



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

Efecto de la gelificación iónica de alginato de sodio y gelana de alto acilo en microcápsulas adicionadas de iones calcio

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

**P R E S E N T A N**

**FERNANDA ANAHÍ TRUJANO MIRANDA  
JULIETA MARGARITA LOZANO COVARRUBIAS**

**Asesores:**

**DRA. ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS  
DR. JONATHAN CORIA HERNÁNDEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÉS FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
DEPARTAMENTO DE Exámenes Profesionales  
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

**Efecto de la gelificación iónica de alginato de sodio y gelana de alto acilo en microcápsulas adicionadas de iones calcio.**

Que presenta la pasante: **Julieta Margarita Lozano Covarrubias**  
Con número de cuenta: **310096249** para obtener el Título de la carrera: **Ingeniería en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de junio de 2019.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
<b>VOCAL</b>	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
<b>SECRETARIO</b>	I.A. Patricia Muñoz Aguilar	
<b>1er. SUPLENTE</b>	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
<b>2do. SUPLENTE</b>	I.A. Zaira Berenice Guadarrama Alvarez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Efecto de la gelificación iónica de alginato de sodio y gelana de alto acilo en microcápsulas adicionadas de iones calcio.

Que presenta la pasante: **Fernanda Anahí Trujano Miranda**  
Con número de cuenta: **413115326** para obtener el Título de la carrera: **Ingeniería en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de junio de 2019.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
<b>VOCAL</b>	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
<b>SECRETARIO</b>	I.A. Patricia Muñoz Aguilar	
<b>1er. SUPLENTE</b>	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
<b>2do. SUPLENTE</b>	I.A. Zaira Berenice Guadarrama Alvarez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

**Esta tesis forma parte de los proyectos del Taller Multidisciplinario de Ingeniería en Alimentos: Procesos Tecnológicos de Productos Cárnicos, Plan de estudio 2004 de la carrera de Ingeniería en Alimentos.**

**Se desarrolló en el Laboratorio 7 de Bioconservación en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4.**

**Agradezco al proyecto DGAPA-PAPIIT IT201917, “Estudio *in vitro* de nuevos probióticos para nutrición animal” por el apoyo para la realización de este trabajo de tesis.**

**Recibió apoyo del proyecto PIAPI 1840. “Procesos tecnológicos para la conservación y bioconservación de carne y productos cárnicos”**

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco a la UNAM y a la FES Cuautitlán por haberme abierto sus puertas para estudiar mi carrera y ser la casa de estudios que me permitió obtener los conocimientos necesarios para desarrollarme profesionalmente; así como todos los docentes que también hicieron posible mi crecimiento tanto profesional como personal.

Agradezco a mi asesora de Tesis la Dra. Adriana Llorente por todo el apoyo y paciencia durante este proceso, por todo el conocimiento y sabiduría brindados y por ser el camino y rienda que nos ayudó a concluir este trabajo. Así como también el apoyo del Dr. Jonathan Coria, ya que ambos nos dieron las herramientas necesarias para realizar este proyecto.

Agradezco a Julieta por compartir este trabajo conmigo, por ser mi compañera y amiga incondicional.

Y finalmente, pero no menos importante, agradezco infinitamente todo el apoyo y motivación de mi familia, principalmente a mi abuelito Miguel Ángel por ser el sustento y mano firme que me enseñó que la nobleza y caridad siempre se tienen que llevar en el corazón y a mi mamá que siempre estuvo como soporte ayudándome a no caer, teniendo siempre una palabra de cariño y apoyándome a levantarme en mis tropiezos.

Fernanda Anahí Trujano Miranda

Este trabajo de investigación se lo dedico a mis padres Julieta y Osvaldo por su amor, apoyo y sacrificios que me han permitido llegar hasta aquí, por enseñarme que puedo lograr todo lo que me proponga y siempre han buscado mi superación profesional, sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

Agradezco a la doctora Llorente que durante todo el proceso de este proyecto estuvo acompañándonos, brindándonos su apoyo, conocimientos y alentándonos a continuar para poder concluir esta etapa. Gracias infinitas, sin ese apoyo y alicientes no podríamos estar aquí.

Al doctor Jonathan por compartir sus conocimientos, brindándonos su apoyo durante todo el proceso en el área de reología y tratamiento estadístico.

A Fer por acompañarme durante gran parte de mi etapa universitaria como amiga y más aún durante el desarrollo de este proyecto, que después de tanto esfuerzo podemos concluir juntas esta etapa de nuestra vida académica que nos permitirá crecer profesionalmente.

Finalmente agradezco a todas las personas que me han alentado a seguir adelante, a no rendirme y buscar mi crecimiento profesional.

Julieta Margarita Lozano Covarrubias

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE CUADROS .....</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>7</b>
1.1. <i>Microencapsulación.....</i>	7
1.1.1 Usos y aplicaciones .....	7
1.1.2 Técnicas de microencapsulación .....	8
1.1.3 Clasificación.....	8
1.1.4 Agentes encapsulantes.....	9
1.1.4.1 Alginato de sodio .....	9
1.1.4.2 Gelana de alto acilo .....	11
1.1.4.3 Gelificación iónica .....	12
1.1.4.4. Aplicación de sistemas microencapsulados por gelificación iónica .....	12
1.1.5 Probióticos microencapsulados .....	13
1.1.6 Usos y aplicaciones de los probióticos en la salud .....	13
1.1.6.1. Viabilidad .....	15
1.1.7 Sustancias crioprotectoras.....	15
1.1.8 Liofilización .....	16
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>ESQUEMA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>CAPITULO 2. DESARROLLO DEL SISTEMA DE MICROCÁPSULAS CON ALGINATO DE SODIO Y GELANA DE ALTO ACILO.....</b>	<b>19</b>
2.1. <i>Actividades preliminares.....</i>	19
2.1.1 Preparación de solución de CaCl <sub>2</sub> .....	19
2.1.2 Preparación de dispersión de AS y GAA .....	20
2.1.3 Preparación de dispersión de AS y GAA con crioprotector (10%) ...	20
2.1.4 Elección de las condiciones de extrusión de las microcápsulas. ....	21
2.1.5 Preparación de dispersión de alginato de sodio y gelana de alto acilo .....	22
22	22
.....	22
2.1.6 Caracterización reológica de dispersión AS y GAA al 1% en concentraciones 75/25 respectivamente. ....	23
2.2. <i>Desarrollo de microcápsulas .....</i>	23
2.2.1 Extrusión de microcápsulas de AS y GAA .....	23
2.2.2 Evaluación de la estabilidad del gel mediante el análisis de las propiedades mecánicas.....	24
2.2.3 Evaluación del tamaño de las microcápsulas .....	24
2.2.4 Extrusión de microcápsulas adicionadas con crioprotector .....	25

2.2.5 Liofilización de microcápsulas.....	25
2.2.6 Evaluación por MEB .....	26
<b>CAPITULO 3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. <i>Caracterización reológica</i> .....	27
3.2. <i>Número de microcápsulas</i> .....	29
3.3. <i>Diámetro de microcápsulas</i> .....	31
3.4. <i>Prueba de compresión simple</i> .....	33
3.5. <i>Observación al MEB de microcápsulas liofilizadas</i> .....	43
3.5.1 <i>Morfología de las microcápsulas por MEB</i> .....	45
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>49</b>
BIBLIOGRAFÍA.....	51

#### ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1. Ventajas y desventajas de microencapsulación mediante extrusión</b> .....	9
<b>Cuadro 2. Caracterización reológica dispersión AS/GAA</b> .....	27
<b>Cuadro 3. Número de microcápsulas obtenidas de 1 mL de dispersión de AS y GAA (1%) a diferentes distancias de extrusión</b> .....	29
<b>Cuadro 4. Número de microcápsulas obtenidas de 1 mL de dispersión de AS y GAA (1%) con 10% de crioprotector a diferentes distancias de extrusión</b> .	30
<b>Cuadro 5. Diámetro de microcápsulas de AS y GAA (1%) a diferentes distancias de extrusión</b> .....	31
<b>Cuadro 6. Diámetro de microcápsulas de AS y GAA (1%) con 10% de crioprotector a diferentes distancias de extrusión</b> .....	32
<b>Cuadro 7. Datos obtenidos de la prueba de compresión simple para microcápsulas de AS y GAA (1%)</b> .....	33
<b>Cuadro 8. Datos obtenidos de la prueba de compresión simple para microcápsulas de AS y GAA al 1% liofilizadas</b> .....	34
<b>Cuadro 9. Datos obtenidos de la prueba de compresión simple para microcápsulas de AS y GAA (1%) con 10% de crioprotector</b> .....	36
<b>Cuadro 10. Datos obtenidos de la prueba de compresión simple para microcápsulas de AS y GAA al 1% con 10% de crioprotector y liofilizadas</b> ..	37
<b>Cuadro 11. Medidas de microcápsulas de AS y GAA (1%) liofilizadas a diferentes distancias de extrusión sin crioprotector y con 10% de este</b> ....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Distribución por bloques de los monómeros constituyentes del alginato</i>	10
<i>Figura 2. Proceso de gelificación en presencia de iones calcio modelo de gelificación "caja de huevo".....</i>	11
<i>Figura 3. Estructura química de la gelana de alto acilo.....</i>	12
<i>Figura 4. Esquema de investigación .....</i>	18
<i>Figura 5. Preparación de la solución de CaCl<sub>2</sub> (100mL).....</i>	19
<i>Figura 6. Dispersión de GAA (10 mL) .....</i>	20
<i>Figura 7. Preparación de dispersión de AS y GAA (1%) con 10% de leche descremada como crioprotector.....</i>	21
<i>Figura 8. Extrusión de microcápsulas con jeringa y micropipeta.....</i>	21
<i>Figura 9. Preparación de dispersión de GAA (1%).....</i>	22
<i>Figura 10. Baño de ultrasonido Cole-Parmer™ 8891.....</i>	22
<i>Figura 11. Viscosímetro de cilindros concéntricos .....</i>	23
<i>Figura 12. Extrusión de microcápsulas a diferentes distancias de la boquilla al baño .....</i>	23
<i>Figura 13. Texturómetro Brookfield.....</i>	24
<i>Figura 14. Medición de microcápsulas con vernier .....</i>	24
<i>Figura 15. Extrusión de microcápsulas adicionadas con crioprotector.....</i>	25
<i>Figura 16. Liofilización de microcápsulas.....</i>	25
<i>Figura 18. Microcápsulas cubiertas de oro.....</i>	26
<i>Figura 17. Ionizadora de oro Desk V.....</i>	26
<i>Figura 19. Caracterización reológica de dispersión de AS/ GAA al 1% .....</i>	28
<i>Figura 20. Caracterización Reológica, gráfica de viscosidad aparente.....</i>	29
<i>Figura 21. Gráfica de interacción para el número de microcápsulas.....</i>	30
<i>Figura 22. Gráfica de interacción para el tamaño de las microcápsulas .....</i>	32
<i>Figura 23. Prueba de compresión simple para microcápsulas de AS y GAA (1%) a diferentes distancias de extrusión (2.5, 5 y 7 cm) sin crioprotector.....</i>	35
<i>Figura 24. Prueba de compresión simple de microcápsulas de AS y GAA al 1%, a diferentes distancias de extrusión (2.5, 5 y 7 cm) con 10% de crioprotector.....</i>	38
<i>Figura 25. Gráfica de interacción para fuerza adhesiva .....</i>	40
<i>Figura 26. Gráfica de interacción para resiliencia .....</i>	41
<i>Figura 27. Gráfica de interacción para cantidad de fracturas.....</i>	42
<i>Figura 28. Gráfica de interacción para fracturabilidad.....</i>	43
<i>Figura 29. Imágenes de MEB (a,b,c) microcápsulas de AS y GAA liofilizadas (43X) (d,e,f) microcápsulas de AS y GAA liofilizadas con 10% de crioprotector (43X) ...</i>	44
<i>Figura 30. Imágenes de microcápsulas MEB 43 X.....</i>	47
<i>Figura 31. Imágenes de microcápsulas MEB 1,500 X.....</i>	48

## RESUMEN

En el campo alimentario se ha empleado la técnica de microencapsulación para superar algunos obstáculos a los que se ha enfrentado la adición de probióticos, como la resistencia de estos al medio que los rodea (temperatura, acidez o alcalinidad y humedad) durante el proceso de elaboración de los productos a los que se adicionan y también las condiciones de tracto gastrointestinal, ya que su estructura le permite controlar su interacción con el exterior, promoviendo un aumento en la vida del compuesto encapsulado y su liberación gradual. En esta investigación se utilizaron biopolímeros como agentes encapsulantes (alginato de sodio y gelana de alto acilo al 1%) con la finalidad de estudiar el proceso de gelificación iónica, variando las condiciones que la afectan, como la adición de iones calcio (leche descremada (10%)) y la distancia de la boquilla al baño (2.5, 5 y 10 cm). Se utilizó el método de extrusión con un baño de gelificación de  $\text{CaCl}_2$  al 0.5M para el desarrollo del sistema, con el fin de establecer las condiciones que proporcionaran el sistema más estable para su posible uso en microencapsulación de probióticos. A las microcápsulas se les determinaron las características mecánicas de fracturabilidad, cantidad de fracturas, fuerza adhesiva y resiliencia utilizando un texturómetro Brookfield y se determinó su diámetro con un Vernier. Las microcápsulas extruidas se sometieron a ultracongelación a  $-50^\circ\text{C}$  (REVCO Ultima II) durante 24 horas y se liofilizaron durante 24 h (Freezone 4.5 Labconco), tras lo cual fueron cubiertas con oro y observadas (morfología y dimensiones) por Microscopía electrónica de barrido (MEB). Las mejores características como menor número de fracturas y morfología con una superficie más homogénea, fueron obtenidas con la dispersión de alginato de sodio y gelana de alto acilo al 1% en concentraciones 75/25, adicionada de leche como fuente de iones calcio (10%), sometidas al proceso de liofilización y extruidas a una distancia de 2.5cm. Estos resultados indican características favorables para el sistema y mayor estabilidad en comparación con los otros niveles de variación y condiciones de extrusión.

