquès 1-11, 08028, Barcelona, Spain
^b Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Program of Agro-industrial Engineering, Faculty of Agronomy, Núcleo Obedisco, Av/Florencia Jiménez, Barquisimeto, Venezuela

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 June 2013

Accepted 6 November 2013

Keywords:

W/o emulsion

Stability

Alginate microspheres

Internal gelation

Encapsulation

Cocoa polyphenols

ABSTRACT

Encapsulation of cocoa extract was performed by emulsification/internal gelation in alginate microspheres. A suitable gelling was determined with a minimum of 1.8×10^{-4} mol of Ca^{2+} /g alginate. The pH influence in alginate gels showed similar viscoelastic properties in the range of pH 3.5–10. Citrate and carbonate salts were used as calcium sources, obtaining smaller spheres with citrate source. Moreover, SEM of microbeads made with citrate show uniform surface while the carbonate ones seem rough. Emulsions were formulated with several concentrations of Span 80, Span 85, Span 80-Tween 80 and polyglycerol polyricinoleate (PGPR). The most stable, also with the smallest microspheres were that prepared with PGPR. A shrinkage gelation factor of 0.8 was observed between drop size of emulsions and blank microspheres obtained, maintaining the shape and size distribution. When cocoa extract was encapsulated in microspheres, around 60% of retention was easily reached. The Peppas–Sahlin model fitted polyphenols release from microbeads, suggesting the existence of a relaxation/dissolution mechanism. The obtained cocoa microbeads could increase the daily intake of antioxidants when implemented in a food product.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Antioxidants like vitamins, phenol, flavonoids and proanthocyanidins retard or inhibit oxidation of lipids and prevent certain diseases (Kris-Etherton et al., 2004; Owen et al., 2000; Woodside et al., 1999), such as cancer, arteriosclerosis, neurodegenerative, inflammatory and cardiovascular diseases (Prior & Gu, 2005). Flavonoids are polyphenolic compounds widely distributed among plants mainly in seeds, fruits and beverages such as tea, wine and beer. The antioxidant activity of the phenolic compounds is mainly due to their redox properties, as they play an important role by neutralizing free radicals and oxidants (Feng Peng et al., 2003). Considering the above benefits and new ideas to reduce the use of commercial synthetic antioxidants, natural extracts rich in polyphenols arise as active ingredients that may be incorporated into food in order to make it functional. Because the addition of natural

antioxidants may alter the color and flavor of foods, recent studies suggest the application of microencapsulation technique to mask these effects, to protect them from the environment or for controlling release into food (Champagne & Fustier, 2007; Deladino, Anbinder, Navarro, & Martino, 2008). For example, although cocoa is a rich source of polyphenols, the flavonoids contained offer an astringency and bitterness (Li et al., 2012) which could be masked by encapsulation.

The microencapsulation (ME) technique has been mainly described as a process in which small particles or droplets are surrounded by a homogeneous or heterogeneous coating, forming beads or capsules with various applications (Borgogna, Bellich, Zorzín, Lapsin & Cesáro, 2010). In this sense, microparticles, microcapsules or microspheres are defined as the product of the microencapsulation process depending on their morphology and internal structure (Anal & Singh, 2007). Basically, the microcapsules are differentiated of the microspheres by the distribution of active ingredient. In the first case, the active compound is included in solid or liquid form in the core of the bead. While, in the microspheres, the active ingredient is dispersed and trapped in the matrix that forms the whole spheres (Zuidam & Shimoni, 2010). ME has an evident impact on the food industry. In food science and

* Corresponding author: Group of Colloidal Systems Engineering, Department of Chemical Engineering, University of Barcelona, C/Martí i Franquès 1-11, 08028, Barcelona, Spain. Tel: +34 93 402 12 92; +34 93 402 12 88; fax: +34 93 402 12 91.
 E-mail address: bryshilalupo@ucla.edu.ve (B. Lupo).

biotechnology it involves the incorporation of ingredients like polyphenols, volatile additives, enzymes and probiotic bacteria in small capsules or spheres, giving them the chance to be stable, protected and preserved against nutritional and health loss and to eventually act as antimicrobial agents (Gouin, 2004; Nazzarro, Fratianni, Coppola, Sada & Orlando, 2009).

Alginate is one of the most widely used polymers in microencapsulation, as it forms a highly versatile, biocompatible and nontoxic matrix of gel that protects the active components of factors such as heat and moisture thereby enhancing stability and bioavailability (Funami et al., 2009). Moreover, alginate has many advantages both for human consumption and industrial application. Such aspects are compiled in the literature by Imeson (2010, Chap. 4) highlighting the prebiotic effect of the low molecular weight alginates, their benefits as daily fiber intake for the reduction of cholesterol levels in blood sugar and their ability to extend product shelf life (Goh, Heng, & Chan, 2012).

Microspheres of gelled alginate can be prepared by ionic gelation that may occur externally or internally. A source of Ca^{+2} is used in both cases. In external gelation the Ca^{+2} ions diffuse from an external source into the alginate solution at neutral pH. Contrarily, in internal gelation an insoluble calcium salt is already present inside the droplets before gelation occurs, and Ca^{+2} is released by acidification of the medium (Funami et al., 2009; Poncelet et al., 1995; Ribeiro, Neufeld, Arnaud, & Chaumeil, 1999; Ribeiro, Silva, Ferreira, & Veiga, 2005; Silva, Ribeiro, Figueiredo, Gonçalves, & Veiga, 2006). The most widely used encapsulation method is extrusion/external gelation, wherein the formation of beads containing the solution of alginate and the component to be encapsulated is accomplished by using an extruder device dripping on a bath of CaCl_2 solution which induces the gelation (Chan, Lee, Ravindra, & Poncelet, 2009). The main limitation of this technique is the large size of beads formed, which depends on the diameter of the nozzle extruder. Among other drawbacks, this method has the difficulty of large scale production because beads are formed one by one (Mofidi, Aghai-Maghadam & Sarbolouki, 2000). Further back in time, alginate encapsulation techniques has been applied for cells immobilization and drugs release due to the potential of methods and benefits of the hydrocolloid (Dornish, Aarnold & Skaudrud, 1996; Jankowski, Zielinska, & Wyszakowska, 1997; Kearney, Upton, & Loughli, 1990; Wan, Heng, & Chan, 1992). Recent investigations have improved the extrusion technique by forming microbeads with electrostatic fields which has been even studied in previous investigation (Bešćak-Cvitanović et al., 2011; Dhonal & Stepánek, 2010; Halle et al., 1994; Poncelet, Babak, Neufeld, Googen, & Burgaski, 1999; Yeh, Zhao, Lee, & Lin, 2009).

Emulsification/gelation technique is the process of dispersion of one liquid in another one, with alginate and active compound solved together in the dispersed phase. Therefore, when ionic induced gelation occurs, alginate forms the polymeric matrix trapping the active component inside. The addition of an emulsifier favors the formation and stability of the emulsion. Its nature and concentration influences the distribution of droplet size (Poncelet, 2001; de Vos, Faas, Spasojevic, & Sikkema, 2010). In this regard, the preparation of emulsion microspheres through the emulsification/gelation technique may be carried out by means of external or internal gelation. External gelation consists of emulsifying a watery solution of alginate-active component in a non-aqueous continuous phase, adding later to the medium a CaCl_2 solution to induce the gelation of droplets and promote separation of the formed microspheres. In emulsification/internal gelation an insoluble or partially soluble salt of calcium is already present inside the droplets of the water in oil emulsion (w/o) (Chan, Lee, & Heng, 2006; Gouin, 2004). An acid is then added to the medium that must diffuse along the continuous phase into the droplets. Then

their pH decrease and Ca^{+2} ions are released, occurring gelation. Previous work in internal gelation mentions the difficulty of controlling the polydispersity of the spheres, with mean diameters between 50 and 1000 microns (Poncelet, 2001). In most of literature, the droplets of alginate solution contain CaCO_3 particles dispersed as the calcium source for internal gelation (Chen & Subirade, 2006, 2007; Chan, Lee, & Heng, 2002, 2006; Choi, Park, Hwang & Park, 2002; Funami et al., 2009; Guan, Chi, Yu, & Li, 2011; Silva et al., 2006; Zhao, Carvajal, Won, & Harris, 2007). Alternative calcium salts can be added in alginate-watery phase as Glucono-delta-lactone (GLG) (Amici, Tetradis-Meris, Pulido de Torres, & Jousse, 2008), tartrate, oxalate and citrate which have been preliminarily studied by Poncelet (2001) but without farther published investigation.

Surfactants like spans could be adequate as emulsifiers to formulate w/o emulsions as they are used in cakes, puddings and cosmetics, among others. Other emulsifiers with a low hydrophilic-lipophilic balance (HLB), like Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) could be used. PGPR is well dissolved in corn and sunflower oil (Márquez, Medrano, Panizzolo, & Wagner, 2010; Márquez, Palazolo, & Wagner, 2007). It is also quite commonly used in chocolate manufacture, due to its excellent water-binding properties which inhibit the thickening of chocolate in the presence of undesired inclusions of water. According to FDA definition, PGPR is generally recognized as safe and so extensively used by the food industry (FDA, 2006; Gülerem & Corredig, 2012; Wilson, Van Shie, & Howes, 1998). Many investigations have examined the stability of w/o and multiple emulsions when PGPR is used (Gülerem & Corredig, 2012; Márquez et al., 2010; Su, Flanagan, Hemar, & Singh, 2006). However, according to our knowledge, only one published study uses this emulsifier to prepare alginate submicron beads and the authors use external gelation (Paques, van der Linden, van Rijn, & Sagis, 2013). Internal gelation, therefore, has not been suited with PGPR as emulsifier.

In the present study, alginate microspheres are prepared by emulsification/internal gelation with PGPR and several Spans as emulsifiers. Stability of emulsions and size distribution of resulting microspheres are studied and compared. The salts CaCO_3 and $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (calcium citrate) are used as the calcium source at several concentrations. Moreover, it is evaluated the viability of cocoa polyphenol encapsulation through an experimental factorial design. Finally, the release profile of polyphenol from the prepared alginate microspheres is studied and fitted to a kinetic equation.

2. Materials & methods

2.1. Materials

Sodium alginate was supplied by Panreac. Sodium alginate was analyzed by ^1H NMR spectroscopy using a Bruker DMX-500 (500 MHz) spectrometer. The ratio M/G was estimated to be 1.43 with monad frequencies fraction of guluronate ($F_G = 0.41$) and fraction of mannuronate ($F_M = 0.59$) units as well as diad and triad frequencies of $F_{GG} = 0.25$; $F_{MM} = 0.43$; $F_{GM} = 0.16$; $F_{GCG} = 0.13$; $F_{MCM} = 0.04$ and $F_{GCM} = 0.12$. The number average length of G-blocks was $N_{G>1} = 3.0$ (ASTM F 2259-03; Grasdalen, 1983; Santi, Coppetta, & Santoro, 2008). The weigh-average molecular weight (M_w) and the number-average molecular weight (M_n), $M_w = 1750$ kDa and $M_n = 668$ kDa, were determined by using a Waters 2695 Alliance model Gel Permeation Chromatograph. Water 2000-1000 Ultrahydrogel Columns were employed; NaNO_3 (0.1 M) was used as the eluting solvent. The universal calibration was constructed by using Dextran standards with narrow-molecular-weight distribution (Ci et al., 1999; Sen, 2011). Calcium chloride and calcium citrate tetrahydrate at 96% and 99%

respectively, polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween®20), polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween®80), sorbitan monooleate (Span® 80), sorbitan trioleate (Span®85), Folin–Ciocalteu reagent and Gallic acid were supplied by Aldrich. Calcium carbonate (CaCO_3) at 98.5–100.5% with an average particle size of $7.600 \pm 0.009 \mu\text{m}$, glacial acetic acid, hydrochloric acid 37% and 6 M sodium hydroxide were supplied by Panreac. Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) was kindly donated by Lansenor Emul, S.L. Refined sunflower oil was supplied by Southern-Coosur oils, S.A. The cocoa extract with high polyphenol content was kindly provided by the Faculty of Pharmacy of the University of Barcelona (Spain). Deionized Milli-Q water was used in all experiments.

2.2. Preparation of bulk gels

In order to determine the minimum concentration of calcium required for gelation, bulk gels were formed by preparing a sodium alginate solution with different concentrations of CaCl_2 . Each sample was prepared with 4 g of 2% w/w sodium alginate aqueous solution and 1 g of CaCl_2 aqueous solution in the range 0.05–5% w/w $[\text{Ca}^{2+}]$. Furthermore, for studying the influence of pH on gelling a concentration of $[\text{Ca}^{2+}]$ higher than the minimum found for gelation was chosen in order to guarantee a complete gel formation. In this sense, the pH of solutions was adjusted with HCl or NaOH. Samples were stirred moderately to homogenize at room temperature, leaving at rest for 24 h to ensure complete reaction.

2.3. Viscoelasticity measurements

Oscillatory measurements were performed using a HAAKE RS300 rheometer. A 35 mm roughened parallel-plate geometry was used to prevent slippage, with a gap of 1 mm. Temperature was controlled at $25 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Frequency sweep measurements were carried out in the frequency range 0.01–10 Hz. Strain was chosen in order to work within the linear viscoelastic region. For that, preliminary strain sweeps were made at a frequency of 1 Hz to determine the linear range.

2.4. Blank microspheres preparation

Alginate microspheres were prepared by emulsification/internal gelation method proposed by Poncelet, 2001 with minor changes. The sodium alginate solution at 2% w/w was prepared using an Ultra-Turrax model T25 Basic IKA-WERKE at room temperature, stored under refrigeration for 24 h to complete hydration and deaerated. Then, 20 ml of the solution were mixed with 1 ml of a suspension of CaCO_3 or $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ salt (0.05 M and 0.15 M). The aqueous mixture was dispersed in 40 ml of sunflower oil where an amount of Span 80 was previously solved. To favor the formation of w/o emulsion, dispersed phase was drop wise supplied in a controlled manner and mixed for 15 min more. Then, gelation of the droplets was induced by drop wise addition of 10 ml of vegetal oil containing 80 μl of glacial acetic acid to the emulsion at a controlled agitation rate of 250 rpm. After 15 min of gelling reaction, the microspheres formed were separated from the oil by addition of 100 ml of a CaCl_2 solution at 0.05 M with 10% w/w Tween 20 under vigorous stirring for 15 min more, until complete partition of microspheres to the aqueous phase. The oil was discarded, and the microspheres were filtered by gravity on a $0.45 \mu\text{m}$ sieve and washed with the CaCl_2 /Tween 20 solution. Microspheres were then redispersed in water and observed by optical microscopy (OPTIKA Microscopes) to observe shape and estimate their size distribution by measuring 300 microspheres/sample. Some of them were dried in a vacuum oven at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ and 300 mBar during 40 min and the uncoated microspheres were directly placed in SEM.

