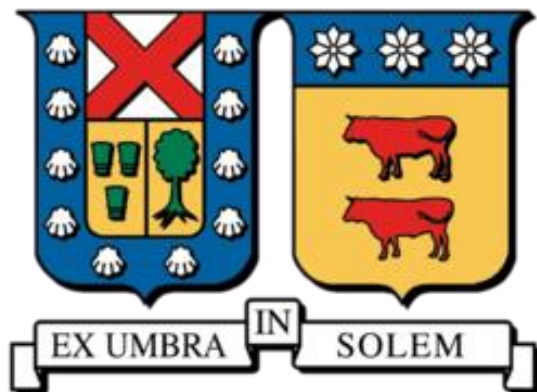


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL

VALPARAISO CHILE



OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MICROENCAPSULACIÓN DE β -CAROTENO BASADO EN EL MÉTODO DE COACERVACIÓN COMPLEJA

ANDRÉS GUSTAVO BONILLA VALENTINO

MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

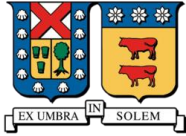
INGENIERO CIVIL QUÍMICO

PROFESOR GUÍA: DR. CRISTIAN RAMÍREZ BUSTOS

PROFESOR GUÍA: DR. RICARDO SIMPSON RIVERA

PROFESORA CO-REFERENTE: DRA. VALERIA DEL CAMPO SFEIR

AGOSTO 2018



Resumen

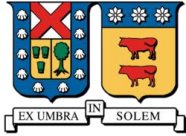
En esta investigación se busca evaluar la microencapsulación de β -caroteno mediante la coacervación compleja de Quitosano en conjunto con un biopolímero secundario: Goma Tragacanto, Goma Arábica o Gelatina, como medio de protección y de liberación controlada en el intestino delgado, analizando como repercuten los factores tanto de biopolímero utilizado, como la razón entre estos y la cantidad de aceite con β -caroteno utilizado. Las razones entre masa utilizada para cada biopolímero son de 2/1 y de 1/2, y la adición de aceite con betacaroteno al 0,5% en peso fue de 5mL y 10mL, dando una totalidad de 12 experimentos distintos.

Se determinó el efecto de los factores en distintas variables, como lo son la humedad, el rendimiento y la concentración final de betacaroteno de las microcápsulas, utilizando análisis de la varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan, determinando para la mayoría de los casos diferencias significativas entre los factores, exceptuando el rendimiento, dónde tanto la Goma Arábica como la Goma Tragacanto no presentan diferencias significativas.

Los resultados muestran que la humedad varía entre 56,6% y 81,2%, donde los factores que más influyen en esta variación fue la razón entre biopolímeros utilizada y la combinación de biopolímero utilizado. El rendimiento por su parte presenta una gran diferencia, dónde los menores valores corresponden a 9,1% y 9,8% para el caso de la Gelatina como biopolímero secundario a una razón de 1/2, y el mayor rendimiento corresponden a un 76,5% para la Goma tragacanto a razón de 2/1 con 5 mL de Aceite, y 74,8% para la Goma Arábica a mismas condiciones. Finalmente, la concentración de β -caroteno por masa de microcápsulas secas es una propiedad de gran interés, dónde la cantidad de aceite utilizado repercute directamente. Si bien el rendimiento es mayor al utilizar bajas cantidades de aceite, el utilizar una mayor cantidad hace que las microcápsulas queden más cargadas. El máximo obtenido corresponde a 4,70 mg de β -caroteno por g de microcápsulas secas, utilizando Goma Tragacanto, en razón 2/1 con 10 mL de aceite, seguida por su contraparte, Goma Arábica a mismas condiciones, con 4,58 mg de β -caroteno por g de microcápsulas secas.

No ocurre liberación controlada en la digestión *in vitro* utilizando cualquier combinación con Quitosano, debido a que la microcápsula no se destruye al aumentar el pH. Se evaluó utilizar Caseína en reemplazo de Quitosano mostrando una liberación de un 85% a los 120 minutos.

En cuanto a la estabilidad que otorga la microcápsula a la temperatura, no existen diferencias significativas con respecto al betacaroteno solo, todas las experiencias tenían una pérdida de alrededor de 10% a los 18 días.