Palabras clave: Microencapsulación, gelificación iónica, alginato de sodio, gelana de alto acilo, extrusión, liofilización.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad las nuevas tendencias en la industria alimentaria se han enfocado a la producción de alimentos reestructurados y funcionales, adicionados de ingredientes, probióticos y de compuestos activos tales como vitaminas, aminoácidos, enzimas, los cuales confieren mejores características a los alimentos y beneficios a la salud. Para que estos ingredientes, probióticos y compuestos activos, cumplan su función, deben resistir las condiciones del medio que los rodea (como la temperatura, la acidez o alcalinidad y la humedad) durante el proceso de elaboración de los productos a los que se adicionan y también las condiciones de tracto gastrointestinal que implican pH de alrededor de 2 y de más de 8 (Ponce, *et al.*, 2003; Parra, 2010). Es por ello, que se han empleado diferentes técnicas para superar estos obstáculos, entre las cuales destaca la microencapsulación, esta se fundamenta en la formación de una matriz polimérica, la cual forma un ambiente capaz de controlar su interacción con el exterior, promoviendo un aumento en la vida del compuesto encapsulado y su liberación gradual (Lupo, *et al.*, 2012; Nazarro, *et al.*, 2012).

Los geles de alginato generalmente se forman de manera espontánea a temperatura ambiente ( $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Durante la polimerización en presencia de iones calcio, sufre cambios conformacionales, dando lugar al modelo de gelificación “caja de huevo”. En el caso de la goma gelana, obtura los poros o fugas que presentan las microcápsulas y normalmente se preparan por calentamiento y enfriamiento. Y en conjunto se ha encontrado que son polímeros complementarios (Sanderson, 1994) por lo cual se emplearán para el desarrollo del sistema de microcápsulas en una relación del 75% y 25% respectivamente, de acuerdo con lo reportado por González, C.R.E., Pérez, M. J., & Morón, A.L.B. (2015).

En el presente trabajo se estudió el proceso de gelificación iónica, se emplearon como polisacáridos, el alginato de sodio y la goma gelana de alto acilo en el desarrollo del sistema, variando las condiciones que afectan la gelificación, con la adición de 10% de leche descremada y el efecto de la distancia de la boquilla al baño durante la extrusión de la mezcla de polímeros. Una vez formado el sistema

de microcápsulas, se sometieron a ultracongelación y liofilización, para así comparar el efecto en la morfología y dimensiones de las microcápsulas, mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Con base en los resultados presentados en la medición del tamaño de las microcápsulas (vernier), análisis de las propiedades mecánicas (texturómetro) y de sus dimensiones físicas (MEB), se eligió la distancia que, durante la extrusión, presentó las mejores características para el desarrollo del sistema más estable para su posible uso en microencapsulación de probióticos.

La adición de probióticos a los alimentos presenta como principal problema su baja supervivencia durante el procesado, almacenamiento, comercialización e incluso después de su consumo, debido a las condiciones gastrointestinales; la microencapsulación ha sido empleada con la finalidad de retardar la interacción de estos con el medio que los rodea al inmovilizar las bacterias en matrices de polisacáridos polimerizadas por medio de la gelificación iónica. Debido a las condiciones a las que están expuestos los probióticos, en el presente trabajo se desarrolló un sistema de microcápsulas mediante el método de extrusión, variando la distancia de la boquilla al baño, con el fin de elegir aquella que proporcione las mejores características morfológicas para la microencapsulación de probióticos, adicionados de un crioprotector y sometidas a liofilización para aumentar su supervivencia durante su uso como probiótico.

## **CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1. Microencapsulación**

La microencapsulación es definida como la tecnología de empaquetamiento de sólidos, líquidos y gaseosos con materiales de recubrimiento de distinta naturaleza, para dar lugar a cápsulas de tamaño micrométrico que pueden liberar su contenido de manera controlada bajo la influencia de condiciones específicas y que sirve como barrera para retardar las reacciones químicas con el medio que lo rodea promoviendo un aumento en la vida útil del producto y facilitando su manipulación al modificar el estado físico del compuesto activo.

Los productos resultantes de este proceso son denominados micropartículas, microcápsulas o microesferas, las cuales consisten en una membrana semipermeable, delgada, fuerte, que puede ser esférica o irregular y rodea un núcleo. El núcleo que compone la microcápsula es también denominado fase interna o principio activo, así como la membrana se puede nombrar capa externa o matriz. Su tamaño y forma son características variables que dependen del material encapsulante y de la técnica empleada para su obtención. (Lupo, et al.,2012 & Pérez, et al.,2013).

#### **1.1.1 Usos y aplicaciones**

En la industria de alimentos se ha utilizado la microencapsulación de probióticos, sabores, vitaminas o aceites esenciales. La protección de estos compuestos activos 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 el caso de los probióticos protege y mejora su biodisponibilidad tanto en los productos alimentarios como en el tracto gastrointestinal. Los probióticos constituyen uno de los subgrupos más destacados dentro de los alimentos funcionales. Son productos que contienen microorganismos definidos y viables en grado suficiente para modificar la microbiota del huésped, ejerciendo así un efecto benéfico sobre la salud de éste.

En este sentido, si se considera que, entre las propiedades sensoriales, el sabor y el aroma son los más importantes, se ha encontrado que esta técnica ha sido empleada por la industria de alimentos para enmascarar sabores amargos o astringentes de componentes específicos o para su protección, ya que al degradarse estos cambian su sabor u olor original (Lupo, et al., 2012 & Sanz, 2003).

### **1.1.2 Técnicas de microencapsulación**

Para la preparación de las microcápsulas existen numerosos métodos y la selección de este para encapsular depende de los costos, el tamaño de la cápsula, las propiedades físicas y químicas de los materiales, la aplicación y el mecanismo de liberación deseado (Pérez, et al, 2013).

### **1.1.3 Clasificación**

Los métodos de mayor aplicación en la industria de alimentos corresponden y se clasifican en:

Métodos físicos: secado por aspersion, liofilización, recubrimiento por lecho fluidizado, extrusión, coextrusión, extrusión-fusión, co-cristalización.

Métodos fisicoquímicos: Coalescencia, inclusión molecular, encapsulación por liposomas (Pérez, et al, 2013).

#### **Extrusión**

Este método consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulado forzando el paso de una solución a través de una aguja de jeringa o de una boquilla en los dispositivos generadores de goteo. De esta manera, los microorganismos son adicionados a una solución hidrocoloide, cuya suspensión se hace gotear sobre una solución de endurecimiento, la cual va a variar en dependencia del material empleado.

El tamaño de las cápsulas obtenidas va a depender del diámetro de salida de la solución. Es una técnica ampliamente utilizada para la encapsulación de probióticos, aunque presenta algunas desventajas que se pueden observar en el Cuadro 1 (Pérez, et al, 2013).

**Cuadro 1. Ventajas y desventajas de microencapsulación mediante extrusión**

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Proceso simple y barato	Forma diámetros de partículas de larga distribución (2-5mm)
El material encapsulado es completamente cubierto y protegido	Difícil de producir a gran escala por lenta formación de microcápsulas
Se emplean operaciones gentiles que minimizan las lesiones de las células	Microcápsulas pobremente cargadas (8%)
Supervivencia de microorganismos entre 80-95%	Susceptibilidad de los carbohidratos hacia daños y defectos estructurales
No emplea disolventes perjudiciales para las bacterias	Limitada la selección del material de pared

#### **1.1.4 Agentes encapsulantes**

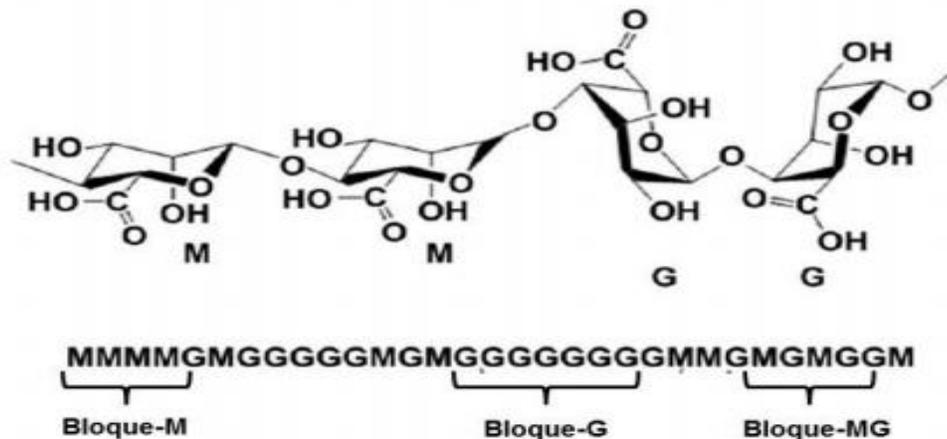
La industria de alimentos busca ingredientes que, al ser adicionados a un alimento, prolonguen su vida útil y reduzcan la tasa de cambios que el producto alimenticio podría experimentar durante su almacenamiento, transporte y manipulación (Avendaño, 2013).

Los materiales más comúnmente usados para encapsular células probióticas son: alginato, gomas gelana y xantana, carragenato, oftalato, acetato de celulosa, quitosano, almidón, gelatina y proteínas de la leche (Bringas. M.A., & Pino, J. A., 2012).

##### **1.1.4.1 Alginato de sodio**

Los alginatos, han adquirido gran importancia en los últimos años. Éstos tienen la capacidad de actuar como agentes estabilizantes, gelificantes, espesantes y formadores de películas. Además, son fáciles de obtener a partir de algas marinas que se encuentran en todos los mares del mundo y tienen relativamente bajo costo (Avendaño, 2013).

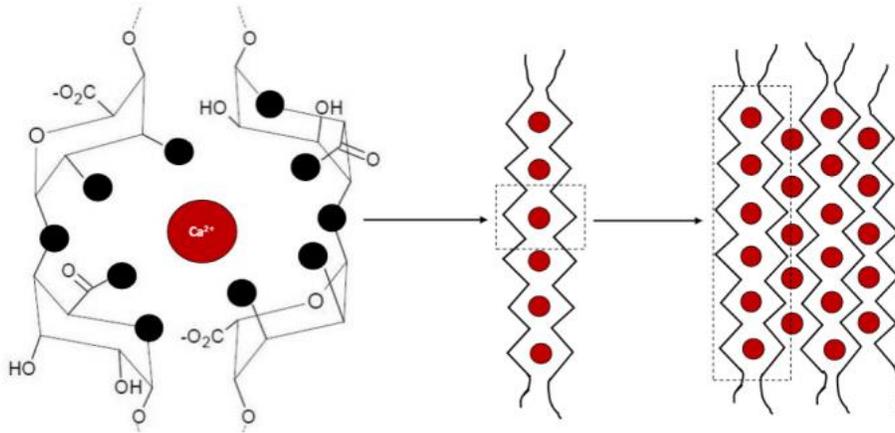
Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales, conteniendo cantidades variables de ácido  $\beta$ -D-manurónico y de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico. Su composición (dada por la relación característica manurónico/gulurónico M/G) y secuencias varían dependiendo de la fuente de la cual proviene el polisacárido. En su estructura se encuentran tres tipos de bloques (G, M y MG), los bloques G y M se constituyen por homopolímeros, en tanto que los bloques MG por heteropolímeros en donde los bloques M y G se alternan como se observa en la Figura 1.



**Figura 1. Distribución por bloques de los monómeros constituyentes del alginato**

**Fuente: Lupo, et al., 2012**

La composición y extensión de la secuencia y el peso molecular determinan las propiedades físicas de los alginatos, el proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes, 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 los grupos G de dos moléculas de alginato, formando una red tridimensional en cuyas cavidades se unen los iones calcio dando lugar al modelo de gelificación “caja de huevo”, además debe su carácter polianiónico, a los grupos carboxilo que aparecen a lo largo de la cadena como se muestra en la Figura 2 (Lupo, et al., 2012).



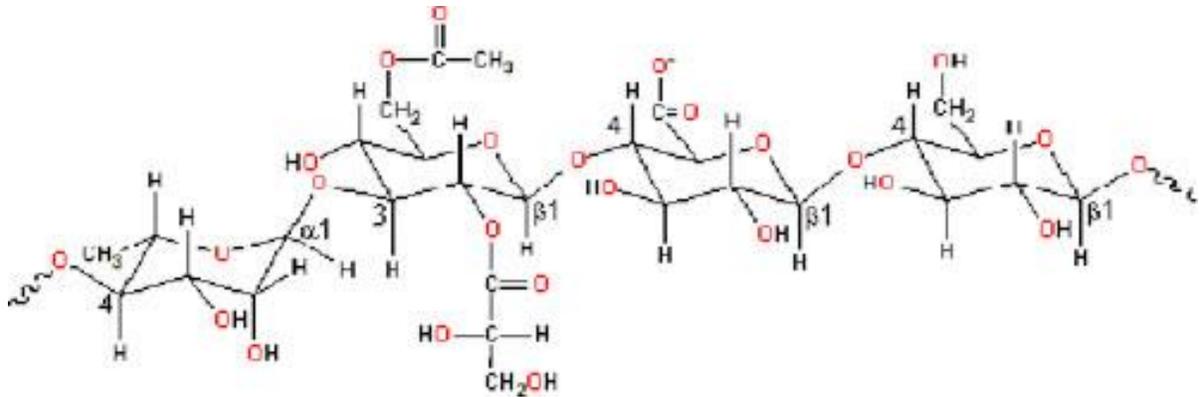
**Figura 2. Proceso de gelificación en presencia de iones calcio modelo de gelificación "caja de huevo"**

**Fuente: Lupo, et al., 2012**

Existen diferentes estudios que indican la seguridad del uso de los alginatos en los alimentos. Los alginatos de sodio, potasio, calcio y amonio, ácido alginico y el alginato de propilenglicol, son aditivos alimenticios reconocidos como inocuos y seguros, según la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) (FAO, 2001).

#### **1.1.4.2 Gelana de alto acilo**

La goma gelana es un polisacárido aniónico obtenido por fermentación microbiana de *Sphingomonas elodea*, que consiste de unidades de repetición de un tetrasacárido compuesto por 1,3-β-D-glucosa; 1,4-β-D-ácido glucurónico; 1,4 β-D glucosa y 1,4-α-L-ramnosa, como se muestra en la Figura 3. A bajas concentraciones, la goma gelana es capaz de modificar las características reológicas de algunos alimentos. Por consiguiente, es utilizada a nivel industrial. La gelana nativa es conocida como gelana de alto acilo (GAA) debido a que presenta un grupo acetato (C6) y uno glicerato (C2) en su residuo de glucosa-A y también puede formar geles en presencia de cationes (González, *et al.*, 2015).