Analysis was performed by using a Hitachi TM-1000 with accelerating voltage of 15 Kv.

2.5. Emulsion preparation

Emulsions for the study of their stability were performed using a Vortex Shaker HEIDOLPH REAX top model by mixing in a Turbiscan tube 10 g of total emulsion at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. The emulsifiers were added into the tube which contained the sunflower oil at 2, 5 and 10% w/w of Span 80 (S80), Span 85 (S85), PGPR and a mixture of Span 80 and Tween 80 ($\text{S80} = 51/\text{T80} = 49$). The required alginate solution at 2% w/w was made apart as described in Section 2.4. Then, 20% w/w of this solution containing the selected calcium salt was added into the oil phase drop by drop with a continuous shaking to allow homogenization of the mixture. The vortex was used in the preparation of all emulsions at medium speed in order to avoid foam formation.

In order to analyze the droplet size distribution of emulsions, these were prepared in a 100 ml vessel after the most stable emulsifier was chosen (PGPR). These were prepared according to the Poncelet (2001) protocol with minor changes described in Section 2.4 but without addition of acetic acid.

2.6. Light scattering measurements

Stability of emulsions was studied by light scattering measurements using a vertical scan analyzer (Turbiscan MA2000). This equipment scans the sample along the tube where it is contained, giving a number of profiles of back scattering (%BS) and transmission percentages as a function of time and tube length (Márquez et al., 2010). Measurements were performed continuously during 14 min. Longer stabilities are not required as emulsions are immediately used after their formation as a means to prepare alginate microspheres by gelling the droplets throughout a chemical reaction. From the obtained profiles, two different zones were selected along the tube in order to compare the stability of the w/o emulsions by taking the mean values of %BS considering the 20–25 mm and 50–55 mm of tube length. It was not observed a quantitatively significant difference between the two zones, so it was taken an average of these two values of %BS for the graphical representation of the emulsions stability. As a method to determine the kinetics of destabilization, for w/o emulsions, it was represented the coalescence percentage (%C) using the following equation:

$$\%C = \left[\frac{(\text{BS}_{\text{in}} - \text{BS}_{\text{f}})}{\text{BS}_{\text{in}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

where BS_{in} was the initial value and BS_{f} was the value at the required time of back scattering (Márquez et al., 2007). Measurements were performed at least for duplicate to express each value as the mean \pm standard deviation (S.D.).

2.7. Optical microscopy

Size distributions of aqueous alginate droplets and blank microspheres into the continuous oil phase were calculated by taking different images of the emulsions and blank microspheres prepared with the insoluble calcium salt and the emulsifier chosen by following the protocol described in Sections 2.4 and 2.5. The images were obtained by using an Optical Microscope (Optika B600 Model) with an adapted digital camera (Moticam 2300 3.0 MP) operating at $10\times$, $20\times$ and $40\times$ magnification. The digital images were analyzed with a microscopy software Motic Images Plus 2.0 ML, so it allowed

performing measurements of the diameters. 300 microspheres or droplets were measured for each picture.

2.8. Cocoa calcium microspheres preparation

The same standard procedure described above was used to prepare the cocoa alginate microspheres. PGPR was used as the emulsifier and calcium citrate as the Ca^{+2} source (6.2% w/w respect to the dispersed phase). Certain details were considered in the preparation of the dispersed phase to include cocoa extract. Firstly, an alginate:2% cocoa:1% watery solution was prepared by using an Ultra Turrax device (IKA WERKE) at 10,000 rpm, then it was sonicated with an Ultrasonic homogenizer (HD2070 Sonoplus Bendelin) equipped with titanium probe, 20 kHz frequency, 21 W power for 20 min. This solution was stored for 24 h, under refrigeration and protected from light, to ensure complete hydration and deaeration. Finally, the pH was adjusted to 6.7–6.9 by addition of a 6 M NaOH under continuous agitation using a pH/ISE measuring instrument (ProLab 3000) to avoid a premature liberation of calcium ion due to the natural acid pH of cocoa extract. After that, the protocol on Section 2.4 was followed. In order to observe the influence of the composition variables in the encapsulation results, a fractional factorial design was established where the independent variables were the concentration of PGPR (4–15% w/w), % of dispersed phase (15–40% w/w) and the concentration of calcium chloride in the washing solution (0.03–0.1 M). Preparation variables were settled at 25 °C, 250 rpm of agitation rate and 4000 rpm of centrifugation (Mixtasel-BL Selecta electronically controlled) for 10 min to separate microspheres. Then, the oil phase was discarded and the alginate-cocoa microspheres redispersed in water for size distribution analysis. Results were processed using the Statgraphics Plus (Version 5.1 Statistical Graphics Corporation, Rockville, USA, 2000). All data were analyzed using ANOVA, where responses were considered significant with p values <0.05 .

2.9. Laser diffraction measurements

The average particle size of calcium carbonate salt was obtained by dispersing it in a Scirocco 2000, an automated dry powder dispersion unit with an Air venturi dispersion from 0 to 4 bar. While, the size distribution of prepared alginate-cocoa microspheres further redispersed in water was performed in the dispersion unit (Hydro 2000S) In both cases particles were analyzed by laser diffraction with a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, MA). De Broucker mean diameter, related to volume distribution, was obtained from the microspheres size distribution. The Span factor was taken as a measure of the polydispersity of the distribution. It is calculated as the difference between the mean diameters of the accumulated volume for the 90% and 10% of particles divided the 50% mean diameter of the microspheres in the sample. To obtain representative results of microsphere and particle size of salt, analysis were performed in triplicate and expressed as mean values \pm standard deviation (SD).

2.10. Analysis of polyphenol content in alginate-cocoa microspheres

The total phenolic content (TPC) was analyzed by the spectrophotometric method of Folin–Gocalteau following the procedure proposed by Erkan, Ayranci, and Ayranci (2008) using Gallic acid as reference component (Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 20). Some modifications were made to the protocol by preparing a control sample for each case, in order to remove any interference from the alginate and from the supernatants due to the remaining oil and emulsifier. To determine the amount of TPC it was taken 1 ml (diluted 1:1000) of disperse phase containing cocoa extract and 1 ml (diluted

1:100) of supernatants separately for each experiment, it was added 6.25 ml of sodium carbonate 20%, 1.25 ml of 1 N Folin reagent and completed with milliQ water until 10 ml. Finally, it was stirred vigorously and allowed to stand for 2 h at room temperature. Before reach the time of Folin–Gocalteau reaction, samples were filtered through a syringe disc of 0.45 μm pore size. After this time, the absorbance was measured at 765 nm. Procedure was performed for each test identified by the experimental design for all variables established, with the aim of determining the percentage of total phenol retained by the difference of concentration between the amount present in the dispersed phase and the supernatant aqueous obtained from microspheres separation. The amount of TPC was expressed as mg Gallic acid equivalents (mg GAE/g dry cocoa extract). The percentage of polyphenols (%Retention) was calculated as:

$$\% \text{Retention} = \left[\frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

where C_0 was mg Gallic acid/g dry cocoa extract in the dispersed phase and C_f mg Gallic acid/g dry cocoa extract in the supernatant. Measurements were performed at least for duplicate to express each value as the mean \pm SD.

2.11. Polyphenols release experiments

2.11.1. Spectrophotometric measurements

In order to study the release of polyphenols from the microspheres obtained as described in Section 2.8, the microspheres separated from centrifugation were suspended in 50, 75, 100, 125, 150 and 200 ml of solution containing 0.05 M CaCl_2 and 10% w/w Tween 20. The samples were submitted to continuous agitation at 400 rpm (IKA Model RCT Basic), and an aliquot of the supernatant was taken at defined time intervals. Then, it was analyzed by performing the TPC assay described previously in Section 2.10. All samples were protected from light until analysis. The solution employed to separate the microspheres was used as the blank for all measurements. The results were expressed as percentage of release by time, taking into account the total phenols in the aqueous solution and the initial amount contained in the spheres.

2.11.2. Empirical and semi-empirical mathematical models

Two models were selected to evaluate the kinetics release of polyphenols from alginate microspheres. A very simple, semi-empirical equation to describe drug release from polymeric systems is the so-called Power law:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3)$$

Here, M_t and M_∞ are the absolute cumulative amount of active compound at time t and infinite, where k is a constant reflecting the design variables of the system and n is the release exponent, indicative of the mass transfer mechanism. The other model used (Equation (4)) was developed by Peppas and Sahlin, in line with the current utility of geometry-independent bi-exponential expression for determination of contributions of Fickian diffusion and matrix relaxation/dissolution of highly soluble bioactive release (Pillay & Fassihi, 2000; Siepmann & Peppas, 2012).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n + k_2 t^{2n} \quad (4)$$

where k_1 is the Fickian kinetic constant, k_2 is the relaxation/dissolution rate constant, and n is the release exponent. Fitting was performed by MatLab v.7.9.0, The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA.

3. Results & discussion

3.1. Determination of $[Ca^{+2}]$ minimum and range of pH required for gelation

Frequency sweep test were performed with bulk gels prepared at several $[Ca^{+2}]$ in order to determine the minimum required for gelation. In a properly formed gel, all relaxation times exist, as molecules of alginate join in a three-dimensional network that is extended to the whole bulk. As a consequence, the viscoelastic response of a gel is independent of frequency. Therefore, gelation point can be determined if a viscoelastic variable, for example the complex modulus, G^* , is plotted vs $[Ca^{+2}]$ for each frequency tested. The point where all curves join at the same value is the minimum $[Ca^{+2}]$ required for gelation. At higher concentrations, all curves come together, and variation on G^* can be attributed to ulterior strengthening of the gels due to the formation of more connection points between alginate molecules already interconnected. According to Fig. 1, a suitable gelling was produced with a minimum value of 1.13×10^{-4} mol of Ca^{+2} /g alginate.

In order to evaluate the pH influence in alginate gels, they were prepared using a $[Ca^{+2}]$ 1.8×10^{-4} mol Ca^{+2} /g alginate, i.e., above the minimum value, and adjusted to several pH. G^* is plotted vs frequency in Fig. 2. Although all curves are independent of frequency, indicating that a gel exists in the pH range 0.5–13, it was observed an inhomogeneous white gel formed with solid particles inside at pH below 3.5. It is attributed to the precipitation of alginic acid, which produces an increase in viscoelastic response. On the other hand, for pH above 10 the complex modulus G^* descends, probably due to a partial depolymerization of alginate, according to Cubero, Monferrer, and Villalta (2002, Chap. Hidrocoloides).

3.2. Selecting calcium source from blank microspheres preparation

Alginate microspheres were prepared with carbonate and citrate calcium salts for 0.05 M and 0.15 M of salt. Microspheres with 0.15 M of citrate were amorphous and many of them were larger than 1000 μm , probably due to the strong viscosity of the alginate salt mixture which hinders a proper dispersion in the oil phase. Therefore, microspheres prepared with 0.15 M of calcium citrate were discarded from the study. Fig. 3 shows the size distribution of spheres prepared with both salts. It can be observed that smaller spheres are formed when calcium citrate is used. Microspheres up to 100 μm can be added to a wide variety of foods without changing the sensory properties (Augustin, 2003), so they would be suitable to be added to food.

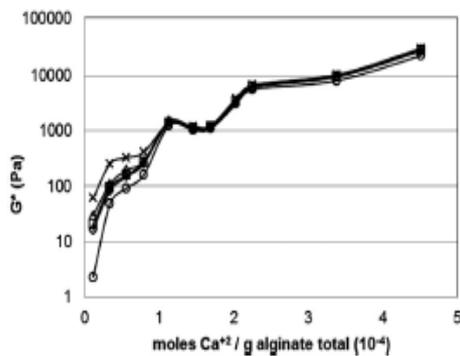


Fig. 1. Complex modulus, G^* vs moles Ca^{+2} /g alginate total (10^{-4}) at \circ , \diamond , \square , Δ , \triangle 2.0 and \square 5.0 frequencies. Sodium alginate solution \pm 2% w/w, $T = 25^\circ C$.

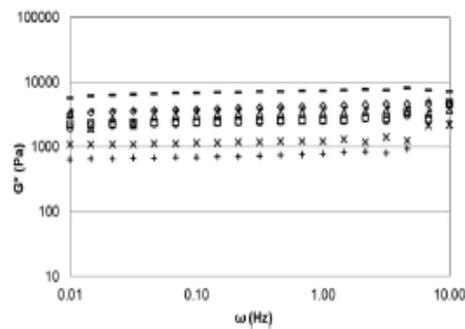


Fig. 2. Complex Modulus, G^* vs frequency oscillatory, ω of alginate gels prepared at 2% w/w of sodium alginate, $1.8 \cdot 10^{-4}$ mol Ca^{+2} /g alginate total and \circ , \diamond , Δ , \square , \triangle , \square , \square , \square 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 11 and 13 pH adjusting the $CaCl_2$ solution.

The student t test was applied to determine the significant differences between two populations by using the Statgraphics Plus (Version 5.1 Statistical Graphics Corporation, Rockville, USA, 2000). The statistical value of the Student t test, $|t_0|$, can be calculated with Eq. (5):

$$|t_0| = \frac{|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|}{\left(S_p \sqrt{1/n_1 + 1/n_2} \right)} \quad (5)$$

Where \bar{y}_1 and \bar{y}_2 are the mean values of populations to be compared. S_p is weighted standard deviation of both groups and n_1 and n_2 are the sample sizes of groups. Choosing a significance level of $\alpha = 0.05$ with a sample size of 300 spheres, the tabulated critical value of $t_{\alpha/2, n_1 + n_2 - 2}$ is 1.960 (Harris, 2003, Chap. 4). Statistical values of $|t_0|$ below this number indicate that populations are not significantly different.