Abstract

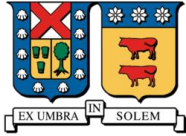
This research seeks to evaluate the microencapsulation of β -carotene by complex coacervation of Chitosan in conjunction with a secondary biopolymer: Tragacanth Gum, Arabica Gum or Gelatin, as a means of protection and controlled release in the small intestine, analyzing how the factors of both biopolymers used, as the ratio between these and the amount of oil with β -carotene used. The mass ratios used for each biopolymer are 2/1 and 1/2, and the addition of oil with beta-carotene at 0.5% by weight was 5mL and 10mL, giving a total of 12 different experiments.

The effect of the factors on different variables was determined, such as humidity, yield and the final concentration of beta-carotene in the microcapsules, using analysis of the variance and Duncan's multiple range test, determining for most of the cases significant differences between the factors, except yield, where both the Arabica Gum and the Tragacanth Gum do not present significant differences.

The results show that humidity varies between 56.6% and 81.2%, where the factors that most influence this variation was the ratio between biopolymers used and the combination of biopolymer used. The yield on the other hand presents a big difference, where the lowest values correspond to 9.1% and 9.8% for the case of Gelatine as a secondary biopolymer at a ratio of 1/2, and the highest yield correspond to a 76,5% for the tragacanth gum at the rate of 2/1 with 5 mL of oil, and 74.8% for the Arabica gum at the same conditions. Finally, the concentration of β -carotene per mass of dry microcapsules is a property of great interest, where the amount of oil used directly affects. Although the performance is higher when using low amounts of oil, using a larger amount makes the microcapsules more charged. The maximum obtained corresponds to 4.70 mg of β -carotene per g of dry microcapsules, using Tragacanth Gum, in ratio 2/1 with 10 mL of oil, followed by its counterpart, Arabian Gum at the same conditions, with 4.58 mg of β -carotene per g of dry microcapsules.

No controlled release occurs in the in vitro digestion using any combination with Chitosan, because the microcapsule is not destroyed by increasing the pH. The use of Casein in replacement of Chitosan was evaluated, showing an 85% release at 120 minutes.

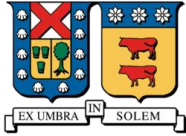
Regarding the stability that the microcapsule gives to temperature, there are no significant differences with respect to beta-carotene alone, all experiences had a loss of around 10% at 18 days.



Índice

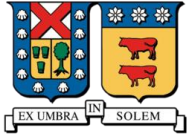
Contents

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE.....	4
1 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
1.1 HIPÓTESIS	8
1.2 OBJETIVO GENERAL	8
1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
2 ANTECEDENTES TEÓRICOS.....	9
2.1 B-CAROTENO	9
2.2 BIOPOLÍMEROS COMESTIBLES.....	10
2.3 EMULSIÓN ACEITE EN AGUA	12
2.4 MICROENCAPSULACIÓN	13
2.5 DIGESTIÓN IN VITRO	15
3 MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 MATERIAS PRIMAS Y REACTIVOS UTILIZADOS.....	17
3.2 EQUIPOS	18
3.3 DISEÑO DE EXPERIMENTOS	19
3.4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	20
3.4.1 PREPARACIÓN DE LAS DISPERSIONES MIXTAS DE BIOPOLÍMEROS Y COACERVACIÓN COMPLEJA	20
3.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS.....	21
3.4.3 DIGESTIÓN IN VITRO	24
3.4.4 ESTABILIDAD	24
4 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	25
4.1 CARACTERIZACIÓN.....	25
4.1.1 CONTENIDO DE AGUA	25
4.1.2 EMULSIÓN	26
4.1.3 RENDIMIENTO DE ENCAPSULACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE MICROCÁPSULAS	27
4.1.4 TAMAÑO MICROCÁPSULAS	30
4.2 DIGESTIÓN IN VITRO	34
4.3 ESTABILIDAD	36
5 CONCLUSIONES.....	39
6 REFERENCIAS	40
7 ANEXOS.....	42
7.1 CURVA DE CALIBRACIÓN.....	42
7.2 ANOVA RESULTADOS	43
7.2.1 HUMEDAD.....	43
7.2.2 ANOVA RENDIMIENTO.....	47
7.2.3 ANOVA CONCENTRACIÓN.....	51