**Figura 3. Estructura química de la gelana de alto acilo**

**Fuente: González, et al., 2015**

#### **1.1.4.3 Gelificación iónica**

El proceso de gelificación ocurre en presencia de iones divalentes, donde el ion calcio es el más empleado por la industria alimentaria, este proceso se desarrolló para inmovilizar células o compuestos activos, donde se utiliza principalmente alginato como componente de la membrana debido a su capacidad gelificante, se sabe que la 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 las características de un gel. El grado de gelificación depende de la hidratación del alginato, la concentración del ion calcio y la proporción de ácido gulurónico (Funami, et al, 2009; Avendaño. 2013).

#### **1.1.4.4. Aplicación de sistemas microencapsulados por gelificación iónica**

Las nuevas tendencias tecnológicas se han enfocado a la producción de alimentos reestructurados y funcionales a partir de diversos compuestos activos e incluso pequeñas moléculas como células, enzimas y microorganismos probióticos beneficiosos para la salud siendo la microencapsulación una forma de proteger estos compuestos de las condiciones del medio y así aumentar su funcionalidad.

Se ha encontrado el uso de microcápsulas de alginato en larvicultura y actualmente se informa de una aplicación novedosa en la producción de microalgas como *Dunaliella bardawil* y *Chlorella sp* entre otras, como método efectivo para el cultivo con alta densidad celular, lográndose densidades hasta cinco veces mayor que en cultivo libre (Pedroza, 2002).

### **1.1.5 Probióticos microencapsulados**

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) han sido importantes en los alimentos por siglos por su considerable contribución al valor de los productos. Debido a varias de sus propiedades metabólicas, las BAL desempeñan un papel importante en la industria alimentaria, por su contribución al sabor, olor, textura, características sensoriales y valor nutricional de los productos alimentarios. Los principales probióticos son las bacterias integrantes de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, constituyen la microbiota del tracto gastrointestinal del humano, y han sido, tradicionalmente, utilizadas en diversas fermentaciones alimentarias. También existen otros géneros como *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Parra,2010 & Sanz, 2003).

### **1.1.6 Usos y aplicaciones de los probióticos en la salud**

En la actualidad, todavía se desconocen muchos aspectos de los probióticos, relativos a sus mecanismos de acción; sin embargo, se reconoce su funcionalidad en: a) la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales de diversa etiología; b) la reducción de la intolerancia a la lactosa; c) la modulación de la respuesta inmunitaria, y d) la reducción de los valores de colesterol.

Las BAL comprenden un grupo diverso de bacterias Gram positivas, no formadores de esporas, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes, catalasa negativa (ausencia de citocromos), contienen un grupo hembra que les permite poner en marcha la cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones. Son cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de 0.5-0.8µm. Diferentes factores afectan el crecimiento de las BAL en un medio de fermentación. Además de los requerimientos nutricionales, la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las BAL, existe una temperatura

óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta y depende de las características de microorganismo y de cada género, algunos crecen a 25-30°C, otros se desarrollan mejor a 37°C (mesófilas) con un tiempo de incubación de 18-20 horas y termófilas con una temperatura ideal de incubación de 2-4 horas (Parra, 2010 & Ramírez, et al., 2011).

Los carbohidratos fermentables son utilizados como fuente de energía para formar principalmente ácido láctico. Degradan las hexosas a lactato (homofermentativas) o lactato y productos adicionales (acetato, etanol, CO<sub>2</sub>, formiato o succinato) (heterofermentativas) (Parra, 2010 & Savadogo, 2006).

En el grupo de las homofermentativas se encuentran algunos géneros como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y algunos *Lactobacillus* poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de glucosa utilizando la vía de la glucólisis (Embden-Meyerhof) .Por otra parte las del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentativos y convierten hexosas o pentosas por la vía de las Pentosa-Fosfato (6-fosfogluconato-fosfocetolasa), produciendo en el proceso además de ácido láctico , cantidades significantes de otros productos como etanol, acetato y CO<sub>2</sub>.

Las bacterias heterofermentativas transforman el ácido cítrico en productos aromatizantes como la acetoína y el diacetilo.

El ácido láctico, principal producto de la fermentación, tiene la denominación GRAS (generalmente reconocido como seguro) por la Food and Drug Administration del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA FDA por sus siglas en inglés) para su empleo como aditivo alimenticio.

La importancia de las BAL como probióticos, estriba en la producción de una serie de sustancias antimicrobianas, relacionadas con fenómenos de antagonismo importante, frente a otros microorganismos deteriorantes y patógenos de interés sanitario. Destaca la producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogeno, diacetilo, entre otras.

El peróxido de hidrógeno, producido por el grupo *Lactococcus* a través de la acción de NADH oxidasa la cual cataliza la oxidación del NADH. Bacteriocinas, componentes de origen proteico son producidos por BAL y se encuentran comúnmente presentes en alimentos con efectos bactericidas o bacteriostáticos.

#### **1.1.6.1. Viabilidad**

La propia definición de probiótico exige el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos que lo integran durante todo el periodo de vida útil del producto, ya que esto condiciona su efectividad; si bien ciertas propiedades inmunológicas también se han atribuido a bacterias no viables. Aunque todavía existe poca información sobre las dosis y la frecuencia de consumo necesaria para garantizar la efectividad de estos productos, en general, se considera necesario que diariamente entre  $10^9 - 10^{10}$  log UFC/mL o g organismos viables alcancen el intestino delgado. Por ello, se sugiere que estos productos mantengan unos valores de viables de  $10^6-10^7$  log UFC/mL o g (Sanz, 2003).

#### **1.1.7 Sustancias crioprotectoras**

Para conservar la viabilidad de los probióticos se deben considerar las condiciones adecuadas para lograr su supervivencia, para esto se utilizan las sustancias crioprotectoras.

En la microencapsulación de probióticos se necesita utilizar agentes protectores de los microorganismos probióticos como son los oligosacáridos tipo jarabe de maíz, sucralosa y maltodextrina, se utilizan también lípidos, como ácidos esteáricos, diglicéridos y aceites.

Estos aumentan su viabilidad durante el almacenamiento a bajas temperaturas y los protegen de los fluidos intestinales y gástricos.

En el caso de las proteínas como materiales encapsulantes o protectores se tiene: el gluten, caseína, albúmina y proteína de suero. Las proteínas de suero de leche son uno de los agentes más estudiados, por ser consideradas fuentes nutricionales versátiles, y efectivas en la protección del material biológico. Estas proteínas tienen propiedades fisicoquímicas que incluyen excelente solidificación, emulsión y

solubilidad, capacidad de unión a iones y un efecto tampón contra los ambientes ácidos, demostrando ser altamente eficientes en la encapsulación, protección y liberación de los probióticos en el intestino (De Araújo, et al., 2015).

### **1.1.8 Liofilización**

La liofilización se define como un proceso de estabilización en el cual el material primero se congela y se concentra el solvente, comúnmente el agua, reduciéndolo mediante sublimación y desorción, a niveles que no sostendrán más el crecimiento biológico o las reacciones químicas. Consta de tres fases: sobrecongelación, desecación primaria y desecación secundaria.

La liofilización es un proceso de conservación mediante sublimación utilizado con el fin de reducir las pérdidas de componentes volátiles o termo-sensibles. Es el más noble proceso de conservación de productos biológicos conocido, porque aúna los dos métodos más fiables de conservación, la congelación y la deshidratación. Sin conservantes o productos químicos, es el proceso más adecuado para preservar células, enzimas, vacunas, virus levaduras, sueros, derivados sanguíneos, algas, así como frutas, vegetales, carnes, peces y alimentos en general. En este proceso de secado los productos obtenidos no se ven alterados en sus propiedades y se rehidratan fácilmente.

La liofilización no altera la estructura físico-química del material, pero permite su conservación indefinida sin cadena de frío, con menos del 15% de humedad y alta estabilidad microbiológica (Ramírez, 2006).

## JUSTIFICACIÓN

El principal problema de adicionar probióticos a los productos alimentarios es su baja supervivencia durante el procesado, almacenaje e incluso en procesos posteriores como las condiciones gastrointestinales; la microencapsulación ha sido empleada con la finalidad de retardar la interacción de estos con el medio que los rodea al inmovilizar las bacterias en matrices de polisacáridos. Estas matrices son polimerizadas por medio de la gelificación iónica. Debido a las condiciones a las que están expuestos los probióticos, en el presente trabajo se desarrollará un sistema de microcápsulas mediante el método de extrusión, variando la distancia de la boquilla al baño, con el fin de elegir la que proporcione las mejores características morfológicas, siendo estas mayor esfericidad y una red estructural estable entre polisacáridos, iones calcio y crioprotector que serán evaluados mediante MEB, para la microencapsulación de BAL sometidas a liofilización para su posible uso como probiótico.

Los geles de alginato generalmente se forman en frío, sin recurrir al calentamiento y durante la polimerización en presencia de iones calcio, sufre cambios conformacionales, dando lugar al modelo de gelificación "caja de huevo". En el caso de la goma gelana, obtura los poros o fugas que presenten las microcápsulas y normalmente se preparan por calentamiento y enfriamiento. Y en conjunto se ha encontrado que son polímeros complementarios (Sanderson,1994), por lo cual se emplearán para el desarrollo del sistema de microcápsulas en una relación del 75% y 25% respectivamente.

## ESQUEMA DE INVESTIGACIÓN

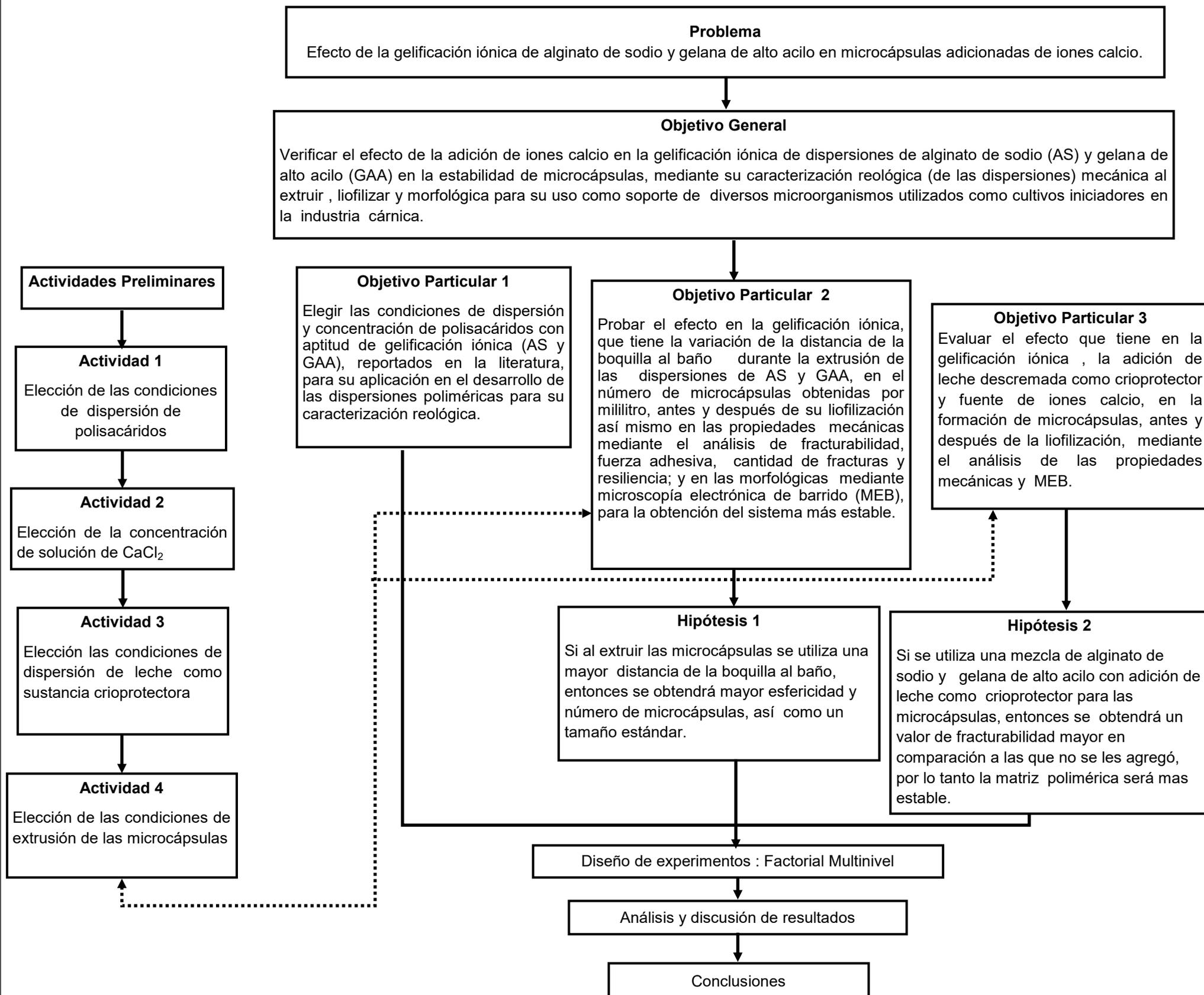


Figura 4 Esquema de investigación

## CAPITULO 2. DESARROLLO DEL SISTEMA DE MICROCÁPSULAS CON ALGINATO DE SODIO Y GELANA DE ALTO ACILO

### 2.1. Actividades preliminares

- ❖ Preparación de soluciones molares de cloruro de calcio para encontrar la apropiada para realizar la gelificación iónica
- ❖ Preparación de dispersiones de polisacáridos en diferentes combinaciones y concentraciones
- ❖ Caracterización reológica de estas dispersiones

#### 2.1.1 Preparación de solución de $\text{CaCl}_2$

Para determinar qué concentración era más adecuada para la gelificación iónica se realizaron las soluciones a dos diferentes concentraciones (0.05 M y 0.5M). Para la solución 0.05M se pesó en una balanza analítica 0.554g de  $\text{CaCl}_2$  y se dispersó con agua destilada mediante agitación magnética para posteriormente aforar a 100 mL. Así mismo para la solución 0.5M se pesó en una balanza analítica 5.54g de  $\text{CaCl}_2$  y se dispersó con agua destilada mediante agitación magnética para posteriormente aforar a 100 mL, como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5. Preparación de la solución de  $\text{CaCl}_2$  (100mL)**

Se utilizaron las soluciones de  $\text{CaCl}_2$  en la prueba de extrusión de microcápsulas y se observó que con la de 0.5M la gelificación se llevaba a cabo de manera más rápida.