Table 1 shows means diameters and standard deviation of fitted log-normal distributions. Populations of $[CaCO_3] = 0.05$ and 0.15 M, and populations of $[CaCO_3] = 0.05$ M and $[calcium\ citrate] = 0.05$ M were compared through the $|t_0|$ values. It can be seen that when samples with the two concentrations of $CaCO_3$ are compared no statistical differences are observed between populations as $|t_0|$ is lower than the tabulated critical value. It indicates that, in this range, the size distribution of spheres is not affected by the concentration of $CaCO_3$. On the other hand, when the nature of the salt is changed from $CaCO_3$ to calcium citrate, significant differences are observed, obtaining smaller microspheres with the citrate. In descriptive statistic, a box plot (Fig. 4) is a convenient way of

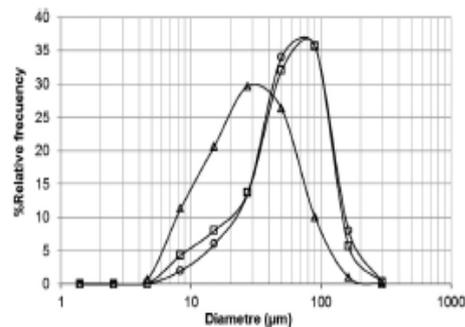


Fig. 3. Size distribution of blank alginate microspheres. 2% w/w of sodium alginate with \circ carbonate 0.05 M, \square carbonate 0.15 M and Δ citrate 0.05 M of calcium salts solutions.

Table 1
Values of the student t test for comparison of means populations of calcium salts sources.

Distribution adjusted	Comparison parameters	Comparison of mean for different concentration			Comparison of mean for different salts		
		Carbonate	Carbonate	t ₀	Carbonate	Citrate	t ₀
		0.05 M	0.15 M		0.05 M	0.05 M	
Log-normal distribution	Mean (µm) SD	65.66 47.29	64.14 53.98	0.31	65.66 47.49	33.93 27.71	6.47

The statistical value of the Student t test, |t₀|; standard deviation, SD; tabulated critical value 1.960 for comparison.

graphically depicting groups of numerical data through their five number summaries: the smallest observation, lower quartile, median, upper quartile and largest observation (Harris, 2003, Chap. 4). External points are shown separately when have values more than 1.5 times the interquartile range above or below the box (small squares). For distant external points, which are those farther than 3.0 times the interquartile range above or below the box, small squares with a plus sign therein are used. Fig. 4 shows that when citrate is used, most of spheres have a diameter lower than 100 µm, i.e., the limit to avoid changes in sensory properties of foods to which they could be added, with, moreover, a narrower quartile-box than when CaCO₃ is used instead.

Fig. 5 shows micropictures of beads obtained at 0.05 M of calcium carbonate and citrate. In both cases they appear spherical. However, citrate microspheres apparently have a uniform surface while the carbonate ones seem rough. It can be more accurately appreciated in SEM images (Fig. 6). This observation could be attributed to the carbon dioxide liberation during gelation, which generates voids or holes in the surface of spheres (Chan, Lee & Heng, 2001; Choi, Park, Hwang & Park, 2002; Zhao et al., 2007). Considering the surface morphology of spheres obtained with

CaCO₃, which may facilitate the premature release of the active compound encapsulated, joined to the fact that smaller spheres are obtained when citrate calcium is used, this salt was selected as the calcium source.

3.3. Selecting the emulsifier from the study of the stability of w/o emulsions

Fig. 7 shows evolution of back scattering (%BS), measured with the Turbiscan MA2000, for w/o emulsions with 20% w/w of dispersed phase (aqueous alginate/calcium salt dispersion) and different concentrations of several emulsifiers. A clear decrease in % BS is observed when spans or a mixture of tween-span are used, indicating rapid destabilization. While, when PGPR is used, %BS remains practically constant for all concentrations studied. Coalescence of alginate solution droplets can explain the decrease in time of %BS, so in Table 2 the percentage of coalescence (%C) was calculated by Eq. (1). Although most of reported studies used S80 and S85 as emulsifiers in the preparation of alginate microspheres (Chan et al., 2002; Chen & Subirade, 2007; Poncelet, 2001; Zhang, Cheng, & Ying, 2006; Zhao et al., 2007) our results indicate that the emulsions formed with them are the most unstable, as they have the higher %C. Moreover, Table 2 shows that when S80, S85 and S80/T80 were used an increase of the % of the emulsifier did not improve the stability of emulsions. The lower values of coalescence were by far that obtained with PGPR for all concentrations, indicating much more stable emulsions. On the other hand, when more PGPR was used, more stable emulsions were obtained, in the range of concentrations studied. This behavior was also observed by Márquez et al. (2010) in w/o emulsions with PGPR and 10% w/w of disperse phase with sunflower oil, where even the emulsion stability improved by the presence of calcium salts. Alginate microspheres were prepared through a w/o emulsion with 5% w/w of each emulsifier studied, in order to compare size distributions. The representation of spheres size distribution showed the smallest and less polydisperse microspheres by using PGPR (Fig. 8). It seems that

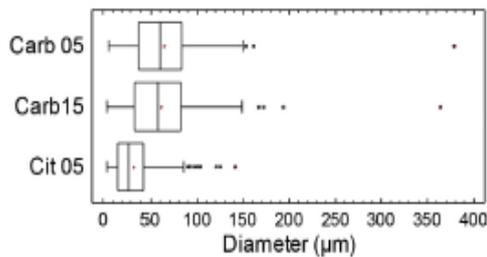


Fig. 4. Dispersion of size blank microspheres prepared with Carb 05 carbonate 0.05 M, Carb 15 carbonate 0.15 M and Cit 05 citrate 0.05 M.

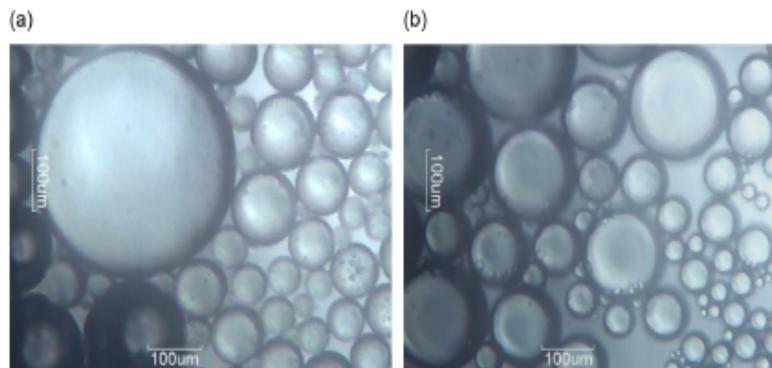


Fig. 5. Optical Microscopy images of blank wet alginate microspheres prepared at 0.05 M of calcium salts (a) Carbonate (b) Citrate.

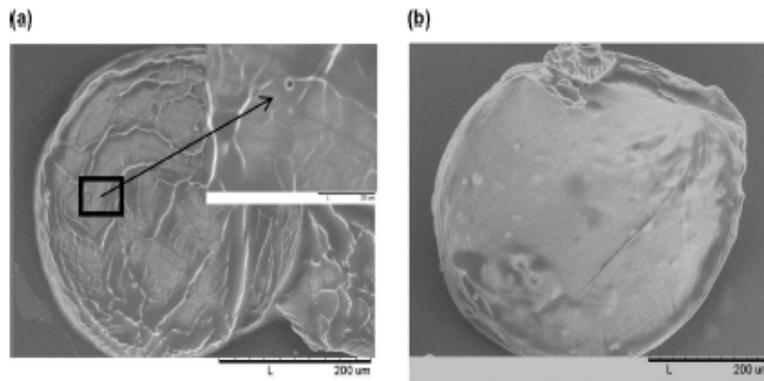


Fig. 6. SEM images of dry blank microspheres at 0.05 M of calcium salts (a) Carbonate (b) Citrate.

more stable emulsions produce, as a consequence, less poly-disperse spheres. Therefore, PGPR was chosen as the emulsifier for alginate microspheres preparation.

3.4. Correlation between drop size and blank microsphere distributions

Fig. 9 shows droplet and microsphere size distributions obtained at 2% and 5% w/w of PGPR. It can be observed that drop size distributions move towards lower values when gelation occurs, maintaining their shape. It indicates that shrinkage related to a syneresis effect occurs during gelation process, according to other authors (Chan et al., 2011). Table 3 shows mean diameter of droplets and spheres (D_{dr} and D_{sp}), standard deviations (SD) and relative

standard deviations (SDR). It can be observed that SDR is of the same order of magnitude, indicating no significant changes in the shape of size distribution when gelation occurs. A shrinkage gelation factor (K_{sg}) can be defined for each concentration of PGPR as:

$$K_{sg} = \frac{D_{dr} - D_{sg}}{D_{dr}} \quad (6)$$

It can be seen that shrinkage near the 80% occurs, due to the loss of water during the gelation process.

3.5. Encapsulation of cocoa extract

Alginate microspheres with encapsulated cocoa were prepared as described in Section 2.8. Their size distributions were measured

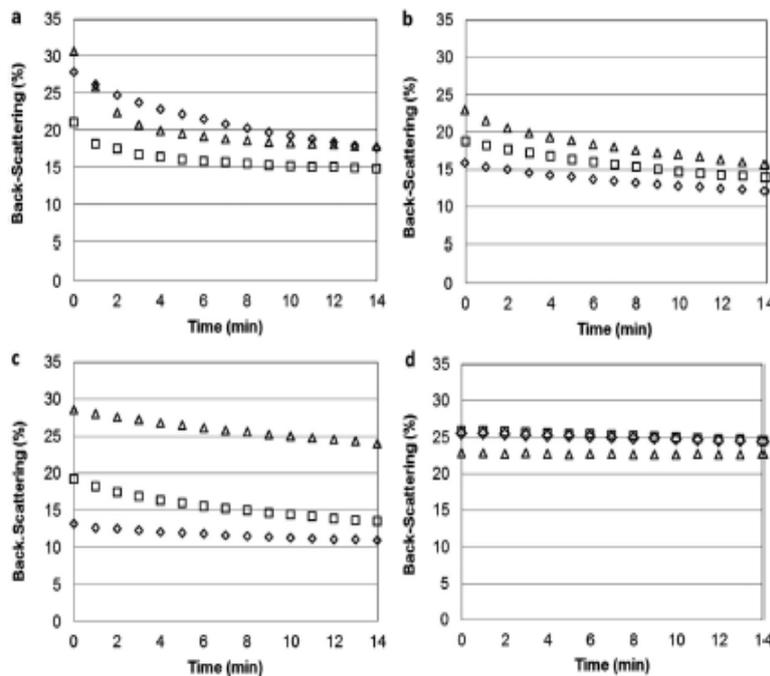


Fig. 7. Destabilization kinetics profiles for w/o emulsion with 20% w/w of aqueous phase for different concentrations of emulsifiers (a) S80 (b) S85 (c) S80T80 (d) PGPR with \diamond 2%, \square 5% and Δ 10% w/w. Average of β BS by considering the 20–25 mm and 50–55 mm of tube length.

Table 2
Variation of back-scattering and coalescence percentage of w/o emulsion by time.

Emulsifiers	Time = 0	Time = 14 min	%C
2%	\overline{BS}_0	\overline{BS}_t	%C
S80	27.80 ± 1.12	17.59 ± 1.13	36.73
S85	15.84 ± 0.21	12.14 ± 0.09	23.36
S80T80	13.12 ± 0.02	10.90 ± 0.46	16.92
PGPR	25.55 ± 0.03	24.39 ± 0.07	4.54
5%	\overline{BS}_0	\overline{BS}_t	%C
S80	18.73 ± 0.71	13.86 ± 0.17	26.00
S85	16.77 ± 0.52	10.65 ± 0.21	36.49
S80T80	19.16 ± 0.07	13.47 ± 0.57	29.70
PGPR	25.88 ± 0.04	24.77 ± 0.18	4.29
10%	\overline{BS}_0	\overline{BS}_t	%C
S80	30.58 ± 2.32	17.77 ± 0.53	41.89
S85	22.94 ± 3.93	15.64 ± 1.95	31.82
S80T80	28.96 ± 0.74	24.01 ± 0.28	15.93
PGPR	22.80 ± 0.84	22.63 ± 0.91	0.75

Back-scattering initial and final, \overline{BS}_0 and \overline{BS}_t , respectively. Coalescence, %C. Emulsifiers Span 80, S80; Span 85, S85; Span 80 and Tween 80, S80T80; Polyglycerol polyricinoleate, PGPR.

with the Mastersizer equipment, according to Section 2.9. A fractional factorial experimental design was used to study the effect of %PGPR, %Disperse phase and $[CaCl_2]$ of washing solution in the mean diameter of microspheres, D_{43} , their polydispersity measured as the Span factor, and in the %retention of cocoa polyphenols. Results are presented in Table 4.

Results of experimental design showed only a statistically significant influence of the % of disperse phase on the % of polyphenols retained ($p < 0.05$). On the other hand, when emulsifier concentration was increased from 4% to 15% w/w it was observed a decrease of the particle diameters from 321 to 39 μm as well as a decrease of the standard deviation as noted in previous research (Silva et al., 2006). The high polydispersity of results probably masks the influence of formulation variables on response variables in the range studied. Dispersion of results seems to indicate that there are some uncontrolled variables that are affecting the encapsulation process. For example, the washing and separation of spheres with the solution of $CaCl_2$ is made manually. Although the same procedure is accurately followed for each sample, small unnoted difference may influence the properties of the final spheres. Moreover, further research should be done regarding the process of microspheres partition into the aqueous phase in order to improve the retention of polyphenols, i.e., reduce the

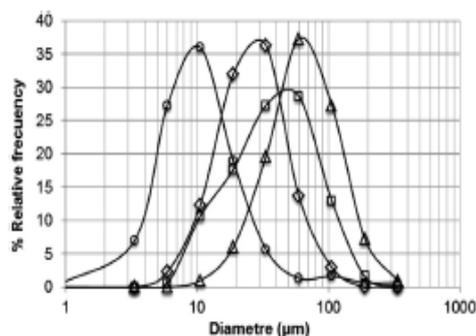


Fig. 8. Distribution of microspheres diameters prepared with \square S80, \diamond S85, Δ S80T80 and \circ PGPR at 5% w/w. Polyglycerol polyricinoleate, PGPR.