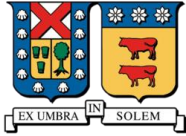
FIGURAS

FIGURA 1 FÓRMULA ESQUELETAL B-CAROTENO	9
FIGURA 2 ALIMENTOS CON ALTO CONTENIDO DE B-CAROTENO	9
FIGURA 3 ESTRUCTURA DE QUITOSANO COMPLETAMENTE DESACETILADO	10
FIGURA 4 ESTRUCTURA DE UNA PARTE PARCIAL DE GOMA TRAGACANTO	11
FIGURA 5 ESTRUCTURA DE GOMA ARÁBIGA	11
FIGURA 6 TIPOS DE MICROCÁPSULAS	13
FIGURA 7 SISTEMA DIGESTIVO	15
FIGURA 8 ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL B-CAROTENO	21
FIGURA 9 CONTORNEADO DE MICROCÁPSULAS	22
FIGURA 10 MEDICIÓN EN IMAGEJ	23
FIGURA 11 GRÁFICOS DE EFICIENCIA DE MICROENCAPSULADO DE A) QUITOSANO-GELATINA, B) QUITOSANO-GOMA ARÁBIGA Y C) QUITOSANO-GOMA TRAGACANTO	27
FIGURA 12 GRÁFICOS DE CONCENTRACIÓN DE MICROENCAPSULADO DE A) QUITOSANO-GELATINA, B) QUITOSANO-GOMA ARÁBIGA Y C) QUITOSANO-GOMA TRAGACANTO	28
FIGURA 13 HISTOGRAMA TAMAÑO DE PARTÍCULAS QUITOSANO - GOMA ARÁBIGA	30
FIGURA 14 GRÁFICO FORA GA	30
FIGURA 15 SEM MICROCÁPSULAS 1) GA 2/1 A5; 2) GA 2/1 A10; 3) GT 2/1 A5; GT 2/1 A10	32
FIGURA 18 GRÁFICO DIGESTIÓN MICROCÁPSULAS DE CASEÍNA-GOMA TRAGACANTO	35
FIGURA 19 GRÁFICOS DE ESTABILIDAD MICROCÁPSULAS DE QUITOSANO-GOMA TRAGACANTO RAZÓN 2/136	
FIGURA 20 GRÁFICOS DE ESTABILIDAD MICROCÁPSULAS DE QUITOSANO-GOMA ARÁBIGA RAZÓN 2 /1	36
FIGURA 21 GRÁFICOS DE ESTABILIDAD MICROCÁPSULAS DE CASEÍNA-GOMA TRAGACANTO	37
FIGURA 22 GRÁFICOS DE ESTABILIDAD BETACAROTENO LIBRE	37
FIGURA 23 CURVAS DE CALIBRACIÓN	42
FIGURA 24 GRÁFICOS DE MEDIAS HUMEDAD, FACTORES POLÍMERO Y RAZÓN	44
FIGURA 25 GRÁFICOS DE MEDIAS HUMEDAD, FACTOR ACEITE	45
FIGURA 26 GRÁFICO DE INTERACCIONES HUMEDAD, FACTORES POLÍMERO-RAZÓN	45
FIGURA 27 GRÁFICO DE INTERACCIONES HUMEDAD, FACTORES POLÍMERO-ACEITE	46
FIGURA 28 GRÁFICO DE INTERACCIONES HUMEDAD, FACTORES RAZÓN-ACEITE	46
FIGURA 29 GRÁFICOS DE MEDIAS RENDIMIENTO, FACTORES POLÍMERO Y RAZÓN	48
FIGURA 30 GRÁFICOS DE MEDIAS RENDIMIENTO, FACTOR ACEITE	49
FIGURA 31 GRÁFICO DE INTERACCIONES RENDIMIENTO, FACTORES POLÍMERO-RAZÓN	49
FIGURA 32 GRÁFICO DE INTERACCIONES RENDIMIENTO, FACTORES POLÍMERO-ACEITE	50
FIGURA 33 GRÁFICO DE INTERACCIONES RENDIMIENTO, FACTORES RAZÓN-ACEITE	50
FIGURA 34 GRÁFICOS DE MEDIAS CONCENTRACIÓN, FACTORES POLÍMERO Y RAZÓN	52
FIGURA 35 GRÁFICOS DE MEDIAS CONCENTRACIÓN, FACTOR ACEITE	53
FIGURA 36 GRÁFICO DE INTERACCIONES CONCENTRACIÓN, FACTORES POLÍMERO-RAZÓN	53
FIGURA 37 GRÁFICO DE INTERACCIONES CONCENTRACIÓN, FACTORES POLÍMERO-ACEITE	54
FIGURA 38 GRÁFICO DE INTERACCIONES CONCENTRACIÓN, FACTORES RAZÓN-ACEITE	54