### 2.1.2 Preparación de dispersión de AS y GAA

Se realizaron dispersiones a diferentes concentraciones de la combinación de alginato de sodio (AS) y gelana de alto acilo (GAA) (2%, 1%, 0.5%) en volúmenes de 10 mL (Figura 6) para la selección de la concentración final en base a su fluidez para la caracterización reológica.



**Figura 6. Dispersión de GAA (10 mL)**

Posteriormente con la elección de la concentración de 1% se prepararon 250 mL de soluciones *Stock* de cada dispersión a diferentes concentraciones de cada polímero (25/75, 50/50, 75/25). Finalmente se preparó la dispersión de alginato de sodio y gelana de alto acilo en una proporción 75-25% respectivamente.

### 2.1.3 Preparación de dispersión de AS y GAA con crioprotector (10%)

Tomando como referencia el comportamiento de la solución de  $\text{CaCl}_2$ , se identificó la información de la concentración de calcio indicado en la etiqueta de la leche en polvo descremada (Svelty™), así como las instrucciones de preparación, incluida en el envase de esta, en donde se menciona que para preparar 240 mL de leche se requiere de 230 mL de agua y 24 g del producto lácteo, se calculó la cantidad de polvo necesario para preparar una solución al 10% y se obtuvo que eran requeridos 0.31 g en 30 mL de solución líquida.

Como primer paso para hidratar la leche en polvo, se disolvieron los 0.31 g de producto en 5 mL de agua destilada y posteriormente se agregaron los 25 mL restantes de la disolución AS-GAA, ya que si se disolvía directo en la disolución la competencia por el agua entre el calcio y las gomas iba a ser mayor (Figura 7).



***Figura 7. Preparación de dispersión de AS y GAA (1%) con 10% de leche descremada como crioprotector***

#### **2.1.4 Elección de las condiciones de extrusión de las microcápsulas**

Se realizaron pruebas con dos diferentes instrumentos extrusores: jeringa y micropipeta con diferentes puntas, eligiendo finalmente la de 5mL. Se realizó la extrusión a 3 distintas distancias, del extrusor a la dispersión, para la selección de las condiciones de extrusión, que dieran como resultado un sistema más estable para poder realizar las pruebas de análisis de las propiedades mecánicas y morfológicas (Figura 8).

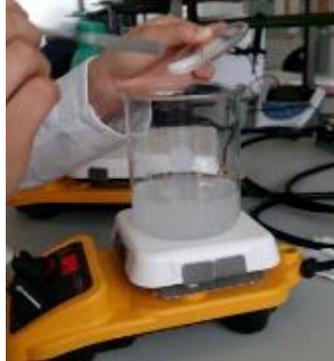


***Figura 8. Extrusión de microcápsulas con jeringa y micropipeta***

### **2.1.5 Preparación de dispersión de alginato de sodio y gelana de alto acilo**

Para la preparación de la dispersión de goma gelana se dispersó a temperatura ambiente ( $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) con agitación magnética y calentando hasta  $80^{\circ}\text{C}$  durante 30 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente,  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  (Figura 9).

En el agua restante del volumen final, se suspendió a temperatura ambiente



***Figura 9. Preparación de dispersión de GAA (1%)***

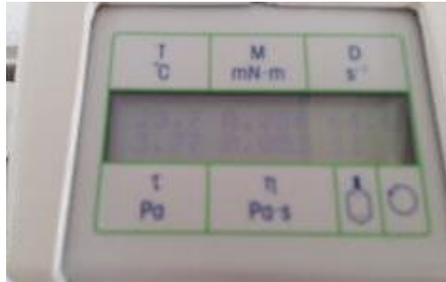
( $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) el alginato de sodio y se adiciono la dispersión de gelana de alto acilo (Casas, 2004). Esta mezcla se calentó a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 30 min para obtener una dispersión homogénea y posteriormente se utilizó un baño de ultrasonido (Cole-Parmer <sup>TM</sup> 8891) durante 15 minutos para degasificar y generar una dispersión homogénea (Figura 10).



***Figura 10. Baño de ultrasonido Cole-Parmer <sup>TM</sup> 8891***

### 2.1.6 Caracterización reológica de dispersión AS y GAA al 1% en concentraciones 75/25 respectivamente

Se utilizó un reómetro Rheomat RM180 de cilindros concéntricos (Figura 11) para la caracterización reológica de la dispersión con el sistema de medida 1, configurando la geometría 1,1, fecha de prueba y el programa 1. Se tomaron los datos de Esfuerzo de corte (Pa), Viscosidad aparente (Pa·s) y Velocidad de cizalla ( $s^{-1}$ ). La prueba se realizó por triplicado ( $T=22\pm 3^{\circ}C$ ).

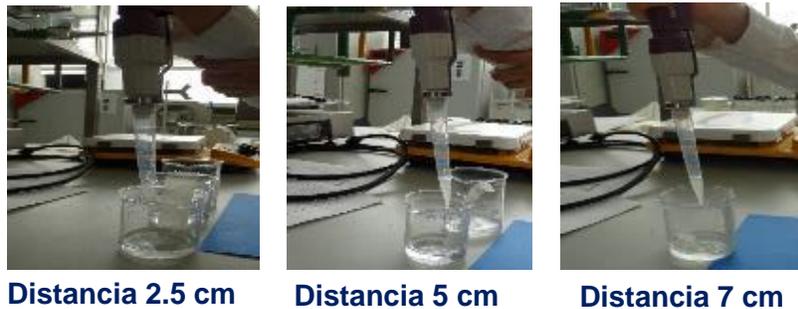


*Figura 11. Viscosímetro de cilindros concéntricos*

## 2.2. Desarrollo de microcápsulas

### 2.2.1 Extrusión de microcápsulas de AS y GAA

Metodología de Krasaekoopt, 2004 (Gallegos, 2015). Con una micropipeta de 1-5 mL se tomó 1 mL de la de la dispersión de alginato de sodio y gelana de alto acilo y se situó la boquilla a una distancia de 2.5 cm del baño para extruirla en 15 mL de una solución de  $CaCl_2$  al 0.5M, en donde se dejaron reposar las microcápsulas durante 30 minutos para su completa gelificación. Ya transcurrido este tiempo estas se recuperaron por decantación y se repitió el procedimiento con las distancias de 5 y 7 cm (Figura 12).



*Figura 12. Extrusión de microcápsulas a diferentes distancias de la boquilla al baño*

### **2.2.2 Evaluación de la estabilidad del gel mediante el análisis de las propiedades mecánicas**

Se determinaron las características mecánicas de fracturabilidad, cantidad de fracturas, fuerza adhesiva y resiliencia utilizando un texturómetro Brookfield CT3 (Figura 13), con una velocidad de 1 mm/s y 1 mm de compresión, por quintuplicado.



*Figura 13. Texturómetro Brookfield*

### **2.2.3 Evaluación del tamaño de las microcápsulas**

Con ayuda de un vernier se midió el diámetro de las microcápsulas por quintuplicado (Figura 14).



*Figura 14. Medición de microcápsulas con vernier*

#### **2.2.4 Extrusión de microcápsulas adicionadas con crioprotector**

Metodología de Krasaekoopt, 2004 (Gallegos, 2015). Con una micropipeta de 1-5 mL se tomó 1mL de la dispersión de alginato de sodio y gelana de alto acilo adicionada con 10% de crioprotector y se situó la boquilla a una distancia de 2.5 cm del baño para extruirla en 15 mL de una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 0.5M (Figura 15), en donde se dejaron reposar las microcápsulas durante 30 minutos para su completa gelificación. Ya transcurrido este tiempo estas se recuperaron por decantación y se repitió el procedimiento con las distancias de 5 y 7 cm.



***Figura 15. Extrusión de microcápsulas adicionadas con crioprotector***

#### **2.2.5 Liofilización de microcápsulas**

Se ultracongelaron los extruidos (REVCO Ultima II, Thermo electron Co.) (USA) a  $-50^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y se liofilizaron las microcápsulas (LABCONCO, Freezezone 4.5) (KC, USA) con una temperatura del condensador de  $-45^{\circ}\text{C}$  y una presión de 0.09 mBar durante 24 horas (Figura 16).



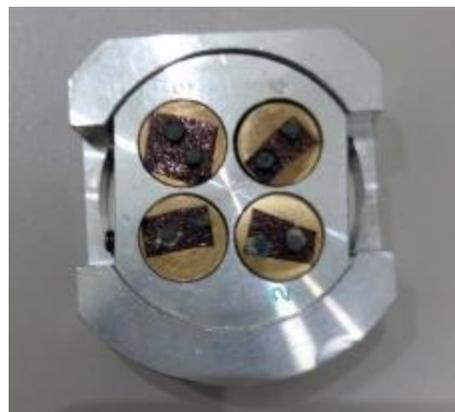
***Figura 16. Liofilización de microcápsulas***

### 2.2.6 Evaluación por MEB

Se fijaron y cubrieron las microcápsulas con oro durante 300 s a 7 mA utilizando una ionizadora de oro (Desk V, Denton Vacuum, USA) (Figuras 17 y 18) y se evaluaron las características morfológicas de las microcápsulas a diferentes aumentos (43x, 250x y 1500x) estableciendo las mediciones de sus ejes con un microscopio electrónico de barrido (Modelo JSM-6010LA, JEOL USA) a 10 kV.



*Figura 18. Ionizadora de oro Desk V*



*Figura 17. Microcápsulas cubiertas de oro*

## CAPITULO 3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 3.1. Caracterización reológica

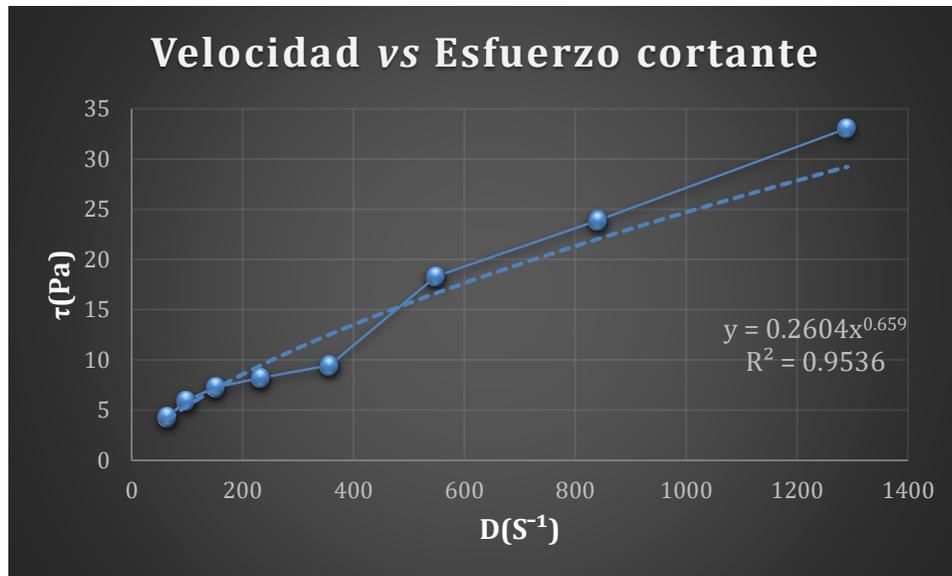
En el Cuadro 2 se presentan los resultados promedios de la caracterización reológica de las dispersiones de AS/GAA al 1% en una concentración 75/25 respectivamente, utilizando el reómetro de cilindros concéntricos Rheomat RM180.

**Cuadro 2. Caracterización reológica dispersión AS/GAA**

D (s <sup>-1</sup> )	T(Pa)	η(Pa·s)
64.6	4.237	0.069
99	5.937	0.065
152	7.220	0.050
233	8.237	0.035
357	9.490	0.028
549	18.347	0.021
841	23.920	0.016
1291	33.067	0.013
841	23.890	0.016
549	18.297	0.021
357	9.430	0.027
233	8.197	0.035
152	7.330	0.050
99	5.983	0.064
64.6	4.390	0.069

Cabe mencionar que debido a limitaciones por características reológicas de las otras concentraciones (25/75 y 50/50) no se pudo realizar la prueba en ellas, ya que su viscosidad no lo permitió.

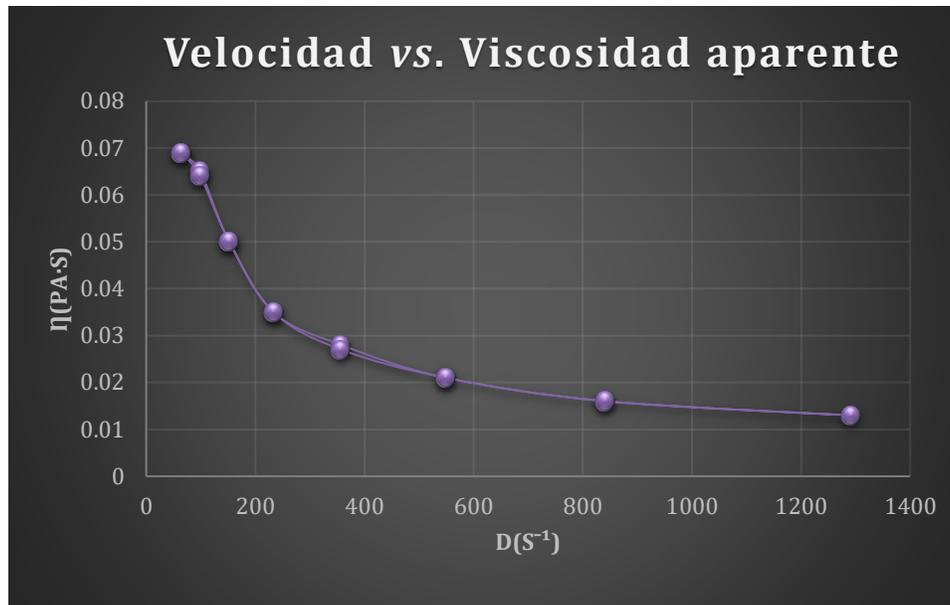
En la Figura 19 se presentan los resultados de la caracterización reológica de la dispersión 75/25. Esta caracterización se realizó por triplicado.