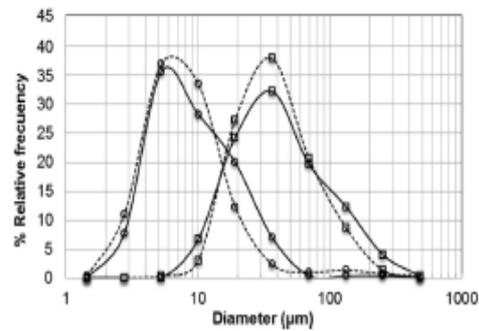


Fig. 9. Distribution of droplets (\square) and microspheres (\circ) diameters prepared with PGPR at 2% — and 5% — (w/w) Polyglycerol polyricinoleate, PGPR.

polyphenols loses (Guan et al., 2011). With these limitations, retention of polyphenols around the 60% can be easily reached. Therefore, the encapsulation of cocoa extract by emulsification/internal gelation with calcium citrate and PGPR seems to be promising. Besides, this seems to be a potential technique in order to minimize loss of polyphenols biological activity. So far, mainly spray drying and extrusion technique have been applied for encapsulation of plant polyphenols (Chan et al., 2011; Deladino et al., 2008; Fang & Bhandari, 2010; Nazzaro, Fratianni, Coppola, Sada, & Orlando, 2009) and new technologies trend as electrostatic extrusion (Belščak-Cvitanović et al., 2011). The most reported studies of encapsulation by emulsification/internal gelation, have been focused on drug delivery, enzymes and cells entrapments (Betoret, Betoret, Vidal, & Fito, 2011; Brinques & Záchia-Ayub, 2011; Kailasapathy & Masondole, 2005; Muthukumarasamy & Holley, 2006; Özer, Kirmaci, Şenel, Atamer, & Hayaloğlu, 2009; Özer, Uzun, Yakup & Kirmaci, 2008; Shah & Ravula, 2000; Talwalkar & Kailasapathy, 2003).

Table 3
Mean values of emulsion and spheres with 2% and 5% w/w of PGPR.

	2% PGPR		5% PGPR	
	D_{50}	D_{90}	D_{50}	D_{90}
Mean (μm)	11.19	54.20	10.14	45.58
SD	8.93	51.97	8.92	35.86
SDR%	79.83	95.89	87.89	78.67
K_{12}	0.79		0.78	

Deviation standard, SD; Relative standard deviation, SDR%; Shrinkage gelation factor, K_{12} ; diameter of spheres, D_{50} ; diameter of droplets, D_{90} .

Table 4
Effect of formulation variables on size distribution, span and cocoa retention in microspheres.

Emulsifier %	Phase dispersion %	$CaCl_2$ (M)	D_{43} μm	Span	%Retention
9.5 ^a	27.5	0.07	85.48 ± 0.41	1.81 ± 0.01	58.97 ± 0.05
9.5 ^a	27.5	0.07	87.35 ± 1.06	1.86 ± 0.03	59.93 ± 0.07
4	40	0.03	136.34 ± 10.02	1.77 ± 0.04	78.45 ± 0.01
15	40	0.10	39.60 ± 2.43	1.88 ± 0.02	80.92 ± 0.30
15	15	0.03	143.93 ± 9.19	2.37 ± 0.10	47.76 ± 0.02
4	15	0.10	321.14 ± 23.42	3.90 ± 0.19	53.61 ± 0.03

^a Repetition: central points of factorial design; %Retention of cocoa polyphenols in alginate microspheres; D_{43} volume mean diameter; factor of polydispersity, Span. Data were analyzed using ANOVA, where responses were considered significant with p values < 0.05 (Statgraphics Plus).

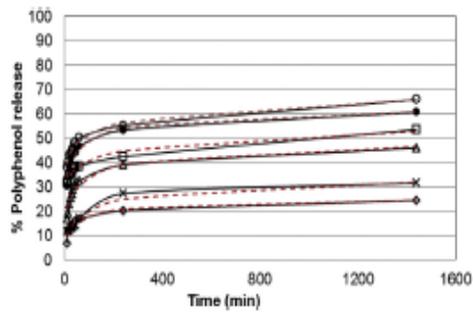


Fig. 10. Polyphenols release from microspheres at \diamond 50, \square 75, Δ 100, \square 125, \bullet 150 y \circ 200 ml dilutions. Curves for — experimental and - - - fitting with Peppas-Sahlin model.

3.6. Release of polyphenol from cocoa extract

Microspheres with encapsulated cocoa extract rich in polyphenols were prepared using composition variables chosen from the central point of experimental design (see Table 4). The release of polyphenols from alginate microspheres was studied as described in Section 2.11. Fig. 10 shows the polyphenols release vs time, at several dilutions of spheres. A similar qualitative trend of active compound release was observed for all dilution. In order to quantify the release results they were fitted to empirical Equations (4) and (5) (Table 5).

Peppas and Sahlin model fits data better than the Power-law model ($R^2 > 0.92$; Table 5). The fitting curves are shown in Fig. 10. Although, results showed satisfactory R^2 values when the Power-law was used, the exponents n were less than 0.43 which differs from the tabulated data for controlled drug release from polymer matrices for different geometries (Siepmann & Peppas, 2012). This may be attributed to the influence of a relaxation/dissolution mechanism, which requires the introduction of a negative rate constant (k_2), as the Peppas and Sahlin model does. This may suggest that relaxation has some influence on the release process of polyphenols from alginate microspheres in an aqueous medium. Table 5 shows that k_1 and k_2 increase with dilution of spheres. However, the exponent n presents a relatively high dispersion, and further work should be developed in order to better understand the release kinetics.

Table 5 Kinetics fitting model parameters.

Model	V (ml)	k or k_1 (min ⁻ⁿ)	k_2 (min)	n	R ²
M_t/M_∞	$k t^n$				
	50	0.0756	—	0.1687	0.86
	75	0.0653	—	0.2242	0.93
	100	0.1540	—	0.1587	0.86
	125	0.2545	—	0.1011	0.98
	150	0.2767	—	0.1138	0.89
200	0.3169	—	0.1024	0.97	
$k_1 t^n + k_2 t^{-2n}$	50	0.0592	-0.0036	0.2950	0.92
	75	0.0459	-0.0016	0.3650	0.97
	100	0.1309	-0.0082	0.2650	0.92
	125	0.2688	-0.0265	0.1350	0.98
	150	0.2508	-0.0258	0.2150	0.95
	200	0.3318	-0.0371	0.1500	0.98

M_t and M_∞ are the absolute cumulative amount of active compound at time t and infinite; Volume of release solution, V ; system characteristic constant, k ; Picking kinetic constant, k_1 ; relaxation/dissolution rate constant, k_2 ; release exponent n ; correlation coefficient R^2 .

4. Conclusion

Alginate microbeads were successfully prepared using an emulsification/internal gelation technique. Viscoelastic behavior of bulk gels showed a minimum calcium concentration required for gelation in the range of pH. Smaller and more homogeneous microspheres were obtained when calcium citrate was used as calcium source than when calcium carbonate was used instead, as during gelation no liberation of CO₂ takes place.

W/o emulsions prepared with PGPR were more stable than that prepared with several Spans or a mixture of Tween-Span, with smaller and less polydisperse droplet and subsequent smaller and less polydisperse microspheres. With emulsification/internal gelation around a 60% of cocoa extract can be encapsulated, and later released in an appropriate medium. A limitation of this technique seems to be that an undetermined amount of polyphenols is prematurely released into the washing solution. Therefore, the washing procedure should be further improved in order to increase the retention of polyphenols.

Acknowledgment

This study would not have been possible without the financial support from the Spanish Ministry for Science and Innovation (MIGINN) within the framework of the project CYCYTCTQ2011-29336-C03-02. B. Lupo is grateful to Erasmus Mundus External Cooperation Window Lot19b for the grant received to perform the investigation.

References

Amici, E., Tetradis-Meris, G., Pulido de Torres, C., & Jousse, F. (2008). Alginate gelation in microfluidic channels. *Food Hydrocolloids*, 22(1), 97–104.

Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240–251.

ASTM F 2259–03. (2008). *Standard test method for determining the chemical composition and sequence in alginate by proton nuclear magnetic resonance (1H NMR) spectroscopy*.

Augustin, M. A. (2003). The role of microencapsulation in the development of functional dairy foods. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 156–160.

Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Gndrić, I., Nedović, V., et al. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*, 44(4), 1094–1101.

Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., & Fito, P. (2011). Functional foods development: trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 22(9), 488–508.

Borgogna, M., Bellich, B., Zorzini, L., Lapasin, R., & Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416–423.

Brinques, G. B., & Zachia Ayuh, M. A. (2011). Effect of microencapsulation on survival of lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103(2), 123–128.

Champagne, C. P., & Pustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184–190.

Chan, E., Lee, B., Ravindra, P., & Ponçezet, D. (2009). Prediction models for shape and size of calcium-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), 63–72.

Chan, E., Wong, S., Lee, P., Lee, J., Li, T. B., Zhang, Z., et al. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83(1), 225–232.

Chan, L. W., Lee, H. Y., & Heng, P. W. S. (2002). Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1–2), 259–262.

Chan, L. W., Lee, H. Y., & Heng, P. W. S. (2006). Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 63(2), 176–187.

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

Chen, L., & Subirade, M. (2007). Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate-whey protein granular microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63(3), 354–362.

- Choi, B. Y., Park, H. J., Hwang, S. J., & Park, J. B. (2002). Preparation of alginate beads for floating drug delivery system: effects of CO₂ gas-forming agents. *International Journal of Pharmaceutics*, 239(1–2), 81–91.
- Ci, S. X., Huynh, T. H., Louie, L. W., Yang, A., Beals, B. J., Ron, N., et al. (1999). Molecular mass distribution of sodium alginate by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 864, 199–210.
- Cubero, N., Monferrer, A., & Villalta, J. (2002). *Aditivos alimentarios*. Madrid: A. Madrid Vicente.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., & Martínez, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *ilex paraguayensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71(1), 126–134.
- Dhonal, J., & Štepiček, F. (2010). Inkjet fabrication and characterization of calcium alginate microcapsules. *Power Technologies*, 200(3), 254–259.
- Dornish, M., Arnold, M., & Skaugrud, O. (1996). Alginate and chitosan: biodegradable biopolymers in drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 153.
- Erkan, N., Ayranç, G., & Ayranç, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella arvensis* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76–82.
- Fang, Z., & Ihandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523.
- Feng Peng, Z., Satrac, D., Baumert, A., Subramaniam, R., Goh, N. K., Chia, T. F., et al. (2003). Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*, 62(2), 219–228.
- Food and Drug Administration (FDA). GRAS Notice No. GRN 000179. CFSAN/Office of Food Additive Safety January 20, 2006.
- Funami, T., Iang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakamura, M., Draget, K. I., et al. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1746–1755.
- Goh, C. H., Heng, P. W. S., & Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 1–12.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7–8), 330–347.
- Grasdalen, H. (1983). High-field, H NMR spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. *Carbohydrate Research*, 118, 255–260.
- Guan, H., Chi, D., Yu, J., & Li, H. (2011). Encapsulated ecdysone by internal gelation of alginate microspheres for controlling its release and photostability. *Chemical Engineering Journal*, 168(1), 94–101.
- Gülserem, I., & Corredig, M. (2012). Interactions at the interface between hydrophobic and hydrophilic emulsifiers: polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and milk proteins, studied by drop shape tensiometry. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 193–198.
- Halle, J. P., Leblond, F. A., Parisseau, J. P., Jutra, P., Brabant, M. J., & Lepage, Y. (1994). Studies on small (<300 microns) microcapsules: II – parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses. *Cell Transplantation*, 3(5), 365.
- Harris, D. C. (2003). *Quantitative chemical analysis* (6th ed.) New York: U.S.A.
- Imeson, A. (2010). *Food stabilisers, thickeners and gelling agents* (1st ed.). UK: IBC BioPolymers.
- Jankowski, T., Zielinska, M., & Wysakowska, A. (1997). Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnology Techniques*, 11(1), 31–34.
- Kailasapathy, K., & Masondole, L. (2005). Survival of free and microencapsulated lactobacillus acidophilus and bifidobacterium lactis and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60(3), 252–258.
- Kearney, L., Upton, M., & Loughlin, A. (1990). Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* by immobilizing the cells in calcium alginate beads. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3112–3116.
- Kris-Etherton, P. M., Lefevre, M., Beecher, G. R., Gross, M. D., Keen, C. L., & Etherton, T. D. (2004). Bioactive compounds in nutrition and health: research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, 24, 511–538.
- Li, Y., Feng, Y., Zhu, S., Luo, C., Ma, J., & Zhong, F. (2012). The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(1), 17–23.
- Márquez, A. L., Medrano, A., Panizolo, L. A., & Wagner, J. R. (2010). Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 340(1), 101–108.
- Márquez, A. L., Palazolo, G. G., & Wagner, J. R. (2007). Water in oil (w/o) and double (w/o/w) emulsions prepared with spans: microstructure, stability, and rheology. *Colloid and Polymer Science*, 285(10), 1119–1128.
- Mofidi, N., Aghai-Moghadam, M., & Sarbolouki, M. N. (2000). Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry*, 35(9), 885–888.
- Muthukumarasamy, P., & Hooley, R. A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated lactobacillus reuteri. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 164–169.
- Nazzaro, F., Fratanni, F., Coppola, R., Sada, A., & Orlando, P. (2009). Fermentative ability of alginate-pretreated encapsulated lactobacillus acidophilus and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 319–323.
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalter, B., & Bartsch, H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36(10), 1235–1247.
- Özert, B., Uzun, Y. S., & Kirmaci, H. A. (2008). Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during kasar cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 61(3), 237–244.
- Özert, B., Kirmaci, H. A., Şenel, E., Atamer, M., & Hayaloğlu, A. (2009). Improving the viability of bifidobacterium bifidum BB-12 and lactobacillus acidophilus LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, 19(1), 22–29.
- Paques, J. P., van der Linden, E., van Rijn, C. J. M., & Sagis, L. M. C. (2013). Alginate submicron beads prepared through w/o emulsification and gelation with CaCl₂ nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 428–434.
- Pillay, V., & Fassihi, R. (2000). A novel approach for constant rate delivery of highly soluble bioactives from a simple monolithic system. *Journal of Controlled Release*, 67(1), 67–78.
- Poncelet, D., Poncelet De Smet, D., Beaulieu, C., Huguet, M. L., Fourier, A., & Neufeld, R. J. (1995). Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 644–650.
- Poncelet, D., Babak, V. G., Neufeld, R. J., Googen, M. F. A., & Burgaski, B. (1999). Theory of electrostatic dispersion of polymer solutions in the production of microgel beads containing biocatalyst. *Advances in Colloid and Interface Science*, 79, 213–228.
- Poncelet, D. (2001). Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. *Bioartificial Organs III: Tissue Sourcing, Immunotolerance, and Clinical Trials*, 944, 74–82.
- Prior, R. L., & Gu, L. (2005). Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, 66(18), 2264–2280.
- Ribeiro, A. J., Neufeld, R. J., Arnaud, P., & Charneil, J. C. (1999). Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan coated alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 187, 115–123.
- Ribeiro, A. J., Silva, C., Ferreira, D., & Veiga, F. (2005). Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(1), 31–40.
- Santi, C., Coppetta, D., & Santoro, S. (2008). NMR analysis of non hydrolyzed samples of sodium alginate. In *12th international electronic conference on synthetic organic chemistry (ECSOC-12)*. <http://www.usc.es/congresos/ecso12/ECSOC12.htm>.
- Sen, M. (2011). Effects of molecular weight and ratio of guluronic acid to manuronic acid on the antioxidant properties of sodium alginate fractions prepared by radiation-induced degradation. *Applied Radiation and Isotopes*, 69, 126–129.
- Shah, N., & Ravula, R. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55(3), 139–144.
- Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 163–174.
- Silva, C. M., Ribeiro, A. J., Figueiredo, I. V., Gonçalves, A. R., & Veiga, F. (2006). Alginate microspheres prepared by internal gelation: development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 311(1–2), 1–10.
- Su, J. H., Flanagan, J., Hemar, Y., & Singh, H. (2006). Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilization of water-oil-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20(2–3), 261–268.
- Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2003). Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(1), 36–39.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292–302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdairy.2009.11.008>.
- Wan, L. S. C., Heng, P. W. S., & Chan, L. W. (1992). Drug encapsulation in alginate microspheres by emulsification. *Journal of Microencapsulation*, 9(3), 309–316.
- Wilson, R., Van Shie, B. J., & Howes, D. (1998). Overview of the preparation, use and biological studies on polyglycerol polyricinoleate (PGPR). *Food and Chemical Toxicology*, 36(9–10), 711–718.
- Woodside, J. V., Young, I. S., Yarnell, J. W. G., Roxborough, H. E., McMaster, D., McCrum, E. E., et al. (1999). Antioxidants, but not B-group vitamins increase the resistance of low-density lipoprotein to oxidation: a randomized, factorial design, placebo-controlled trial. *Atherosclerosis*, 144(2), 419–427.
- Yeh, C., Zhao, Q., Lee, S., & Lin, Y. (2009). Using a T-junction microfluidic chip for monodisperse calcium alginate microparticles and encapsulation of nanoparticles. *Sensors and Actuators A-physical*, 151(2), 231–236.
- Zhang, F. J., Cheng, G. X., & Ying, X. G. (2006). Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres. *Reactive and Functional Polymers*, 60(7), 712–719.
- Zhao, Y., Carvajal, M. T., Won, Y., & Harris, M. T. (2007). Preparation of calcium alginate microgel beads in an electrodispersion reactor using an internal source of calcium carbonate nanoparticles. *Langmuir*, 23(25), 12489–12496.
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. New York, NY, USA. Chap. 2.