TABLAS

TABLA 1 EJEMPLOS DE INGREDIENTES MICROENCAPSULADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA.....	13
TABLA 2 EJEMPLOS DE MODELOS ESTÁTICOS DE DIGESTIÓN IN VITRO MAYORMENTE USADOS.....	16
TABLA 3 EXPERIMENTOS	19
TABLA 4 HUMEDAD MICROCÁPSULAS	25
TABLA 5 POTENCIAL Z EMULSIÓN	26
TABLA 6 TAMAÑO DE GOTA EMULSIÓN.....	26
TABLA 7 LIBERACIÓN FASE INTESTINAL.....	34
TABLA 8 LIBERACIÓN FASE GÁSTRICA	35



Introducción

Los carotenoides son fitonutrientes responsables de los colores naranja, amarillo y rojo de la mayoría de las frutas y verduras, los cuales al ser consumidos en niveles suficientes poseen beneficios a la salud. De los más de 600 carotenoides distintos, el que más llama la atención es el β -caroteno el que ha sido descrito como beneficioso por prevenir muchas enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares o degeneración macular, ser precursor de la vitamina A y además tener propiedades antioxidantes (Jain et al. 2016, Gomez-Mascaraque et al. 2017). Sin embargo, su bioactividad está restringida por su estabilidad ante la degradación oxidativa durante el almacenamiento y su biodisponibilidad en la matriz alimentaria durante la digestión, considerando también su termosensibilidad y de su degradación durante el proceso digestivo (Gallardo et al., 2013; Giroux et al., 2013).

Es por esto que existe la necesidad de proteger el pigmento, y la microencapsulación es una solución favorable debido a que aumenta su estabilidad durante el almacenamiento e incrementa su bioaccesibilidad (Jain et al. 2016). Esta técnica consta de proteger un ingrediente sensible con materiales que lo envuelvan. La microencapsulación ha sido utilizada en varios campos como la industria farmacéutica, industria alimentaria, agricultura, cosméticos, entre otros, y la principal utilidad es la de aumentar la vida útil de productos como pigmentos, sabores, vitaminas. Existen varias maneras de microencapsular componentes como el secado en spray, extrusión y coacervación compleja. (Jain et al. 2016)

De acuerdo a Jain (2016), la coacervación compleja es una de las técnicas más antiguas y simples utilizadas para microencapsular bioactivos para liberación controlada. Ésta es una técnica donde ocurre una separación de fases en la que polielectrolitos de carga opuesta son balanceados eléctricamente en un medio acuoso. Esto depende de un set de condiciones como el pH, densidad de carga de los polímeros, concentración coloidal, fuerza iónica del medio, temperatura, etc. No todos los polielectrolitos poseen la capacidad de utilizarse en este proceso. Los biopolímeros naturales, debido a su biodegradación, efectividad y propiedades de formación de film, son extensamente utilizados para fines de liberación controlada.

En la presente memoria se realizará microencapsulación de β -caroteno mediante coacervación compleja utilizando diversos biopolímeros y proporciones, para buscar un óptimo que sirva tanto para aumentar la vida útil y proteger el pigmento, como para lograr una mejor bioaccesibilidad mediante la liberación controlada en el intestino delgado.



1 Hipótesis y objetivos

1.1 Hipótesis

Es posible microencapsular β -caroteno mediante coacervación compleja de biopolímeros comestibles, quedando las microcápsulas aptas para la liberación controlada en el intestino delgado.