**Figura 19. Caracterización reológica de dispersión de AS/ GAA al 1%**

Posteriormente se determinó que se trata de un fluido del tipo Herschel Bulkley debido a que requiere un esfuerzo inicial de 4.237 Pa para poder fluir, un índice de consistencia  $k = 0.2604$  y su índice de comportamiento  $n = 0.659$ ., esto se realizó con el fin de conocer el comportamiento de la dispersión durante la extrusión de las microcápsulas.

Teniendo en cuenta que, al aumentar el gradiente de velocidad de cizalla aplicado sobre la dispersión su viscosidad aparente disminuye como se observa en la Figura 20, esto se debe de acuerdo a la formación y ruptura de interacciones entre las moléculas de los polímeros y a la separación de las mismas al aumentar este gradiente de velocidad.



**Figura 20. Caracterización Reológica, gráfica de viscosidad aparente**

### 3.2. Número de microcápsulas

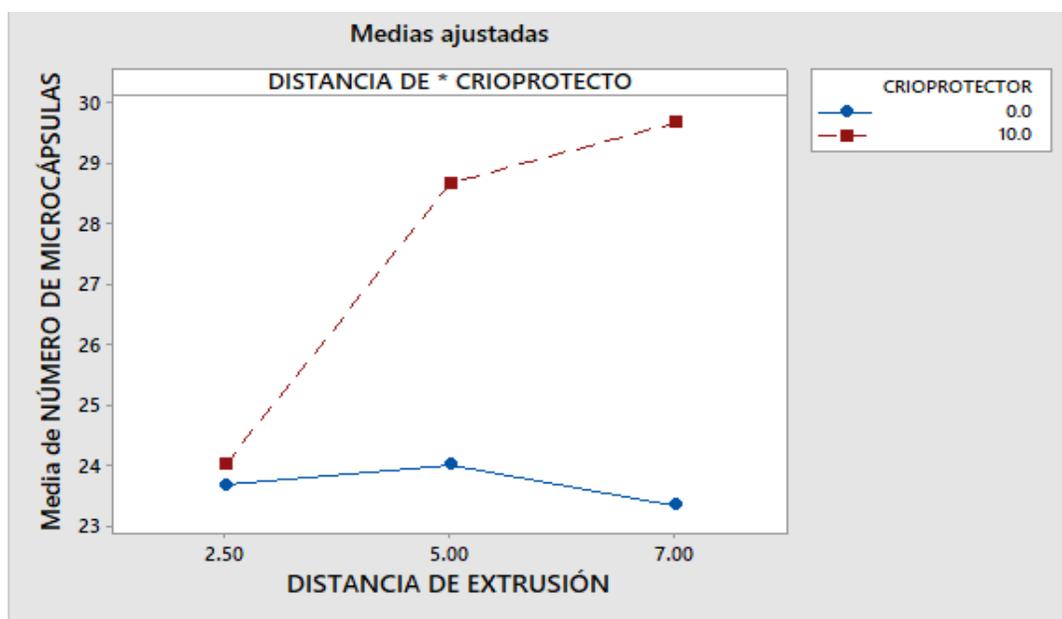
Los resultados de los Cuadros 3 y 4 se analizaron mediante un Diseño factorial de múltiples niveles con un 95% de confianza, mediante el cual se concluye que al utilizar diferentes distancias de extrusión o la adición de un crioprotector se tienen medias diferentes, lo que indica que estas son estadísticamente significativas ( $P_p < 0.05$ ).

**Cuadro 3. Número de microcápsulas obtenidas de 1 mL de dispersión de AS y GAA (1%) a diferentes distancias de extrusión**

Distancia 2.5 cm		Distancia 5 cm		Distancia 7cm	
No. de microcápsulas		No. de microcápsulas		No. de microcápsulas	
Promedio	23.6	Promedio	24	Promedio	23.3
Desv.	1.53	Desv.	1.00	Desv.	1.53

**Cuadro 4. Número de microcápsulas obtenidas de 1 mL de dispersión de AS y GAA (1%) con 10% de crioprotector a diferentes distancias de extrusión**

Distancia 2.5 cm		Distancia 5 cm		Distancia 7cm	
No. de microcápsulas		No. de microcápsulas		No. de microcápsulas	
Promedio	24	Promedio	29	Promedio	30
Desv.	0.00	Desv.	2.08	Desv.	0.58



**Figura 21. Gráfica de interacción para el número de microcápsulas**

En la Figura 21 se observa que para las microcápsulas sin crioprotector el aumento en la distancia de extrusión disminuye el número de microcápsulas, en el caso de las microcápsulas con 10% de crioprotector el aumento de la distancia de extrusión aumenta el número de microcápsulas, por lo tanto la relación entre la distancia de extrusión y el número de microcápsulas obtenidas, dependen del uso de un crioprotector.

Al utilizar una distancia de extrusión de 7 cm y crioprotector (leche descremada) al 10% se asocia con la obtención de un mayor número de microcápsulas, lo cual indica que en estas condiciones se tendrá el mayor efecto. Esto se atribuye a la formación de un gel más reticulado debido a la mayor cantidad de iones calcio disponibles tanto con la adición del crioprotector como en la solución de  $\text{CaCl}_2$  que permiten la formación de mayores puntos de gelificación formando una estructura

más compacta (Lupo, 2014) dando como resultado un mayor número de microcápsulas. Además de que, tanto las proteínas como los polisacáridos tienen enlaces covalentes sencillos entre los monómeros, lo que le permite a los biopolímeros rotar. Debido a esto y al hecho de que contienen un gran número de monómeros pueden formar un número enorme de configuraciones en solución (Andrews, 2017).

A su vez los biopolímeros tienden a adoptar una conformación que minimiza su energía libre bajo condiciones ambientales. Esto lo logra maximizando el número de interacciones intermoleculares e intramoleculares, minimizando el número de interacciones desfavorables y maximizando su entropía (Andrews, 2017).

También se observa en la Figura 21 que en la distancia 2.5 cm de extrusión el comportamiento es muy similar en ambos casos (10% y 0% de crioprotector), esto se atribuye a que adicionalmente hay que considerar otros aspectos que influyen en la forma, tamaño y a su vez número de microcápsulas, como lo son el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución que induce la gelificación, siendo esta última más difícil de romperse a menor distancia de extrusión (Lupo, 2014).

### 3.3. Diámetro de microcápsulas

Los resultados de los Cuadros 5 y 6 se analizaron mediante un Diseño factorial de múltiples niveles, al utilizar diferentes distancias de extrusión se demostró que esta variación es estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en su efecto en el diámetro de las microcápsulas.

En el caso de la interacción entre la distancia de extrusión y el uso de un crioprotector se concluye que es estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 5. Diámetro de microcápsulas de AS y GAA (1%) a diferentes distancias de extrusión**

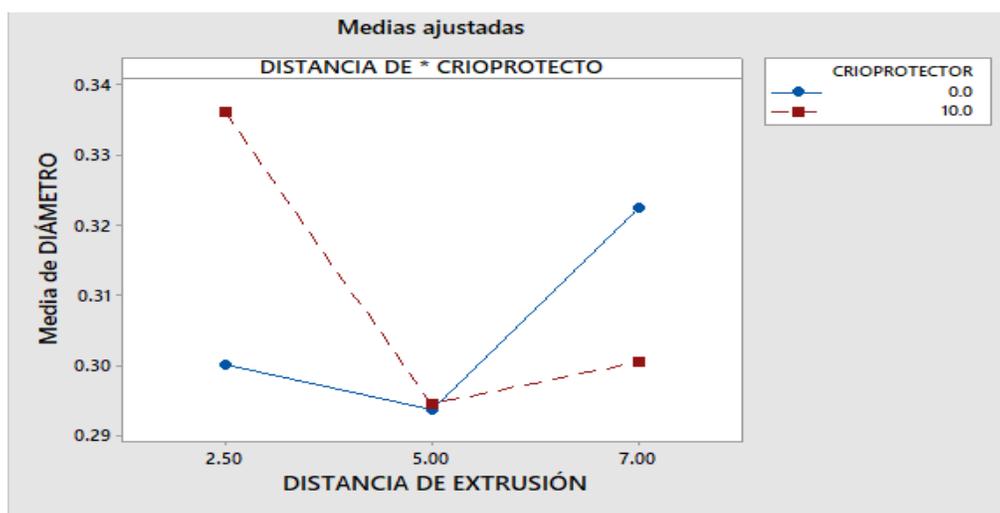
Distancia 2.5 cm Diámetro (mm)		Distancia 5 cm Diámetro (mm)		Distancia 7 cm Diámetro (mm)	
Promedio	0.300	Promedio	0.2936	Promedio	0.3224
Desv.	0.0076	Desv.	0.0185	Desv.	0.0152

**Cuadro 6. Diámetro de microcápsulas de AS y GAA (1%) con 10% de crioprotector a diferentes distancias de extrusión**

Distancia 2.5 cm Diámetro (mm)		Distancia 5 cm Diámetro (mm)		Distancia 7 cm Diámetro (mm)	
Promedio	0.336	Promedio	0.2944	Promedio	0.3004
Desv.	0.0152	Desv.	0.0201	Desv.	0.0057

Los factores que influyen en el tamaño de las microcápsulas obtenidas, está ligado a la variación de la distancia y principalmente al diámetro de salida de la solución (Pérez, et al, 2013). En este trabajo se utilizó el mismo diámetro de boquilla con variación en las distancias de extrusión.

Como se observa en la Figura 22 las líneas se intersectan en una distancia de 5.0 cm lo cual indica que se tiene un mayor efecto para el tamaño de las microcápsulas en esta distancia ya sea con o sin crioprotector, esto se atribuye a otros aspectos a considerar que influyen en la forma esférica y tamaño de las microcápsulas, como lo son el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución de CaCl<sub>2</sub> obteniendo en esta distancia la fuerza necesaria para romper la tensión superficial del baño sin afectar en el tamaño o forma de las mismas. (Lupo, 2014).



**Figura 22. Gráfica de interacción para el tamaño de las microcápsulas**

### 3.4. Prueba de compresión simple

En el Cuadro 7 se presentan los resultados de la prueba de compresión simple (Fuerza adhesiva, resiliencia, cantidad de fracturas y fracturabilidad) que se realizó a las microcápsulas de AS y GAA al 1% a diferentes distancias de extrusión (2.5, 5 y 7 cm).

**Cuadro 7. Datos obtenidos de la prueba de compresión simple para microcápsulas de AS y GAA (1%)**

Distancia		Fuerza adhesiva (gr)	Resiliencia	Cantidad de fracturas	Fracturabilidad (gr)
<b>2.5 cm</b>	Promedio	6.00	0.18	2.33	9.33
	Desv.	0.00	0.02	0.58	1.15
<b>5.0 cm</b>	Promedio	6.00	0.22	6.00	6.67
	Desv.	0.00	0.02	2.00	1.15
<b>7.0 cm</b>	Promedio	7.33	0.22	5.00	5.33
	Desv.	1.15	0.01	0.00	3.06

De acuerdo con el Cuadro 7 a menor distancia de extrusión se presenta una menor cantidad de fracturas por lo tanto en estas microcápsulas el valor de fracturabilidad resulto mayor ya que para alcanzar su fracturabilidad se requiere una mayor fuerza , lo cual resulta favorable ya que proporciona una barrera más resistente que sirve de protección para el uso de las microcápsulas como soporte de microorganismos, aunque el valor de resiliencia a una distancia de 2.5 cm disminuye respecto a los otros niveles, este parámetro es importante ya que se refiere a la capacidad que tienen las microcápsulas de regresar a su forma original después de ser sometidas a una fuerza de compresión, de esta forma podemos evaluar si pueden resistir diferentes condiciones durante el proceso, almacenaje o condiciones del tracto gastrointestinal (Lupo, 2014).

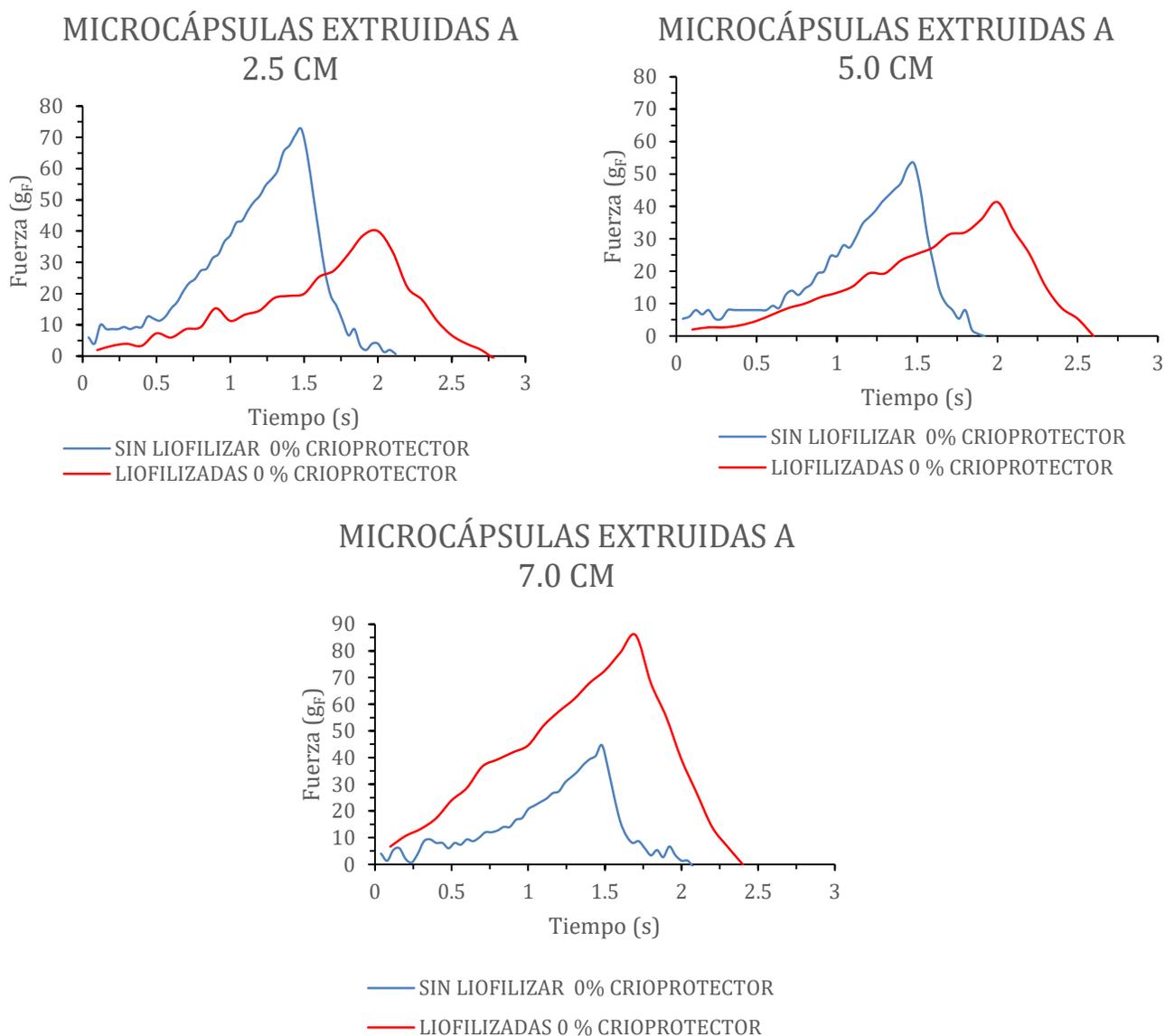
La fracturabilidad se entiende como el primer pico significativo de la primera compresión es decir la fuerza aplicada con la que se destruye la estructura de la muestra, obteniendo la mayor fracturabilidad en las microcápsulas de 2.5 cm.