A manuscript number has been assigned: FOODHYD-D-14-00786

1 mensaje

Food Hydrocolloids <submissionsupport@elsevier.com>
Para: bryshilalupo@ucla.edu.ve, bryshila@gmail.com

20 de octubre de 2014, 9:34

Ms. Ref. No.: FOODHYD-D-14-00786

Title: Characterization of alginate beads with encapsulated Cocoa extract to prepare functional food: comparison of two gelation mechanisms
Food Hydrocolloids

Dear Mrs. Bryshila Lupo,

Your submission entitled "Characterization of alginate beads with encapsulated Cocoa extract to prepare functional food: comparison of two gelation mechanisms" has been assigned the following manuscript number: FOODHYD-D-14-00786.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/foodhyd/>.

Your username is: bryshilalupo@ucla.edu.ve

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/foodhyd/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Administrative Support Agent
Administrative Support Agent [28-Jan-11]
Food Hydrocolloids

**Characterization of alginate beads with encapsulated Cocoa extract
to prepare functional food: comparison of two gelation
mechanisms.**

Bryshila Lupo*, Alicia Maestro, José M. Gutiérrez, Carmen González.

*Group of Colloidals Systems Engineering. Department of Chemical Engineering.
University of Barcelona. C/Martí i Franquès 1-11 E-08028, Barcelona, Spain.*

*e-mail: bryshilalupo@ucla.edu.ve

ABSTRACT

In this study we compared two gelation mechanisms for the preparation of alginate beads with encapsulated cocoa extract. We used the extrusion method to induce the external gelation [EG] or internal gelation [IG]. Beads with different cocoa and calcium concentrations were prepared by either gelation mechanism. Size, morphology and texture analysis showed clear differences in the structure of the beads. Those prepared by IG showed a more homogeneous and compact internal structure. Textural studies showed that EG beads were harder due to the more rigid shell formed when the calcium migrated from the exterior of the droplets. The cohesiveness also confirmed a significant difference between the strength of the internal structure of the two beads, in agreement with the morphology observed. At higher calcium concentrations, hardness increased and the diameter of the beads decreased in both cases. The release of polyphenols fitted the *Peppas-Sahlin* model, and release was delayed at higher calcium concentration, especially for the IG beads.

Keywords: beads, external gelation, internal gelation, cocoa polyphenols, textural analysis.

1. Introduction.

The development of novel functional foods provides an opportunity to improve the quality of foods available to consumers and to benefit their health (**Lopez-Rubio, Gavara & Lagarón, 2006**). Functional food may be prepared by incorporating capsules to deliver bioactive compounds (**Wichchukit, Oztop, McCarthy M.J. & McCarthy K.L., 2013**). The capsules are obtained by encapsulation techniques in order to protect the active compound from moisture and heat, and also to enhance stability and maintain properties as well as masking undesirable odors or tastes (**Arshady, 1993; Gibbs, Kermasha, Alli & Mulligan., 1999; Fang & Bhandari, 2010; de Vos, Faas, Spasojevic & Sikkema, 2010; Patel & Velikov, 2011**). Hydrogels are used to encapsulate bioactive compounds due to their bio-similarity, aqueous interior and porous structure. Alginate is a nontoxic, versatile and economical hydrogel. The name generally refers to a family of polyanionic copolymers derived from marine kelp (**Liu H., Wang, Gao, Liu X. & Tong, 2008; Hambleton, Debeaufort, Bonnotte & Volleiy, 2009; Goh, Heng & Chan, 2012**). The most attractive property of alginate is the gel formation induced by the addition of various divalent cations (**Draget, Skjåk-Bræk & Smidsrød, 1997; Liu, Qian, Shu & Tong, 2003**). For alginate gelation, the encapsulation technique most widely used is the extrusion method, which consists of dropping an aqueous solution of polymer and active principle into a gelling bath of CaCl_2 (**Chan, Lee, Ravindra & Poncelet, 2009**). This method can be used with a simple dripping tool like a pipette or syringe, as well as more complex tools (**Zuidam & Nedovic, 2010**). Another less common technique is emulsification/gelation, which involves the dispersion of one liquid in another, with alginate and active compound solved together in the dispersed phase. Thus, when ionic induced gelation occurs, alginate forms the polymeric matrix trapping the active component inside. The addition of an emulsifier favors the formation and stability of the emulsion (**Poncelet, 2001; de Vos, Faas, Spasojevic & Sikkema, 2010**). The capsules or beads of gelled alginate can be prepared by ionic gelation, which may occur externally or internally. A source of Ca^{+2} is used in both cases. In external gelation the Ca^{+2} ions diffuse from an external source into the alginate solution at neutral pH. In contrast, in internal gelation an insoluble calcium salt is already present inside the droplets before gelation occurs, and Ca^{+2} is released by

acidification of the medium (Ribeiro, Silva, Ferreira & Veiga, 2005; Silva, Ribeiro, Figueiredo, Gonçalves & Veiga, 2006; Funami et al., 2009).

Cocoa extract is rich in polyphenols, and has been studied due to its antioxidant properties (Schinella et al., 2010). This natural extract is also used as an active ingredient, which can be incorporated into food in order to make it functional. However, this may alter the color and flavor of foods due the content of flavonoids, which produce astringency and bitterness. Encapsulation can mask these effects (Champagne & Fustier, 2007; Deladino, Anbinder, Navarro & Martino, 2008; Li et al., 2012). Together with flavor, appearance and texture are the main sensory factors that determine food acceptability to consumers (Pons & Fiszman, 1996). Texture profile analysis (TPA), an instrumental method introduced by Szczesniak, Brandt & Friedman (1963), has been used to describe the mechanical textural properties of foods, which can be calculated from the TPA curve obtained by a texturometer or similar instrument. The textural properties of alginate/cocoa beads are required for formulating bioactive capsules in order to identify their desirable characteristics for incorporation in food products (van den Berg, van Vliet, van der Linden, van Boekel & van de Velde, 2007; Foo, Liang & Easa, 2013).

In this study, we prepared alginate/cocoa beads by external and internal gelation mechanisms with the extrusion method. The influence of calcium and cocoa extract concentration and the type of gelation on the morphological characteristics, size and texture of beads was studied by statistical analysis. Our aim was to identify the most suitable formulation of alginate/cocoa beads as bioactive capsules to be incorporated in a food product. Additionally, we also performed kinetic studies of the release profile of the polyphenols (active principle) from the beads (polymeric matrix). For this purpose, we examined various delivery kinetics models to identify the best kinetic release profile of the active compound expressed as total polyphenol content over time.

2. Materials & methods.

2.1. Materials.

Sodium alginate was supplied by Panreac. Calcium chloride (96%) and calcium citrate tetrahydrate (99%), Folin-Ciocalteau reagent and Gallic acid were supplied by Aldrich. Glacial acetic acid and sodium hydroxide (6 M) were supplied by Panreac.

Refined sunflower oil was supplied by Southern-Coosur oils; S.A. Neutral gelatin powder was purchased from Kraft Foods, Portugal. The cocoa extract with high polyphenol content was kindly provided by the Faculty of Pharmacy of the University of Barcelona (Spain). Deionized Milli-Q water was used in all experiments.

2.2. Preparation of alginate/cocoa beads.

Two aqueous solutions with 2% w/w of sodium alginate and 1% or 3% w/w of cocoa extract as active principle were prepared and stirred until complete dissolution with an Ultra Turrax device (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Germany) at 10 000 rpm, followed by sonication with an Ultrasonic homogenizer (Sonoplus Bendelin Electronic GmbH & Co.K.G, Model HD2070, Germany) equipped with titanium probe, 20 kHz frequency, 21W power for 20 min. These solutions were stored for 24 hours under refrigeration at 5 °C and protected from light, to ensure complete hydration and deaeration. Finally, when internal gelation was used the pH was adjusted to 6.7 - 6.9 by adding a solution of NaOH at 6 M under continuous stirring, using a pH/ISE measuring instrument (Schott® Instruments, SI Analytics GmbH, Model ProLab 3000, Germany), to avoid premature liberation of calcium ions due to the low natural pH of cocoa extract.

2.2.1. Beads prepared by external gelation.

In order to prepare alginate/cocoa beads by external gelation with several proportions of cocoa extract and calcium, 20 ml of solution with alginate 2%/cocoa was dropped using a syringe without a needle for 5 min under manual control (50 ml BD Plastipak-2 mm internal diameter tube) into 80 ml of a second solution containing several proportions of CaCl₂, and stirred moderately. The beads formed immediately and were left in the original solution for 15 min to ensure internal gelification. The spheres were then filtered with a stainless steel strainer spoon prepared for spherifications, and washed in water. Some beads were set aside for examination of their internal structure, others were measured for size, and others were used for analysis of their mechanical properties.

2.2.2. Beads prepared by internal gelation.

In order to form alginate/cocoa beads by internal gelation with several proportions of cocoa extract and calcium, 20 ml of solution with alginate 2%/cocoa were mixed with a calcium citrate suspension until homogenization and dropped using a syringe without a needle for 5 min under manual control (50 ml BD Plastipak-2 mm internal diameter tube) into 40 ml of sunflower oil containing 80 μ l of acetic acid previously solved to induce gelation. The beads formed were maintained in the gelling oil bath for 15 min to ensure internal gelification. These spheres were then treated and examined as described above. Table 1 shows all bead compositions.

2.3. Characterization of alginate/cocoa beads.

2.3.1. Determination of size and morphology.

Samples of 15 alginate/cocoa beads obtained from each formulation and type of gelation were taken at random and measured with a digital caliper (Topcraft GT-DC-02) in order to record their diameters. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) and were analyzed using a Statgraphics Plus (Version 5.1 Statistical Graphics Corporation, Rockville, USA, 2000). Statistical comparisons were made using the Student *t* test with a level of significance set for $p < 0.05$.

In addition, a pair of beads from each formulation and type of gelation mechanism were reserved for SEM analysis using a Quanta 200 microscope (FEI, Co. USA), in order to ascertain their morphology. Previously, these beads had been frozen in liquid nitrogen and freeze dried using a LyoQuest-55 (Telstar Life Science Solutions, Spain) at -51 °C, 0.1 mbar and at -0.2 °C on a heating plate for 18 hours. Next, beads were attached to stubs using adhesive tape and coated with 40 nm of gold by sputtering in a Jeol JFC-100. Finally, the beads were examined using an acceleration voltage from 7.0-20 kV with an Everhard-Thomley detector (ETD).

2.3.2. Determination of mechanical properties.

The texture of beads was analyzed in a HAAKE RS300 rheometer on the basis of the measurement of normal force (*F*) and following the Texture Profile Analysis (TPA) proposed by **Deladino, Anbinder, Navarro & Martino (2008)** with some modification

according to the instrument employed. All TPA were performed on a glass Petri dish (100 mm diameter x 15 mm high) filled with beads for each formulation and gelation technique, using a 35 mm flat titanium parallel-plate with a low compression speed of 0.025 mm/s accorded to **Wang, Cowen, Zhang & Thomas (2005)**. From the TPA curves the mechanical textural parameters (hardness, cohesiveness and elasticity) were always measured, while other properties (Gumminess and Chewiness) were calculated. To study the influence of the gelling mechanism and the composition of beads on their texture, the mechanical properties were compared within the samples by applying a force with 17% deformation to prevent damage to the beads. Temperature was maintained at 5 ± 0.5 °C. In order to obtain representative results for the texture of beads, experiments were performed in triplicate and expressed as mean \pm standard deviation (SD). The analysis of variance (ANOVA) was calculated with Statgraphics Plus (Version 5.1 Statistical Graphics Corporation, Rockville, USA, 2000). Differences were considered significant where $p < 0.05$.

2.3.3. Release kinetics study.

In order to study the release of polyphenols from the beads, alginate/cocoa beads were prepared for each type of gelation mechanism as described above, and identified for each formulation as shown in Table 1. 20 ml of alginate 2%/cocoa solution was dropped using a syringe without a needle for 5 min under manual control into 100, 150, 200, 250 and 300 ml of aqueous solution with varying concentration of CaCl_2 . The beads formed were maintained in the gelling bath for 10 min under moderate stirring to ensure gelation, and then an aliquot was taken immediately according to the volume of the medium. Samples were then taken every 10 min for 1 hour, then after 4 hours and finally after 24 hours.

In addition, alginate/cocoa beads arising from internal gelation were prepared according to the formulations listed in Table 1. 20 ml of alginate 2%/cocoa was mixed with a calcium citrate suspension until complete homogenization and dropped using a syringe without a needle for 5 min under manual control (50 ml BD Plastipak-2 mm internal diameter tube) into 40 ml of sunflower oil containing 80 μl of acetic acid previously solved to induce gelation. When the beads had hardened in the oil phase for 10 min, they were washed quickly in water and suspended in 100, 150, 200, 250 and 300 ml of aqueous solution containing CaCl_2 (0.001 M). All samples were

subjected to continuous moderate stirring (IKA Model RCT Basic), and then an aliquot was taken immediately according to the volume of the medium. Samples were taken at the time intervals reported above. All aliquots were analyzed by performing the total phenolic assay described below. All samples were protected from light until analysis. The solution used as medium release was taken as the blank for all measurements. Results are expressed as the percentage of total polyphenol release over time.

2.3.3.1. Mathematical modeling of sustained release.

Several models were selected to evaluate the release kinetics of polyphenols from alginate beads. A simple, semi-empirical equation to describe drug release from polymeric systems is the Power law:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = kt^n \quad (1)$$

Here, M_t and M_{∞} are the absolute cumulative amount of active compound at time t and infinity, where k is a constant reflecting the design variables of the system, and n the value of the release exponent, which indicates information on whether the release mechanism is Fickian, non-Fickian or case II transport mechanism. The other model used (Eq. 2) was developed by Peppas and Sahlin, in line with the current utility of geometry-independent bi-exponential expression for determination of the contributions of Fickian diffusion, and "Case II transport" refers to the matrix relaxation/dissolution of highly soluble bioactive compound release (**Pillary & Fassihi, 2000; Siepmann & Peppas, 2012**).

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = k_1 t^n + k_2 t^{2n} \quad (2)$$

Where k_1 is the Fickian kinetic constant, k_2 is the relaxation/dissolution rate constant, and n is the value of the release exponent. All fitting models were performed by non-linear direct fitting and analyzed by the examination of the goodness of fit statistics such as the sum of squares due to error (SSE) and the adjusted R-square (R^2) by using a mathematical software (MatLab v.7.9.0, The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA) as an analysis tool.

2.4. Preparation of alginate/cocoa gels upon gelatin.

In order to study the influence of calcium concentration on the release of polyphenols from the alginate/cocoa gels, bulk gels were formed by preparing 2% w/w of sodium alginate solution with 3% w/w of cocoa extract and different concentrations of calcium citrate suspension by applying the internal gelation mechanism. Each sample was prepared in a plastic cylinder by placing 30 ml of neutral gelatin, which was prepared as stated on the instructions package, then refrigerated until complete gelation. Then above the neutral gelatin we placed 12 g of alginate 2%/cocoa 3% w/w solution previously mixed with the calcium citrate suspension at several proportions. Finally, on top of the mixture, we added 80 μ l of acetic acid to induce the internal gelation process. All samples were protected from light and kept refrigerated until analysis. Several samples with alginate 2%/cocoa 3% w/w gels at different calcium concentrations were prepared in order to measure the concentration of polyphenol release from the bulks gels to the gelatin gel over time. Then, the alginate/cocoa gel and the gelatin were separated and 1 mm of the interface between them was removed to avoid any interference. The gelatin was sliced to a thickness of 5 mm, then melted at 35 °C and analyzed by the total phenolic assay as indicated below, taking the gelatin without polyphenols as blank control to avoid any interference. Measurements were performed at 5, 16, 21 and 38 hours.

2.5. Light scattering measurements

The same procedure was followed as indicated above, preparation of alginate/cocoa gels upon gelatin, in a special tube for light scattering measurements. All samples were prepared at the same concentrations, but with half of the amount due the volume limitation of the tube. The polyphenol release upon gelatin from bulks gels formed with alginate 2%/cocoa 3% w/w at different calcium concentrations was studied by light scattering measurements using a vertical scan analyzer (Turbiscan Classic, Model MA2000, Iesmat, Spain). This equipment scans the sample along the tube where it is contained, giving a number of profiles of back scattering (%BS) and transmission as a function of time and tube length. From the profiles obtained we took mean values of %BS, considering a point 5 mm deep inside the gelatin as a

reference. Measurements were performed at 5, 16, 21 and 38 hours for all samples, which consisted of bulks gels with alginate 2%/cocoa 3% w/w of varying calcium citrate concentration.

2.6. Cocoa evaluation by total polyphenols assay.

The total phenolic content (TPC), also called total phenolic assay was analyzed by the spectrophotometric method of Folin-Ciocalteu following the procedure proposed by **Erkan, Ayranci G. & Ayranci E. (2008)** using Gallic acid as reference component (Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 20). To determine the amount of TPC we took an aliquot of the sample, added 12% v/v of sodium carbonate at 20% w/w of concentration, 4% v/v of the Folin reagent at 2 N and then completed with milliQ water until 10 ml. Finally, the mixture was stirred vigorously and allowed to stand for 1 hour at room temperature, then filtered through a syringe disc of 0.45 µm pore size. Finally, the absorbance at 765 nm was measured. This procedure was followed and applied in different sections of the study in order to assess the content of polyphenols for different cases. Firstly, in section above to determine the polyphenol release in the aqueous medium over time from the beads prepared with alginate 2%/cocoa according to the several formulations and types of gelling mechanisms. Secondly, in the previous section to determine the polyphenols diffused from bulks gels into the gelatins over time, which is expressed as mg of Gallic acid present in the volume of natural gelatin (ppm).

The percentage of polyphenols released was calculated as:

$$\%Polyphenols\ release = \frac{C_f}{C_0} \times 100 \quad (3)$$

where C_0 is mg of Gallic acid present in the initial volume of cocoa extract solution, and C_f is mg of Gallic acid released in the volume of aqueous medium solution. Measurements were performed at least in duplicate to express each value as the mean \pm SD.

3. Results and Discussion.

3.1. Bead size and morphology characterization.

The sodium alginate used for all beads preparations was previously characterized according to the average molecular weight and the ratio of mannuronic and guluronic acids (Lupo, Maestro, Pórras, Gutiérrez & González, 2014). The composition of different formulations used for the preparation of alginate beads with the encapsulated cocoa is listed in Table 1.

All beads prepared with alginate 2%/cocoa were spherical. Table 2 shows the mean length diameter of beads (d_i) for each formulation and gelation mechanism. Populations of alginate 2%/cocoa 1% w/w beads were compared in order to determine the influence of calcium concentration and the type of gelation on the sizes obtained. Calcium concentration did not influence the size of the EG beads, but had a significant effect on the size of IG beads, which were smaller at higher calcium concentration. Moreover, when populations E_1 and I_1 or E_2 and I_2 are compared, a significant difference is observed ($p < 0.05$) for each comparison, which indicates an influence of the type of gelation mechanism on the size of beads produced. Table 2 shows that the mean diameters of E_1 and E_2 are smaller than those of I_1 and I_2 , respectively. This can be attributed to the formation of a more rigid shell layer of gel, which compresses the matrix of the beads and therefore expels water when the beads are prepared by EG. This phenomenon, known as syneresis, is a general characteristic of gels, but our results show that it occurred to a lesser extent when IG was used. When EG is used, the rigid shell formed may not allow the entry of more calcium in the time fixed for the experiment and, therefore, the syneresis produced for both calcium concentrations is similar. On the other hand, as the calcium is already inside the droplets for IG, the change in concentration influences the syneresis effect, although this effect is lower than that observed for EG.

Populations of alginate 2%/ cocoa 3% w/w beads were also compared in order to determine the influence of calcium concentration and the type of gelation on the size of beads obtained when a greater concentration of cocoa extract was encapsulated. In contrast to the results reported above for 1% w/w cocoa, in this case calcium concentration did not influence the size of IG beads, but had a significant effect on the size of EG beads. This suggests that a higher concentration of cocoa extract (3% w/w) could mask the influence of calcium concentration on size due to the formation of a different internal structure given by the type of gelation used (Fig. 1). In other words, when a greater quantity of active compound is employed the internal interstices could be filled with more cocoa extract. Therefore, although syneresis

occurs during both gelation mechanisms, the EG beads were larger than those obtained with 1% w/w of cocoa extract due to the presence of a higher content of active principle (Table 2). Beside, when E₃ and I₃ or E₄ and I₄ were compared a significant difference was observed ($p < 0.05$) for each comparison, indicating a greater syneresis effect when EG was used, due to the stronger compression of beads by the rigid shell formed during EG.

In general, calcium concentration influenced the size of the beads; a decrease in the diameter of the alginate/cocoa beads was observed at the higher concentration of calcium, which was already reported by other authors (**Chang & Dobashi, 2003**). This finding can be attributed to a more cross-linked and compact gel, which consequently increase syneresis. However, the proportion of the active compound used for the preparation of beads could mask the influence of calcium concentration on the size of beads, depending on the gelation mechanism used. Therefore further studies would be required.

The internal structure of beads prepared with high calcium concentration (1.10^{-3} moles Ca²⁺/g alginate) by the two different gelling mechanisms is shown in Fig. 1. The SEM micrographs reveal large holes in those prepared by EG, (Fig. 1a and 1c). Beads obtained by IG show a more compact internal structure (Fig. 1b and 1d). The structure obtained by EG can be attributed to the initial formation of a gel layer on the surface of the droplet, which slows the inward diffusion of the calcium ions through the polymer. It yields a less homogeneous matrix due to a relatively low cross-linked core, with a deficit of calcium, and a highly cross-linked shell (**Zhao, Carvajal, Won & Harris, 2007; Chan, Lee & Heng, 2006**).

In contrast, the IG mechanism depends upon an internal calcium source. Diffusion of H⁺ from the surface to the core of the droplets through the gel is much faster than that of Ca²⁺, which leads to a more homogeneous matrix. When a higher concentration of cocoa extract was used, the internal structure of the bead appeared less porous (Fig. 1). This has been attributed to the filler occupying the interstitial spaces (**Chan et al., 2011**). The same behavior was observed when blank beads (without cocoa) were studied (Fig. 1e and 1f). This confirmed that the gelling mechanism determines the internal structure of alginate beads. Internal structure appeared to show the same pattern for each mechanism of gelation, irrespective of the concentration of calcium source (images not shown).

3.2. Mechanical properties of alginate/cocoa beads.

On the basis of TPA compression analysis, several mechanical textural parameters were calculated (Table 3). The hardness of alginate/cocoa beads prepared by IG showed significant difference ($p < 0.05$) when the concentration of calcium was changed in all cocoa extract concentrations used. Indeed, the variations of hardness values for beads obtained by IG increased from 0.224 to 0.956 N when the concentration of calcium was increased (I_1 , I_3 , I_2 and I_4). This suggests that when a higher calcium concentration was used a more cross-linked gel was formed, as expected. In contrast, calcium concentration did not appear to affect the mechanical properties of alginate/cocoa beads formed by EG ($p > 0.05$). This finding can be attributed to the process of calcium diffusion from the shell to the core of the polymer drop, as this diffusion is slowed down by the rigid cross-linking formed in the shell of the droplet, where the calcium ion is concentrated. Hardness values were similar for the range of calcium concentrations studied. Regarding the influence of the concentration of cocoa extract, no significant difference was found ($p > 0.05$) between groups with the same calcium concentration and type of gelling employed. On the other hand, when alginate/cocoa beads prepared by the two types of gelation mechanism were analyzed a significance difference ($p < 0.05$) for all formulations (I_1/E_1 ; I_2/E_2 ; I_3/E_3 and I_4/E_4) were observed (Table 3). This indicates that the values of hardness for beads formed by IG were clearly different to those formed by EG, despite the calcium and the cocoa extract concentration employed. In all, the values of hardness for beads prepared by EG were much higher (2.281 – 3.169 N) than those for beads formed by IG (0.224 – 0.956 N). This confirms the formation of a much more rigid layer on the surface of beads when EG was used, which provided a higher external hardness, although, as said above, the core of beads was less cross-linked. According to these results, the hardness of beads was affected mainly by the gelation mechanism and secondly by the concentration of calcium used, but only when IG was employed. The concentration of cocoa did not affect the hardness of beads.