En el Cuadro 8 se presentan los resultados de la prueba de compresión simple (fuerza adhesiva, resiliencia, cantidad de fracturas y fracturabilidad) que se realizó a las microcápsulas de AS y GAA al 1% posteriormente a la liofilización a diferentes distancias de extrusión (2.5, 5 y 7 cm).

**Cuadro 8. Datos obtenidos de la prueba de compresión simple para microcápsulas de AS y GAA al 1% liofilizadas**

Distancia		Fuerza adhesiva (gr)	Resiliencia	Cantidad de fracturas	Fracturabilidad (gr)
<b>2.5 cm</b>	Promedio	6.67	0.32	1.67	4.67
	Desv.	1.15	0.03	0.58	3.06
<b>5.0 cm</b>	Promedio	3.60	0.28	2.33	6.67
	Desv.	0.89	0.04	0.58	4.16
<b>7.0 cm</b>	Promedio	4.00	0.30	1.33	37.33
	Desv.	0.00	0.03	1.15	40.46

Se puede observar que al someter las microcápsulas a liofilización se obtiene el resultado contrario respecto a las no liofilizadas, ya que al extruir las microcápsulas a una mayor distancia se obtiene un valor mayor de fracturabilidad, así mismo la cantidad de fracturas disminuye conforme se aumenta la distancia de la boquilla al baño de CaCl<sub>2</sub> durante la extrusión.



**Figura 23. Prueba de compresión simple para microcápsulas de AS y GAA (1%) a diferentes distancias de extrusión (2.5, 5 y 7 cm) sin crioprotector**

En la Figura 23 se observan las gráficas de la prueba de compresión simple para las diferentes distancias de extrusión (2.5, 5 y 7 cm) sin la adición de crioprotector en microcápsulas sin liofilizar y sometidas a liofilización.

Como se puede observar para las distancias de 2.5 cm y 5.0 cm en las microcápsulas sin liofilizar se obtiene una mayor fracturabilidad, en cambio en las microcápsulas extruidas a 7.0 cm sucede lo contrario presentando valores mayores en las microcápsulas sometidas a liofilización

En el Cuadro 9 se muestran los datos del resultado de la prueba de compresión simple (Fuerza adhesiva, resiliencia, cantidad de fracturas y fracturabilidad) para las microcápsulas de AS y GAA al 1% adicionadas con 10% de crioprotector a diferentes distancias de extrusión (2.5, 5 y 7 cm).

**Cuadro 9. Datos obtenidos de la prueba de compresión simple para microcápsulas de AS y GAA (1%) con 10% de crioprotector**

Distancia		Fuerza adhesiva (gF)	Resiliencia	Cantidad de fracturas	Fracturabilidad (gF)
<b>2.5 cm</b>	Promedio	4.00	0.14	2.00	3.33
	Desv.	0.00	0.04	0.00	1.15
<b>5.0 cm</b>	Promedio	4.00	0.18	3.67	2.00
	Desv.	0.00	0.09	0.58	0.00
<b>7.0 cm</b>	Promedio	2.00	0.12	3.00	6.00
	Desv.	0.00	0.00	0.00	0.00

Como se puede observar con una distancia de 7.0 cm se obtiene el valor mayor de fracturabilidad de estas microcápsulas, a diferencia de las microcápsulas que no se adicionaron con crioprotector los valores de resiliencia son menores, se tiene un mayor número de fracturas y el valor de fracturabilidad es menor lo cual nos indica menor estabilidad en su estructura y es explicado por una concentración mayor de iones calcio en las microcápsulas frescas dando lugar a geles frágiles.

En el Cuadro 10 se muestran los datos del resultado de la prueba de compresión simple (Fuerza adhesiva, resiliencia, cantidad de fracturas y fracturabilidad) para las microcápsulas de AS y GAA al 1% adicionadas con 10% de crioprotector posteriormente a ser liofilizadas, a diferentes distancias de extrusión (2.5, 5 y 7 cm).

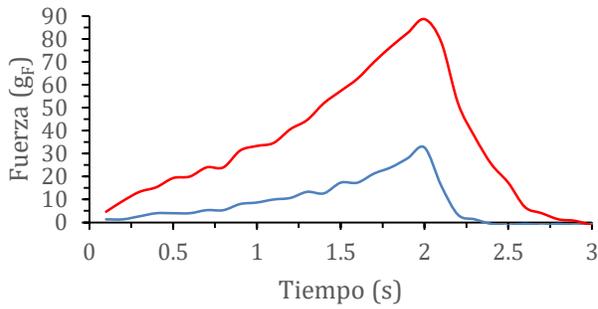
**Cuadro 10. Datos obtenidos de la prueba de compresión simple para microcápsulas de AS y GAA al 1% con 10% de crioprotector y liofilizadas**

Distancia		Fuerza adhesiva (gF)	Resiliencia	Cantidad de fracturas	Fracturabilidad (gF)
<b>2.5 cm</b>	Promedio	4.67	0.25	0.00	88.67
	Des.	1.15	0.02	0.00	18.58
<b>5.0 cm</b>	Promedio	2.67	0.27	2.33	12.67
	Des.	1.15	0.02	0.58	4.62
<b>7.0 cm</b>	Promedio	2.67	0.32	2.00	23.33
	Des.	1.15	0.03	1.00	4.16

Se observa que en la distancia de 2.5 cm no se obtuvieron fracturas durante la compresión, así como un valor de fracturabilidad alto en comparación con los resultados anteriores, el valor de resiliencia es mayor en comparación con las microcápsulas adicionadas de crioprotector sin liofilizar.

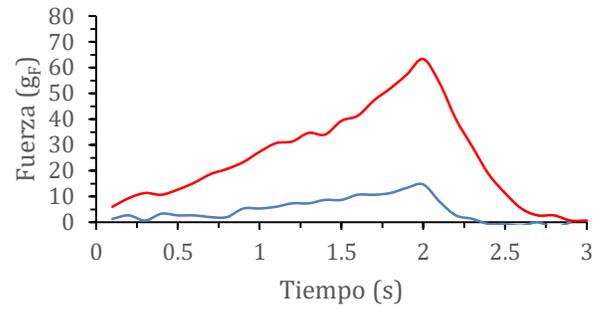
En la Figura 24 se observan los resultados de las pruebas de compresión simple para las microcápsulas adicionadas con 10% de crioprotector sin liofilizar y sometidas a liofilización a distintas distancias de extrusión (2.5, 5 y 7 cm).

### MICROCÁPSULAS EXTRUIDAS A 2.5 CM



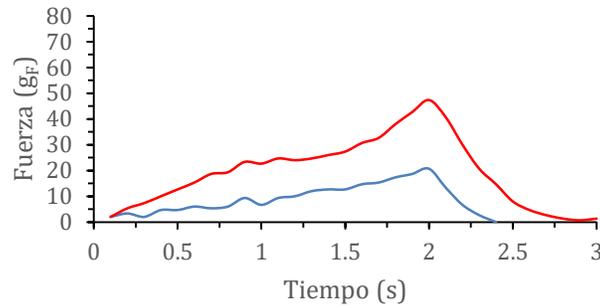
— SIN LIOFILIZAR 10% CRIOPROTECTOR  
— LIOFILIZADAS 10% CRIOPROTECTOR

### MICROCÁPSULAS EXTRUIDAS A 5.0 CM



— SIN LIOFILIZAR 10% CRIOPROTECTOR  
— LIOFILIZADAS 10% CRIOPROTECTOR

### MICROCÁPSULAS EXTRUIDAS A 7.0 CM



— SIN LIOFILIZAR 10% CRIOPROTECTOR  
— LIOFILIZADAS 10% CRIOPROTECTOR

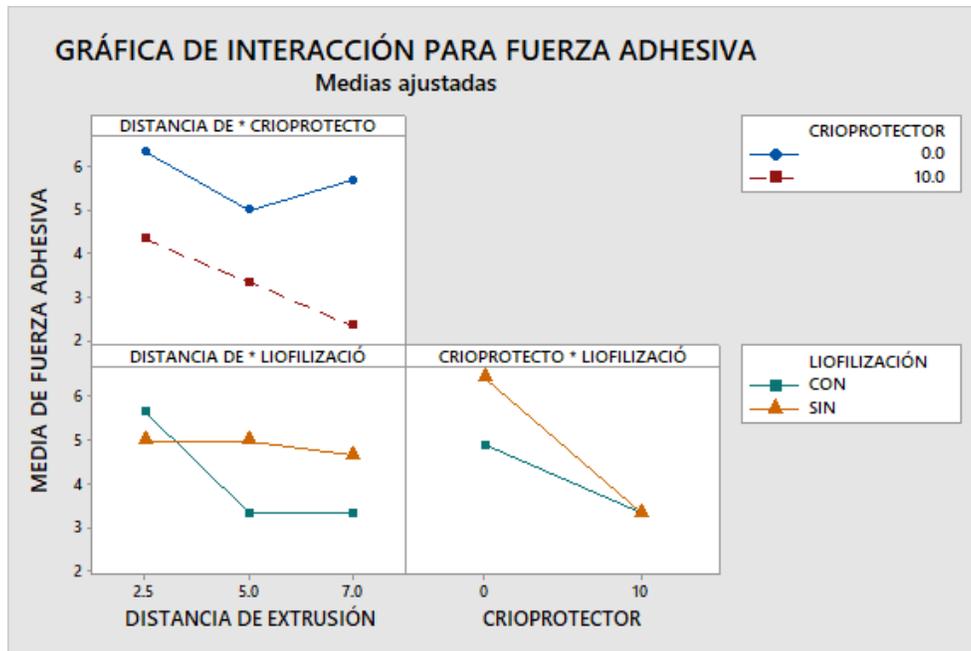
**Figura 24. Prueba de compresión simple de microcápsulas de AS y GAA al 1%, a diferentes distancias de extrusión (2.5, 5 y 7 cm) con 10% de crioprotector**

Cuando las microcápsulas son sometidas a liofilización en conjunto con la adición de 10% de crioprotector variando la distancia de extrusión en los tres niveles se obtuvieron características favorables como menor cantidad de fracturas y valores para fracturar las microcápsulas mayores, así como una mayor resiliencia atribuyendo estos resultados a la estructura formada entre los polisacáridos, los iones calcio y las proteínas de la leche descremada que al momento de liofilizar

permite la formación de una estructura más compacta, homogénea debido a sus enlaces.

Los resultados de los Cuadros 7, 8, 9 y 10 para el parametro de fuerza adhesiva se analizaron mediante un factorial de multiples niveles. Teniendo un valor de  $P > 0.05$  para los efectos principales de la distancia y liofilización a diferencia del efecto del crioprotector que tiene un valor de  $P < 0.05$  por lo cual se considera estadísticamente significativo.

En la Figura 25 se observa que el no usar un crioprotector influye en la obtención de una mayor fuerza adhesiva en las microcápsulas y a su vez al liofilizar las mismas y usar una distancia de 2.5 cm de extrusión se obtiene el mayor valor. Tambien se observa que antes de la liofilización el valor mayor de fuerza adhesiva se obtiene sin el uso de un crioprotector



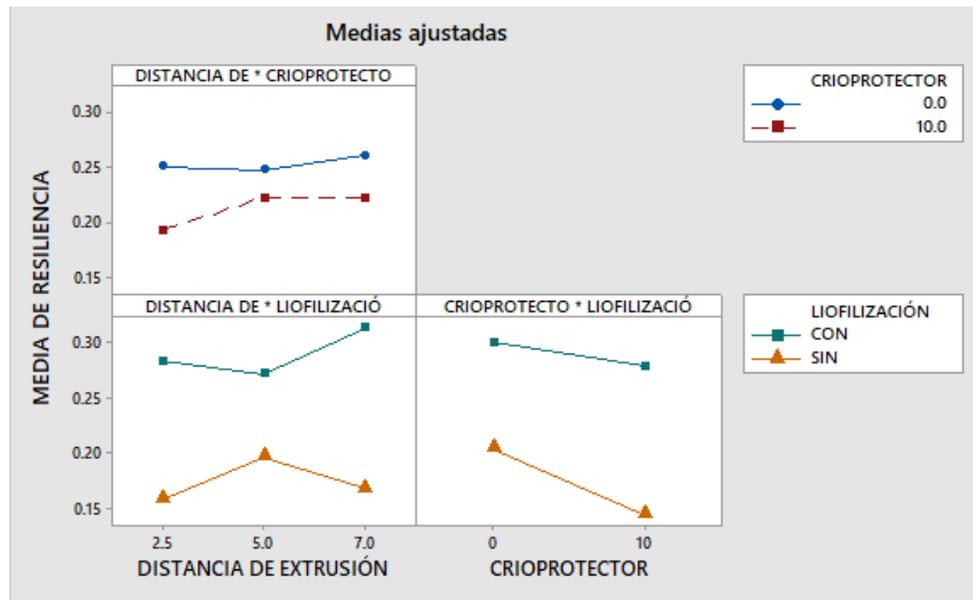
**Figura 25. Gráfica de interacción para fuerza adhesiva**

En el primer cuadrante superior observamos que la fuerza adhesiva disminuye en el caso de las microcápsulas con 10% de crioprotector al momento de aumentar la distancia de extrusión, de igual forma para las microcápsulas sin crioprotector aunque en este caso se obtienen valores de fuerza adhesiva mayores; en el cuadrante inferior de distancia de extrusión se obtuvo el mayor efecto de fuerza adhesiva en la distancia de 2.5 cm para las microcápsulas liofilizadas y de la distancia de 5.0 cm a 7.0 cm no existió efecto en esta variación, así mismo para las microcápsulas sin liofilizar la variación de la distancia tuvo un efecto casi nulo esto se puede observar ya que la pendiente de la línea es mínima.