Cohesiveness is another textural parameter obtained by TPA that is correlated with the strength of the internal bonds which make up the body of the product (Friedman, Whitney & Szczesniak, 1963). It was observed through the comparison within all formulations (Table 3) of the alginate/cocoa beads prepared by EG and

then within the beads produced by IG, that when different calcium and cocoa extract concentrations were used for the same type of gelation, the results showed no significant difference ($p > 0.05$). This suggested that the internal structure formed between the polymer matrix and the active compound of beads (strength of bonds) prepared by EG and those prepared by IG had a similar cohesiveness for each type of gelation, which appeared to be independent of calcium and cocoa concentration used in the range of study. However, when the values of cohesiveness of beads prepared with either gelation mechanism (E_1/I_1 ; E_2/I_2 ; E_3/I_3 and E_4/I_4) were compared, there was a significant difference ($p < 0.05$). This can be explained by the difference in morphology of the alginate/cocoa beads obtained, as shown previously in SEM photographs (Fig. 1) for each type of gelation. Besides, this difference in internal structure correlates with the values of cohesiveness obtained for IG beads, which were higher than those corresponding to the EG beads, due the greater homogeneity and compact structure observed for the former.

Furthermore, the attribute of elasticity was quantified for all cases analyzed. This can be interpreted as the degree of recovery of the sample when an external force is applied. Results show, in general, a slightly lower difference in values of recovery (0.792 - 0.800) for beads prepared by EG than those obtained by IG (0.792 - 0.828), which indicates that the beads formed by EG were more deformable, again due to the rigid shell formed. This textural property is also known as elasticity index, which is commonly correlated to the degree of sample relaxation with values between 0 and 1. Thus when a food product has high elasticity (close to unity), it is said to have a rubbery texture, while when the values of elasticity are low the texture is said to be brittle. In general, the values of elasticity seem to describe a rubbery texture for all the beads. So at 3% w/w of cocoa the recovery of the beads was not affected by the calcium concentration or the gelation mechanism, as shown by the lack of significant differences between groups ($p > 0.05$). This suggests that when a greater quantity of active compound is used the empty spaces in the polymer matrix are filled, which would affect the influence of other variables on the elasticity of the alginate/cocoa beads.

Results of gumminess show a significant difference ($p < 0.05$) when the two gelation mechanisms were compared for all compositions. Values of gumminess were higher for beads prepared by EG than those obtained by IG, which was as expected due to the large contribution of hardness to this attribute. However, the

slightly different cohesiveness values obtained indicate that the difference in gumminess values is related to the energy required to disintegrate the capsules (Pons & Fiszman, 1996; Szczesniak, 2002). Alginate/cocoa beads obtained by EG required much more energy (1.249 - 1.842 N) than those prepared by IG (0.207 - 0.634 N).

From the sensory viewpoint, in order to incorporate capsules into food it is important to consider the hardness and gumminess of the beads, which may be harder or softer depending on the texture required.

3.3. Sustained release and mathematical modeling.

Mathematical modeling of polyphenol release from alginate beads with 1% and 3% w/w of cocoa obtained by external and internal gelation was performed using the models presented in Eq. 1 and 2. The release of polyphenols from the beads was studied as described above at several dilutions of beads for each system. Table 4 shows the values of the parameters obtained for the Peppas fitting model with the different formulation of alginate/cocoa beads and for various dilutions. The highest R^2 values (ranging from 0.91 to 0.95) and the lowest SSE (ranging from 0.002 to 0.015) were obtained from the Peppas-Sahlin model, meaning that the best release pattern can be analyzed by this model despite the differences in bead formulations and the gelation types used. This suggests that the active compound dominates the release from the polymer matrix.

The Peppas-Sahlin equation provides information on the nature of polyphenol diffusion. The fact that k_1 is higher than k_2 indicates that Fickian diffusion makes the predominant contribution to polyphenol release (Spizzirri et al., 2013). On the other hand, the kinetic exponent ($n < 0.43$) describes pseudo-Fickian diffusion behavior, which has been associated with the presence of pores in the polymer matrix, and the consequent simultaneous diffusion through the swollen matrix and through the pores filled with the dissolution medium. This behavior is known as relaxation/dissolution. The presence of a negative rate constant (k_2) is the consequence of an anomaly in the swelling or relaxation of the polymeric matrix that slows the release of the active compound, as described by other authors (Siepmann & Peppas, 2012). The values of the kinetic parameters were quite similar for both gelation mechanisms. The

Peppas-Sahlin model thus fits the release profile of polyphenols from alginate/cocoa beads.

Figure 2 shows the effect of calcium concentration on the release of polyphenols from the alginate 2%/cocoa 3% w/w beads prepared by EG and IG. The Figure 2b shows a clear delay in the release of the active compound when the highest calcium concentration was used for both gelation mechanisms, due to a more cross-linked gel. In Figure 2a this effect may be masked by the low amount of solution: in this case the polyphenols released are present in the solution at higher concentration, and they may prevent the exit of more active principle molecules. The influence of calcium concentration on the polyphenol release profile is not clear.

3.4. Influence of calcium on the release of polyphenols.

Further studies were conducted to evaluate the influence of the concentration of calcium on the release of the active compound. Figure 3 shows the evolution over time of the polyphenol concentration in gelatin, where polyphenols are released from bulk gels prepared as indicated in the corresponding section. Results show lower quantities of polyphenols in gelatin when alginate 2%/cocoa 3% w/w bulk gels were prepared with the highest calcium concentration ($1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2} /g alginate). This confirms that an increase in calcium concentration delays polyphenol release, as was already observed in the studies of release profile.

Figure 4 shows the mean values of backscattering results at 5 mm of depth inside the gelatin. Results indicate that at 5 hours polyphenols had not yet reached this section of gelatin. After that, there was an abrupt decrease in %BS over time, approaching the value of alginate/cocoa, indicating that the cocoa had reached the measuring section in gelatin. Indeed, a continuous decrease in %BS was observed when the lowest concentration of calcium was used. For the highest calcium concentration, the %BS first decreased and subsequently remained essentially constant, indicating no major changes. Hence the amount of polyphenols present from 16 to 38 hours was similar. This information indicates that calcium concentration influences the release of polyphenols present in alginate/cocoa gels, and it is delayed by a high concentration of calcium.

4. Conclusions.

A marked influence of the type of gelation mechanism on the size of beads was observed for all formulations, which were smaller when EG was used due to the stronger syneresis effect. Moreover, higher calcium concentrations decreased the diameter of the alginate/cocoa beads, as a result of the more rigid layer formed in the shell of beads. This increased syneresis as more water was expelled from the beads due to greater contraction. The textural parameters showed that beads formed by EG were much harder than those prepared by IG, due to the more rigid shell formed when the calcium migrated from the exterior of the droplets. Values of cohesiveness also confirmed a significant difference between the strength of the internal structure of beads obtained with either gelation mechanism, in agreement with the morphology revealed by SEM. The cohesiveness values for the IG beads were higher than the values for EG beads, due to the greater homogeneity and compact structure observed for the former. Beads obtained by IG showed lower hardness and in consequence lower gumminess than beads prepared by EG, irrespective of the calcium and cocoa extract concentration used. This finding can be attributed to calcium diffusion from the shell to the core of the polymer drop in the case of the external gelation mechanism, which made the beads harder. On the other hand, in the alginate/cocoa beads obtained by internal gelation, the calcium ion is already inside the droplet before gelation, and the matrix formed is thus more homogeneous and softer on the surface.

The Peppas-Sahlin model fits the release profile of polyphenols for both IG and EG beads. Fitting parameters show a predominant diffusion mechanism of the active principle as well as an influence of the swelling or relaxation/dissolution of the polymer matrix that delays the passage of polyphenols. The effect of an increased amount of calcium on the preparation of the beads shows a delayed release for both mechanisms of gelation due to a more cross-linked gel. This finding was slightly more noticeable for beads prepared by IG due to the more homogeneous and compact internal structure obtained.

Acknowledgements

This study would not have been possible without the financial support from the Spanish Ministry for Science and Innovation (MICINN) within the framework of the project CYCYTCTQ2011-29336-C03-02. B. Lupo is grateful to Erasmus Mundus External Cooperation Window Lot19b for the grant received to perform the investigation.

References

- Arshady, R. (1993). Microcapsules for food. *Journal of Microencapsulation*, 10(4), 413-435.
- Chang, C.P. & Dobashi, T. (2003). Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32, 257-262.
- Chan, L.W., Lee, H.Y. & Heng, P.W.S. (2006). Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymer*, 63, 176-187.
- Chan, E.S., Lee, B.B., Ravindra, P. & Poncelet, D. (2009). Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), 63-72.
- Chan, E.S., Wong, S-L., Lee, P.P., Lee J-S, Ti, T-B., Zhang, Z., Poncelet, D., Ravindra, P., Phan, S-H. & Yim, Z-H. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymer*, 83(1), 225-232.
- Champagne, C.P. & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curren Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A.S. & Martino, M.N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymer*, 71, 126-134.
- de Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.

- Draget, K.I., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O. (1997). Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21(1-2),47-55.
- Erkan, N., Ayranci, G. & Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarius Officinalis L.*) extract, blackseed (*Nigella sativa L.*) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76-82.
- Fang, Z. & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 510-523.
- Foo, W-T., Liong, M-T. & Easa, A.M. (2013). Textural and structural breakdown properties of selected hydrocolloids gels. *Food Research International*, 52, 401-408.
- Friedman, H., Whitney, J. & Szczesniak, A. (1963). The texturometer a new instrument for object texture measurement. *Journal of Food Science*, 28, 390-396.
- Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I. & Phillips, G. O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1746-1755.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I. & Mulligan, C.N. (1999). Encapsulation in the Food Industry: a review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50, 213-224.
- Goh, C.H., Heng, P.W.S. & Chan, L.W.. (2012). Alginate as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymer*, 88(1), 1-12.
- Hambleton, A., Debeaufort, F., Bonnotte, A. & Volleiy, A. (2009). Influence of Alginate emulsion-based films structure on its barrier properties and on the protection of microencapsulated aroma compound. *Food Hydrocolloids*, 23, 2116-2124.
- Li, Y., Feng, Y., Zhu, S., Luo, C., Ma, J. & Zhong, F. (2012). The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(1), 17-23.
- Liu, X., Qian, K., Shu, T. & Tong, Z. (2003). Rheology Characterization of sol-gel transition in aqueous alginate solutions induced by calcium cations through in situ release. *Polymer*, 44, 407-412.

- Liu, H., Wang, C., Gao, Q., Liu, X. & Tong, Z. (2008). Fabrication of novel core-shell hybrid alginate hydrogels beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 351, 104-112.
- Lopez-Rubio, A., Gavara, R. & Lagarón, J.M. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 5567-5575.
- Lupo, B., Maestro, A., Pórras, M., Gutiérrez, J.M. & González, C. (2014). Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate Cocoa polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 38, 56-65.
- Patel, A.R. & Velikov, K.P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drugs delivery. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 1958-1964.
- Pillay, V. & Fassihi, R. (2000). A novel approach for constant rate delivery of highly soluble bioactives from a simple monolithic system. *Journal of Controlled Release*, 67(1), 67-78.
- Poncelet, D. (2001). Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. *Bioartificial Organs III: Tissue Sourcing, Immunoisolation, and Clinical Trials*, 944, 74-82.
- Pons, M. & Fiszman, S.M. (1996). Instrumental Texture Profile Analysis with particular reference to Gelled Systems. *Journal of Texture Studies*, 27, 597-624.
- Ribeiro, A.J., Silva, C., Ferreira, D. & Veiga, F. (2005). Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 25(1), 31-40.
- Schinella, G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., Pasamar, M.A., Mugerza, B., Ramón, D. & Ríos, J.L. (2010). Antioxidant properties of polyphenols-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*, 43,1614-1623.
- Siepmann, J. & Peppas, N.A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Review*, 64, 163-174.
- Silva, C.M., Ribeiro, A.J., Figueiredo, I.V., Gonçalves, A.R. & Veiga, F. (2006). Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 311(1-2), 1-10.
- Spizziri, U.G., Hampel, S., Cirillo, G., Nicoletta, F.P., Hassen, A., Vittorio, O., Picci, N. & Iemma, F. (2013). Spherical gelatin/CHTs hybrid microgels as electro-

- responsive drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 448, 115-122.
- Szczesniak, A.S., Brandt, M.A. & Friedman, H.H. (1963). Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objectives and the sensory methods of texture evaluation. *Journal of Food Science*, 28, 397-403.
- Szczesniak, A.S. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13, 215-225.
- van den Berg, L., van Vliet, T., van der Linden, E., van Boekel, M.A.J.S. & van de Velde, F. (2007). Breakdown properties and sensory perception of whey proteins/polysaccharide mixed gels as a function of microstructure. *Food Hydrocolloids*, 21(5-6), 961-976.
- Wang, C.X., Cowen, C., Zhang, Z. & Thomas, C.R. (2005). High-speed compression of single alginate microspheres. *Chemical Engineering Science*, 60, 6649-6657.
- Wichchukit, M.H., Oztop, M.H., McCarthy, M.J. & McCarthy, K.L. (2013). Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. *Food Hydrocolloids*, 33, 66-73.
- Zhao, Y., Carvajal, M.T., Won, Y-Y. & Harris, M. (2007). Preparation of Calcium Alginate Microgel Beads in an Electrodipersion Reactor Using an Internal Source of Calcium carbonate nanoparticles. *Lagmuir*, 23, 12489-12496.
- Zuidam, N.J. & Nedovic, V.A. (2010). Encapsulation technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. In: Zuidam NJ, Shimoni E, editors. Overview of Microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. Springer. p 16.18.

Table 1. Formulation of alginate/cocoa beads.