Para el último cuadrante se observa que las microcápsulas adicionadas con 10% de crioprotector presentan una menor fuerza adhesiva sin importar el proceso de liofilización, se obtuvo el mayor valor en las microcápsulas sin crioprotector y sin liofilizar.

Se observa que al liofilizar las microcápsulas disminuye la fuerza adhesiva, esto se debe a la pérdida de agua en las mismas, ya que al deshidratarse se pierden interacciones como los puentes de hidrógeno.

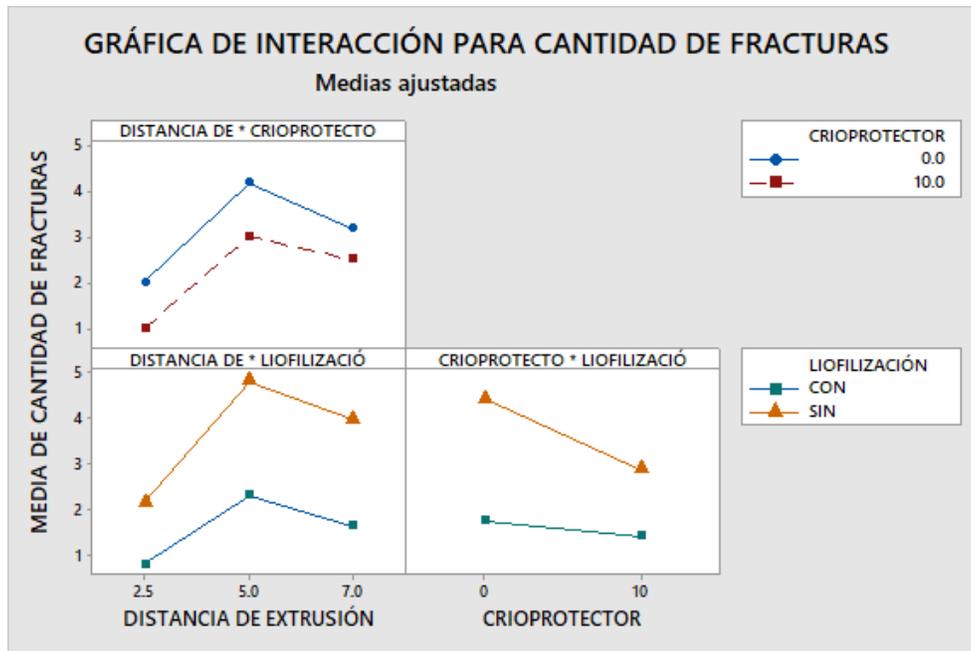
Los resultados de los Cuadros 7, 8, 9 y 10 para el parámetro de resiliencia se analizaron mediante un factorial de múltiples niveles. Obteniendo que los parámetros estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) son el uso de crioprotector y la liofilización.



**Figura 26. Gráfica de interacción para resiliencia**

En la Figura 26 se observa que las microcápsulas presentan una mayor resiliencia con una distancia de 2.5 cm sin el uso de crioprotector y sometidas a liofilización esto se debe a que en su estructura no existe una saturación de iones calcio lo cual provoca una estructura frágil ante la compresión.

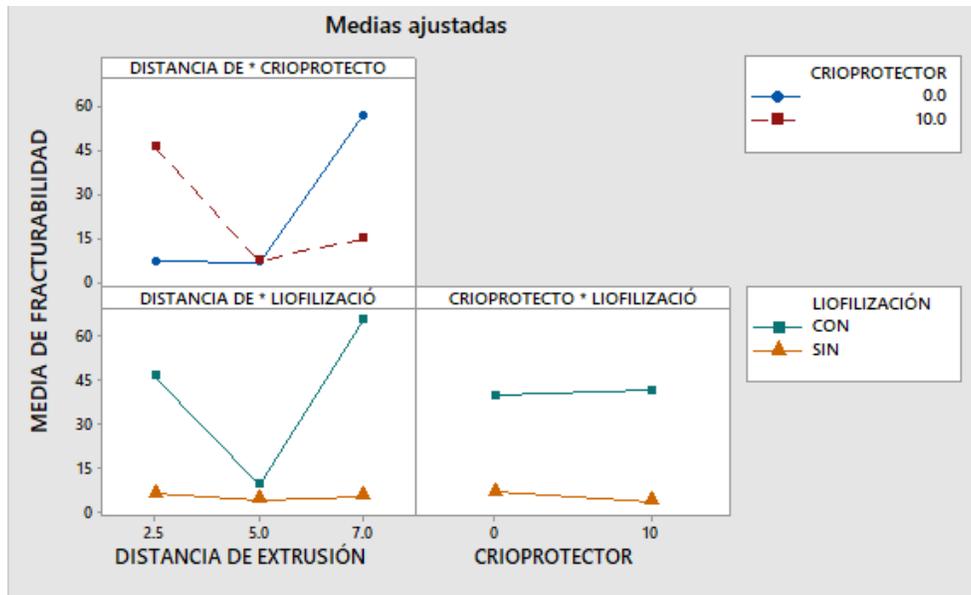
Los resultados de los Cuadros 7, 8, 9 y 10 para el parámetro de cantidad de fracturas se analizaron mediante un factorial de múltiples niveles. Determinando que el efecto de la liofilización tiene un valor de  $P < 0.05$  por lo cual es estadísticamente significativo



**Figura 27. Gráfica de interacción para cantidad de fracturas**

En la Figura 27 en el primer cuadrante superior se observa que con la distancia de 2.5 cm se obtiene el menor número de fracturas para los dos casos siendo el menor con la adición de crioprotector, para el primer cuadrante inferior de igual forma se obtiene el menor número de fracturas con la distancia de 2.5 cm y sometidas a liofilización; en el último cuadrante se observa que la liofilización con o sin crioprotector presentan la menor cantidad de fracturas siendo la liofilización el parámetro con mayor efecto.

Los resultados de los Cuadros 7, 8, 9 y 10 para el parámetro de Fracturabilidad se analizaron mediante un factorial de múltiples niveles. Obteniendo que los tres factores distancia-crioprotector-liofilización son estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ).



**Figura 28. Gráfica de interacción para fracturabilidad**

En la Figura 28 primer cuadrante superior se observa que para las microcápsulas sin crioprotector con las distancias de 2.5 cm a 5.0 cm no existe un efecto notable debido a que la pendiente es mínima sin embargo de la distancia 5.0 cm a 7.0 cm se tiene el mayor efecto resultando en un valor mayor de fracturabilidad; en el caso de las microcápsulas adicionadas de 10% de crioprotector sucede lo contrario teniendo el mayor efecto en una distancia de 2.5 cm disminuyendo el valor de fracturabilidad conforme se aumento la distancia de extrusión. por lo cual el efecto de interacción indica que la relación entre la distancia y la fracturabilidad de las microcápsulas depende del uso de un crioprotector.

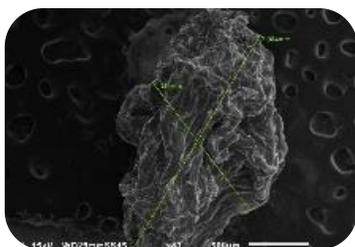
Se concluye que al utilizar 10% de crioprotector y sometidas a liofilización se requiere una mayor fuerza para fracturar las microcápsulas, siendo esta una característica favorable para el sistema.

### 3.5. Observación al MEB de microcápsulas liofilizadas

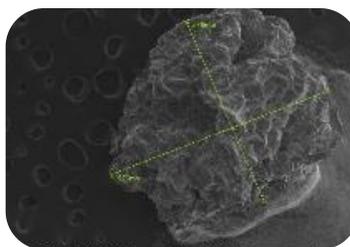
La MEB permitió observar la superficie de las microcápsulas, midiendo sus ejes para poder determinar la diferencia entre ellos, utilizando este valor de referencia para determinar la tendencia a una forma esférica. Estos resultados se muestran en el cuadro 11.

**Cuadro 11. Medidas de microcápsulas de AS y GAA (1%) liofilizadas a diferentes distancias de extrusión sin crioprotector y con 10% de este**

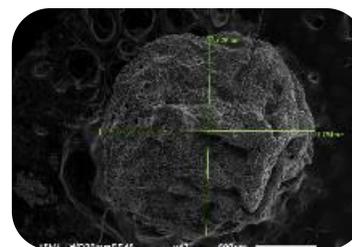
Sin crioprotector				10% de crioprotector		
Distancia	Ejes (mm)		Diferencia entre ejes	Ejes (mm)		Diferencia entre ejes
	X	Y		X	Y	
2.5 cm	1.4295	2.0230	<b>0.5935</b>	1.8940	1.8145	<b>0.0795</b>
5.0 cm	1.7770	1.8215	<b>0.0445</b>	1.9145	2.0235	<b>0.1090</b>
7.0 cm	1.9250	1.6985	<b>0.2265</b>	1.9730	1.7025	<b>0.2705</b>



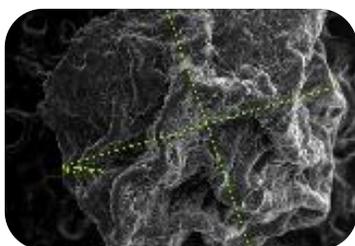
a) Microcápsula de AS y GAA liofilizada. Extruida a 2.5cm



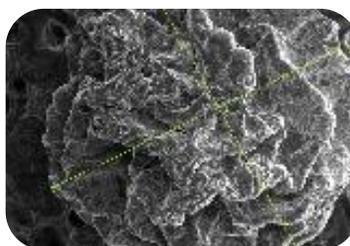
b) Microcápsula de AS y GAA liofilizada. Extruida a 5cm



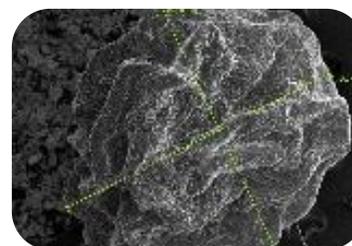
c) Microcápsula de AS y GAA liofilizada. Extruida a 7cm



d) Microcápsula de AS y GAA + 10% de crioprotector, liofilizada. Extruida a 2.5cm



e) Microcápsula de AS y GAA + 10% de crioprotector, liofilizada. Extruida a 5 cm



f) Microcápsula de AS y GAA + 10% de crioprotector, liofilizada. Extruida a 7 cm

**Figura 29. Imágenes de MEB (a,b,c) microcápsulas de AS y GAA liofilizadas (43X) (d,e,f) microcápsulas de AS y GAA liofilizadas con 10% de crioprotector (43X)**

En la Figura 29 se muestran imágenes de MEB (43X) de las microcápsulas de AS y GAA liofilizadas sin crioprotector y con 10% de crioprotector extruidas a diferentes distancias de extrusión (2.5, 5 y 7 cm).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se encontró que las microcápsulas que presentaron una morfología más esférica fueron las obtenidas a una distancia de 5

cm de extrusión, sin crioprotector, obteniendo el valor más bajo en la diferencia de sus ejes. Así mismo, para las microcápsulas con adición de crioprotector se encontró que la distancia de 2.5 cm de extrusión presentó la menor diferencia en sus ejes, por lo cual se puede decir que, entre mayor es la diferencia de los ejes la forma de las microcápsulas tiende a ser más elíptica. De acuerdo con lo reportado por Chan *et al.*, 2009 la esfericidad de las microcápsulas está relacionado directamente con la distancia de extrusión, la tensión superficial del baño de gelificación y el diámetro de la boquilla. En este estudio se menciona que a medida que una gota líquida cae a una mayor distancia, aumentan las fuerzas competitivas entre la tensión superficial-viscosidad de la gota y la presión del aire que empuja contra la parte inferior de la gota, en donde sus resultados muestran que la gota líquida se mantiene generalmente esférica antes del impacto. Por lo tanto, la deformación es causada principalmente por el impacto donde las fuerzas de tensión superficial y viscosa de la gota de líquido no superan la fuerza de impacto ejercida cuando golpea el baño de gelificación. Se puede sugerir que, por esta razón, las microcápsulas extruidas a una distancia de 7 cm presentan menos esfericidad.