F_n	%Cocoa (w/w)	CaCl ₂ (M)	Calcium Citrate (M)	moles Ca ²⁺ / g alginate ($\cdot 10^{-3}$)
E ₁	1	0.002	-	0.4
E ₂	1	0.005	-	1.0
E ₃	3	0.002	-	0.4
E ₄	3	0.005	-	1.0
I ₁	1	-	0.05	0.4
I ₂	1	-	0.25	1.0
I ₃	3	-	0.05	0.4
I ₄	3	-	0.25	1.0

Formulation, F_n : External gelation, E; Internal gelation, I; Subscript 1 and 2 for 1% w/w and 3 and 4 for 3% w/w of cocoa extract encapsulated; Also subscript 1 and 3 are beads formed with $0.4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca²⁺/g alginate and 2 and 4 are beads formed with 1.10^{-3} moles Ca²⁺/g alginate.

Table 2. Mean length diameter of beads.

F_n	d_i (mm)	moles Ca ²⁺ / g alginate ($\cdot 10^{-3}$)
E ₁	3.65±0.36 ^a	0.4
E ₂	3.46±0.31 ^a	1.0
E ₃	4.03±0.48	0.4
E ₄	3.67±0.31	1.0
I ₁	4.42±0.30	0.4
I ₂	4.17±0.35	1.0
I ₃	4.37±0.36 ^b	0.4
I ₄	4.33±0.35 ^b	1.0

Formulation, F_n : External gelation, E; Internal gelation, I; Subscript 1 and 2 for 1% w/w and subscript 3 and 4 for 3% w/w of cocoa extract encapsulated; Also subscript 1 and 3 for low and 2 and 4 for high calcium concentration used to prepared beads, respectively. Mean length diameter, d_i (\pm standard deviation); the same letter (a, b) in the same group indicates $p > 0.05$.

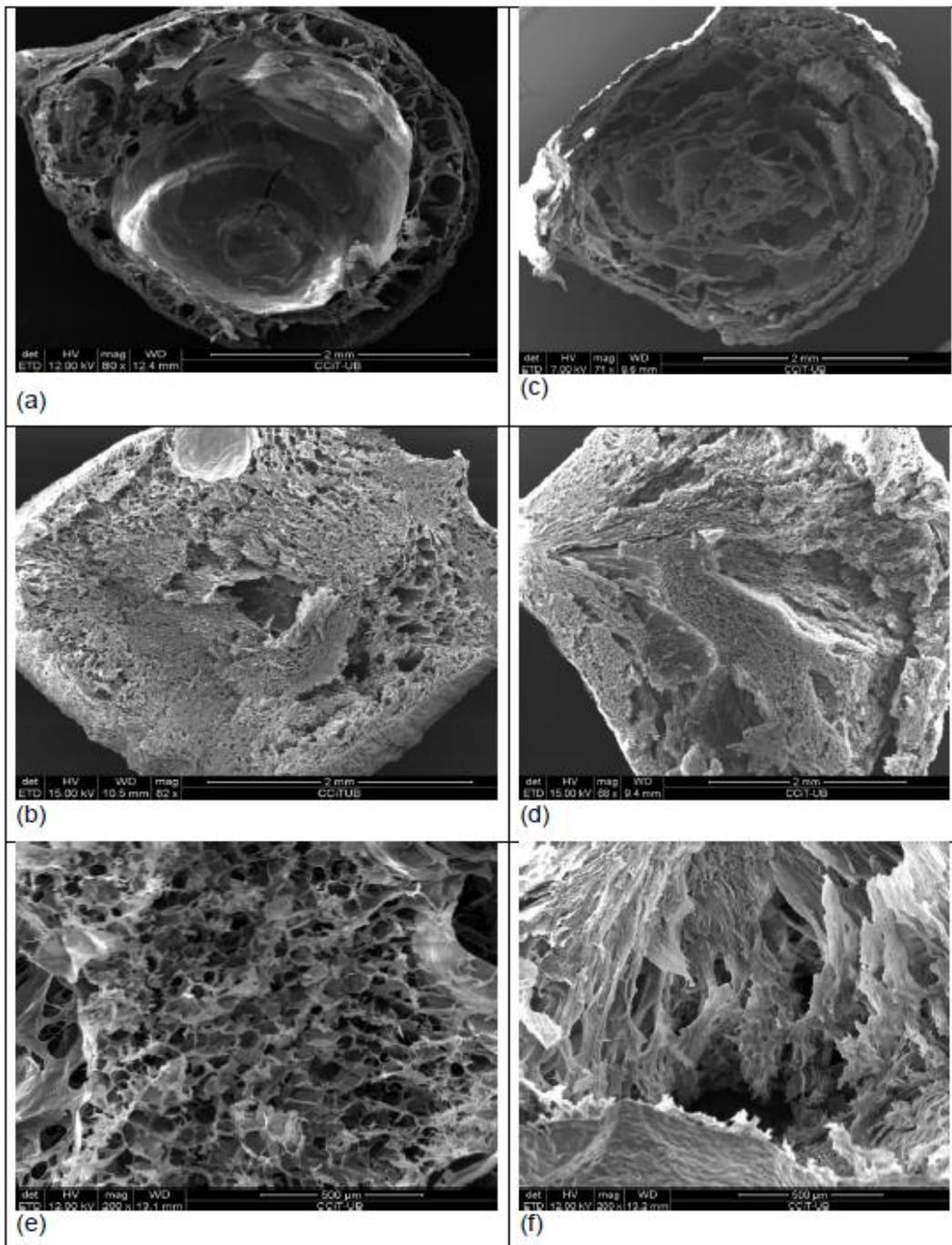


Figure 1. SEM Microphotographs of lyophilized beads at 1.10^{-3} moles Ca^{2+} /g alginate (high calcium concentration) (a) alginate/cocoa 1% w/w by EG; (b) alginate/cocoa 1% w/w by IG; (c) alginate/cocoa 3% w/w by EG and (d) alginate/cocoa 3% w/w by IG; (e) blank alginate by EG and (f) blank alginate by IG.

Tabla 3. Mechanical textural parameters of alginate/cocoa beads for different formulations and types of gelation mechanism.

Fn	Hardness (N)	Cohesivess	Elasticity	Gumminess (N)
E ₁	2.714±0.383 ^{ac}	0.507±0.026 ^{ad}	0.799±0.001 ^e	1.842±0.693 ^{ac}
E ₂	3.169±0.569 ^{ad}	0.475±0.013 ^{ae}	0.792±0.000 ^f	1.501±0.243 ^{ad}
E ₃	2.837±0.475 ^{bc}	0.480±0.015 ^{bd}	0.797±0.009 ^{ace}	1.495±0.375 ^{bc}
E ₄	2.281±0.244 ^{bd}	0.446±0.014 ^{be}	0.800±0.008 ^{adf}	1.249±0.573 ^{bd}
I ₁	0.224±0.029 ^e	0.654±0.064 ^{cf}	0.792±0.000 ^g	0.207±0.105 ^e
I ₂	0.956±0.040 ^f	0.662±0.054 ^{cg}	0.828±0.018 ^h	0.634±0.068 ^f
I ₃	0.467±0.167 ^e	0.584±0.031 ^{df}	0.820±0.018 ^{bcg}	0.329±0.144 ^e
I ₄	0.950±0.140 ^f	0.619±0.078 ^{dg}	0.810±0.020 ^{bdh}	0.347±0.170 ^f

Formulation, F_n; External gelation, E; Internal gelation, I; Subscript 1 and 2 for beads with 1% w/w and 3 and 4 for beads with 3% w/w of cocoa extract encapsulated; Also subscript 1 and 3 for low and 2 and 4 for high calcium concentration used to prepared beads, respectively; the same letter (a to h) in the same column indicates $p > 0.05$ between means (\pm standard deviation) for the attribute within the groups.

Table 4. Parameters and correlation coefficients for Power Law and Peppas-Sahlin models.

Beads-Cocoa Types	Model	k or k ₁ (min ⁻ⁿ)	k ₂ (min ⁻²ⁿ)	n	R ²	SSE
E ₁ /100-300	kt ⁿ	0.324±0.045	-	0.132±0.125	> 0.79	< 0.032
E ₂ /100-300		0.360±0.049	-	0.158±0.019	> 0.84	< 0.014
E ₃ /100-300		0.249±0.049	-	0.215±0.038	> 0.88	< 0.014
E ₄ /100-300		0.279±0.031	-	0.097±0.017	> 0.83	< 0.008
E ₁ /100-300	k ₁ t ⁿ + k ₂ t ⁻²ⁿ	0.275±0.042	(-)0.023±0.005	0.246±0.009	> 0.91	< 0.015
E ₂ /100-300		0.330±0.047	(-)0.034±0.006	0.214±0.011	> 0.91	< 0.008
E ₃ /100-300		0.247±0.039	(-)0.017±0.003	0.272±0.003	> 0.94	< 0.015
E ₄ /100-300		0.233±0.019	(-)0.024±0.002	0.215±0.006	> 0.90	< 0.005
I ₁ /100-300	kt ⁿ	0.418±0.072	-	0.117±0.028	> 0.82	< 0.021
I ₂ /100-300		0.337±0.077	-	0.141±0.035	> 0.84	< 0.028
I ₃ /100-300		0.336±0.081	-	0.100±0.025	> 0.87	< 0.005
I ₄ /100-300		0.269±0.014	-	0.127±0.007	> 0.81	< 0.013
I ₁ /100-300	k ₁ t ⁿ + k ₂ t ⁻²ⁿ	0.338±0.065	(-)0.031±0.012	0.238±0.018	> 0.93	< 0.008
I ₂ /100-300		0.297±0.094	(-)0.031±0.031	0.253±0.041	> 0.93	< 0.011
I ₃ /100-300		0.337±0.082	(-)0.042±0.020	0.190±0.012	> 0.95	< 0.002
I ₄ /100-300		0.233±0.014	(-)0.021±0.003	0.239±0.011	> 0.91	< 0.006

Formulation, F_n; External gelation, E; Internal gelation, I; Subscript 1 and 2 for beads with 1% w/w and 3 and 4 for beads with 3% w/w of cocoa extract encapsulated; Also subscript 1 and 3 for low and 2 and 4 for high calcium concentration used to prepared beads, respectively; The ration of absolute cumulative amount of active compound release at time t and infinite, M_t/M_∞; Volume of release solution from 100 to 300 ml, V; Kinetics constant which reflect the Fickian contribution, k or k₁; relaxation/dissolution rate constant, k₂; release exponent, n; regression coefficient, R²; sum of squares due to error, SSE; Means parameters (\pm standard deviation).

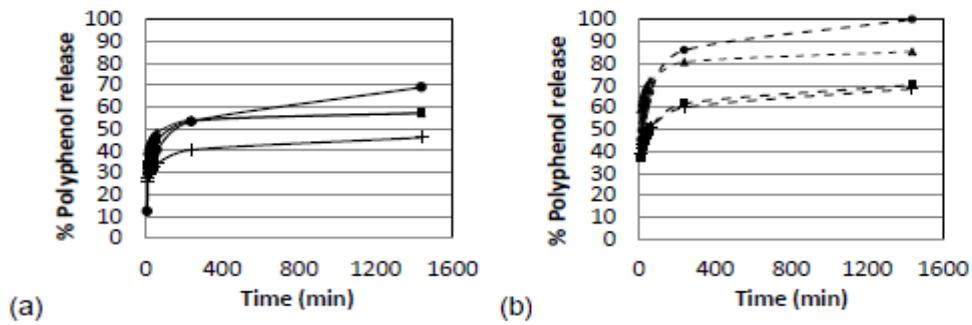


Figure 2. Polyphenols release from alginate 2%/cocoa 3% w/w beads. Adjustment data at *Peppas-Sahlin* model was represented in continuous line for 100 ml (a) and in dashed line for 300 ml (b) of solution. ▲ I₃; ■ I₄; ● E₃ and + E₄ for beads formed by internal gelation, I; external gelation, E; subscript 3 for beads prepared with $0.4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2} /g alginate and subscript 4 with $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2} /g alginate.

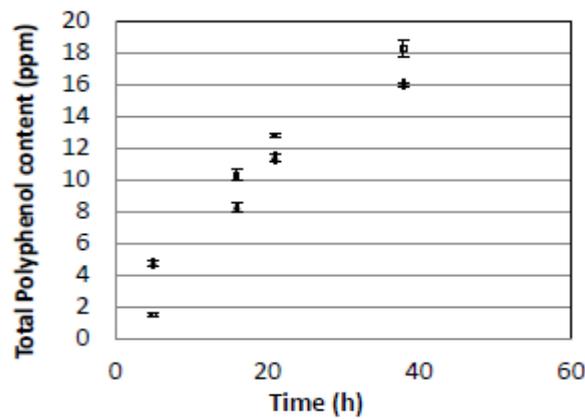


Figure 3. Effect of calcium concentration on the release of polyphenols from bulks gels. Alginate 2%/cocoa 3% w/w of cocoa extract encapsulated and prepared by IG with □ $0.4 \cdot 10^{-3}$, Δ $1 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{+2} /g alginate.

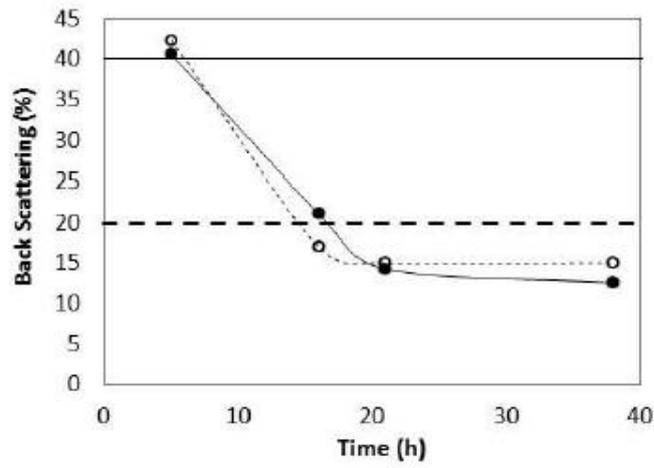


Figure 4. Effect on diffusion of polyphenols from alginate 2%/cocoa 3% w/w gels prepared by IG with ● $0.4 \cdot 10^{-3}$ moles Ca^{2+} /g alginate and ○ 1.10^{-3} moles Ca^{2+} /g alginate. Back Scattering (%BS) of Alginate/cocoa gels with dash line and %BS of gelatin with continuous line.