### **3.5.1 Morfología de las microcápsulas por MEB**

En la Figura 30 se muestran las microfotografías de MEB (43X) de las microcápsulas, en las cuales se puede apreciar diferente morfología para cada condición, encontrando irregularidades en la superficie, tales como pliegues y ciertas depresiones que se deben a la rigidez estructural proporcionada por la superficie congelada donde tiene lugar la sublimación y la falta de agua en estado líquido, dando como resultado una estructura porosa sin contracción, que es el principal factor de la congelación. Así también la formación de las depresiones o contracción puede estar relacionada con el tamaño de la molécula del agente encapsulante, ya que una cadena más grande puede impedir el paso de moléculas de agua (Kuck & Noreña, 2016). La alta eficiencia de la encapsulación está ligada a las interacciones proteína-polisacáridos-iones calcio, estas interacciones se dan entre proteínas y polisacáridos aniónicos siendo el caso de los polisacáridos

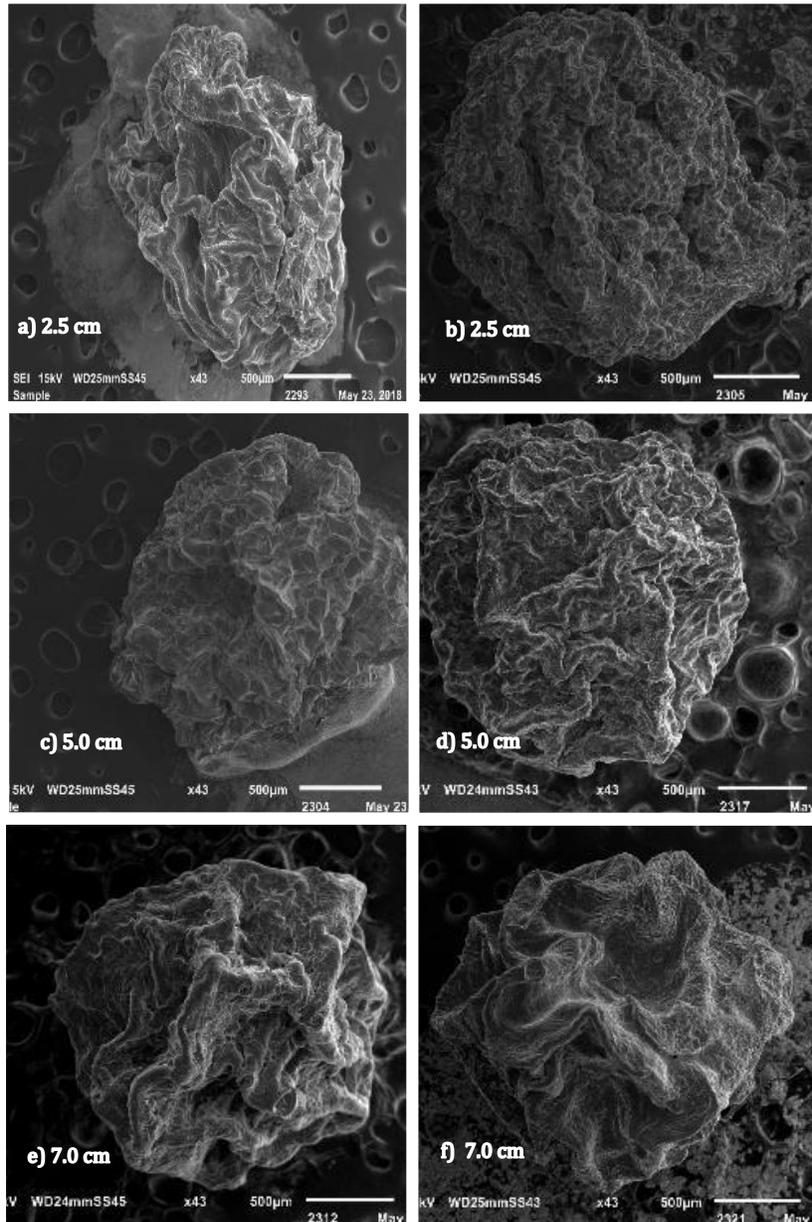
utilizados en este trabajo, actuando como un excelente agente de formación de película, lo que permite una eficaz encapsulación de la molécula.

Al utilizar un aumento 1,500 X (Figura 31) se pudo observar en la mayoría de las estructuras grietas debidas al proceso de secado y algunos bordes sobresalientes de la superficie, esto se puede atribuir a partículas de los polisacaridos que no se dispersaron por completo.

Presentando una estructura más homogénea las microcápsulas extruidas a 2.5 cm con la adición de 10% de crioprotector (leche descremada), atribuyendo esto a la formación de enlaces entre los polisacaridos-proteinas de la leche descremada y los iones calcio proporcionados por esta misma y la solución de  $\text{CaCl}_2$ .

SIN CRIOPROTECTOR

CON CRIOPROTECTOR

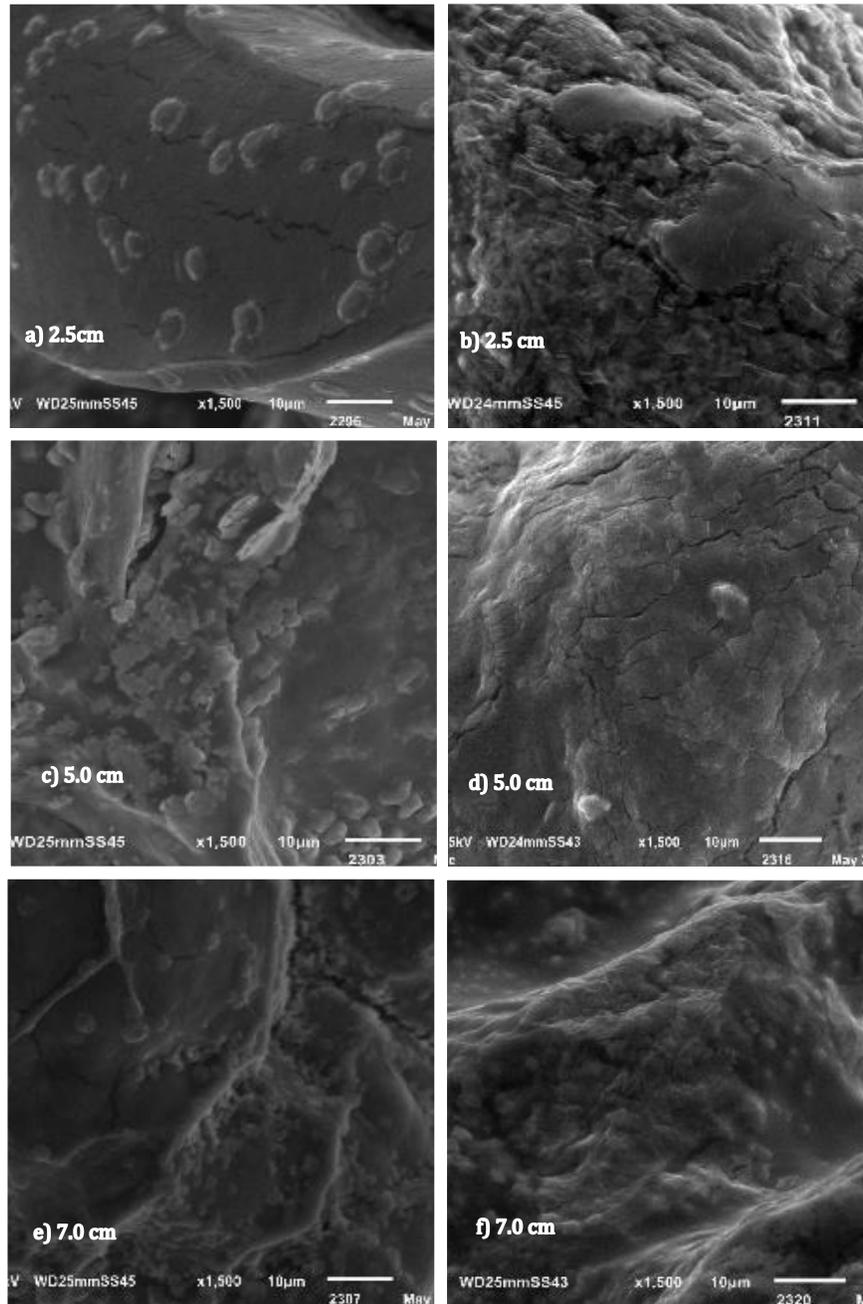


**Figura 30. Imágenes de microcápsulas MEB 43 X**

**a) extruidas a 2.5 cm b) extruidas a 2.5 cm con 10% de crioprotector  
c) extruidas a 5 cm d) extruidas a 5 cm con 10% de crioprotector  
e) extruidas a 7 cm f) extruidas a 7 cm con 10% de crioprotector**

**SIN CRIOPROTECTOR**

**CON CRIOPROTECTOR**



**Figura 31. Imágenes de microcápsulas MEB 1,500 X**

**a) extruidas a 2.5 cm b) extruidas a 2.5 cm con 10% de crioprotector c) extruidas a 5 cm  
d) extruidas a 5 cm con 10% de crioprotector e) extruidas a 7 cm f) extruidas a 7 cm con  
10% de crioprotector**

## CONCLUSIONES

- Se eligió la concentración de polisacáridos al 1% para obtener microcápsulas con una mayor estabilidad, que permitiera el manejo de la dispersión durante el proceso de extrusión.
- Durante la caracterización reológica de la dispersión AS y GAA al 1% presentó un comportamiento reológico de tipo Herschel Bulkley la cual requirió un esfuerzo inicial de corte para fluir. Se obtuvo una disminución en la viscosidad al aumentar el gradiente de velocidad.
- En la evaluación del número de microcápsulas obtenidas por mililitro se encontró que el uso de crioprotector (leche descremada) favoreció el aumento en el número de microcápsulas. La presencia de una concentración mayor de iones calcio, aunados a la solución de  $\text{CaCl}_2$ , y las proteínas de la leche vía enlaces covalentes sencillos con las cadenas lineales con los monómeros, permitieron que se formaran un número enorme de configuraciones y la formación de mayores puntos de gelificación, formando así una estructura más compacta y dando como resultado un mayor número de microcápsulas.
- Las dispersiones adicionadas con crioprotector permitieron obtener microcápsulas de mayor diámetro aunque este efecto en la experimentación no resultó estadísticamente significativo.
- Se descartó el parámetro de dureza ya que los parámetros que resultaron significativos durante la investigación fue la fuerza adhesiva, resiliencia, cantidad de fracturas y fracturabilidad.
- Las características texturales favorables que se obtuvieron fueron una mayor fracturabilidad, en el lote adicionado con 10% de crioprotector y sometidas a liofilización y menor cantidad de fracturas, con un requerimiento de mayor fuerza para desintegrar las microcápsulas, favoreciendo así la integridad de su estructura frente a condiciones externas. La relación que existe entre la

distancia de extrusión y la fracturabilidad de las microcápsulas también resultó dependiente del uso de un crioprotector, ya que al agregar un 10% del mismo se requirió de una mayor fuerza para fracturar las microcápsulas teniendo el valor más alto a una distancia de 2.5 cm, los resultados del parámetro de dureza resultaron erráticos sin embargo los parámetros de fracturabilidad, fuerza adhesiva, resiliencia y cantidad de fracturas permitieron un mejor análisis de resultados así como la observación al MEB de estructuras.

- Las microcápsulas sin liofilizar requirieron una menor fuerza para fracturarlas.
- La distancia de extrusión no representó un gran efecto en las características texturales de las microcápsulas, aunque si en las características morfológicas, obteniendo que a una distancia de 7 cm la esfericidad era menor, esto explicado por las fuerzas de la tensión superficial y la viscosidad de la dispersión al momento del impacto con la solución de  $\text{CaCl}_2$  formando microcápsulas de forma elíptica.
- Las microcápsulas al ser sometidas a liofilización presentaron en su morfología irregularidades atribuidas al proceso de secado debido a la sublimación del agua, dando lugar a una superficie porosa.
- Las dispersiones de alginato de sodio y gelana de alto acilo al 1% en concentraciones 75/25 adicionadas de 10% de crioprotector, sometidas al proceso de liofilización y extruidas a una distancia de 2.5cm favorecieron las mejores condiciones para el desarrollo del sistema de microcápsulas ya que presentaron menor número de fracturas y en su morfología se observó (MEB) una superficie más homogénea y con menor número de grietas a esta distancia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, H. E., (2017) Encapsulación por coacervación compleja. *Tecnologías de nano/microencapsulación de compuestos bioactivos*, 90.
- Avendaño. R. G., López, M. A., & Paolu, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, **7**(1), 87-96.
- Bringas-Lantigua, M. A. D. A. I., & Pino, J. A. (2012). Microencapsulación de saborizantes mediante secado por atomización. *Revista ReCiTeIA*.
- Casas, A.N., Prado, G.D., (2004). Análisis del perfil de textura y propiedades del relajacion de los geles de mezclas del almidón del maíz ceroso entrecruzado-gelana. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, **4**(1)
- 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.doi: 10.1016/j.jcis.2009.05.027
- De Araújo, N., U., Ramírez, L. A. G., Villadiego, O. S. R., & Campuzano, O. I. M. (2015). Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: una revisión. *Alimentos Hoy*, **23**(36), 112-126.
- FAO, (2001) Food and Agriculture Organization. Mercado de consumo de alginatos. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB483S/AB483S04.htm>
- 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 Ca<sup>2+</sup> binding. *Food hydrocolloids*, **23**(7), 1746-1755.
- Gallegos, G.M.M., (2015), Utilización de Alginato de Sodio para la encapsulación de complejo B, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- González, C. R.E., Pérez, M. J., & Morón, A. L. B. (2015). Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados. *Información tecnológica*, **26**(5), 11-16
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & 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.
- Kuck, L. S., & Noreña, C. P. Z. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry*, **194**, 569-576.
- Lupo Pasin, B., González Azón, C., Maestro Garriga, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **3** (1), 130-151.
- Lupo Pasin, B. (2014). Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales (Tesis doctoral Universidad de Barcelona).
- Minitab 16.0. Minitab Statistical Software. [www.minitab.com](http://www.minitab.com)
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., and Coppola, R. (2012) Microencapsulation in food science and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 182-186.
- Parra H., R. A. (2010). Bacterias ácido-lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, **8**(1), 93-105.
- Perez, L. H., et al. (2013) Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos, ICCIDCA. **47**(1), 14-25.
- Pedroza Islas, R. (2002). Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. Universidad Iberoamericana.
- Ponce, S., Orive, G., Hernández, R., Rodríguez, A., Igartua, M., & Pedraz, J. L. (2003). Efecto del polication en la viabilidad celular y la estabilidad mecánica de microcápsulas de alginato. *Tecnología farmacéutica*, 99-101.
- Ramírez-Navas, J. S. (2006). Liofilización de alimentos. *Revista ReCiTeIA*.
- Ramirez-Ramirez, J. C., Rosas Ulloa, P., Velázquez Gonzalez, M. Y., Ulloa, J. A., & Arce Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud.
- Sanderson, G. R., & Ortega, D. (1994). Alginates and gellan gum: complementary gelling agents. *In Food Hydrocolloids* (pp. 83-89). Springer, Boston, MA.

- Sandoval, M.I. (2016) Efecto de la microencapsulación de *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus plantarum* en alginato-goma arábica para su uso como probióticos (Tesis de maestría CPySA-UNAM).
- Sanz, Y., Collado, M. C., & Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica española*, 61(9), 476-482.
- Savado, A., Outtara, A.C., Bassole, H.I., & Traore, S.A. (2006). Bacteriocins and Lactic acid bacteria-a minireview. *African journal of biotechnology*, 5(9).