1.2 Objetivo general

Evaluar rendimiento de encapsulación, digestión *in vitro* y estabilidad de microcápsulas de β -caroteno, producidas mediante coacervación compleja de Quitosano en combinación con Goma Arábica, Goma Tragacanto o Gelatina.

1.2.1 Objetivos específicos

- Encontrar los parámetros a utilizar en el proceso de coacervación compleja.
- Evaluar el rendimiento de encapsulado en el proceso de coacervación compleja de los distintos biopolímeros comestibles.
- Evaluar el tamaño y potencial Z de la emulsión de aceite con β -caroteno en solución de biopolímero.
- Caracterización de las microcápsulas en cuanto a humedad, tamaño de partícula y estabilidad térmica a temperatura ambiente.
- Evaluar la liberación de β -caroteno en digestión *in vitro*.

2 Antecedentes teóricos

2.1 β -caroteno

El β -caroteno es un pigmento de coloración rojo-anaranjado bastante abundante en frutas y verduras. Pertenece al grupo de los carotenoides de los cuales existen más de 600 (Jain et al., 2016)

Estructuralmente corresponde a un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal, con dos anillos β -ionona.

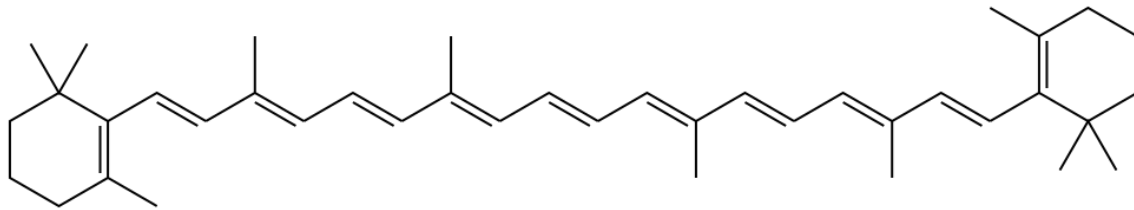


Figura 1 Fórmula esquelética β -caroteno

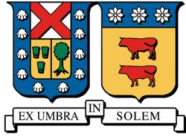
Aproximadamente 50 carotenoides son precursores de la vitamina A, debido a que la presencia de los grupos β -ionona tienen esta característica. De este grupo tres carotenoides que son más reconocidos ya que se encuentran en concentraciones significantes en el plasma humano, son el β -caroteno, el α -caroteno y la β -criptoxantina. Los dos primeros se encuentran en verduras como las zanahorias y el zapallo, además de vegetales de hojas verdes como la espinaca, mientras que en frutas como las naranjas, mandarinas y papaya es posible encontrar β -criptoxantina. (Tanumihardjo, 2001). El β -caroteno es el con mayor actividad de vitamina A y la conversión más eficiente a vitamina A (Donhowe et al., 2013)



Figura 2 Alimentos con alto contenido de β -caroteno

El β -caroteno además posee propiedades antioxidantes, puede funcionar como un extractor de radicales lipídicos y extintor de oxígeno singlete debido a su estructura conjugada de dobles enlaces y anillos de ionona. (Grune et al., 2010)

La absorción máxima de β -caroteno desde vegetales es relativamente baja (alrededor de 65%), debido a que su biodisponibilidad depende principalmente de la matriz alimentaria en la que se encuentra. (Donhowe et al., 2013)



2.2 Biopolímeros comestibles

Los biopolímeros son polímeros producidos por organismos vivos. Unidades monoméricas que se enlazan covalentemente entre sí para formar unidades más grandes. Existen tres clases principales, clasificadas de acuerdo a su unidad monomérica: Polinucleótidos, polipéptidos y polisacáridos. (Meyers et al., 2008) A continuación se describen los biopolímeros comestibles utilizados en este trabajo.

Quitosano es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). Se produce a partir del tratamiento de conchas de quitina de camarones y otros crustáceos con una sustancia alcalina como hidróxido de sodio. Este biopolímero es bastante usado en la industria alimenticia debido a su no toxicidad, capacidad de formar películas, su alta mucoadhesión y resistencia a la tracción (Butstraen et al., 2013)

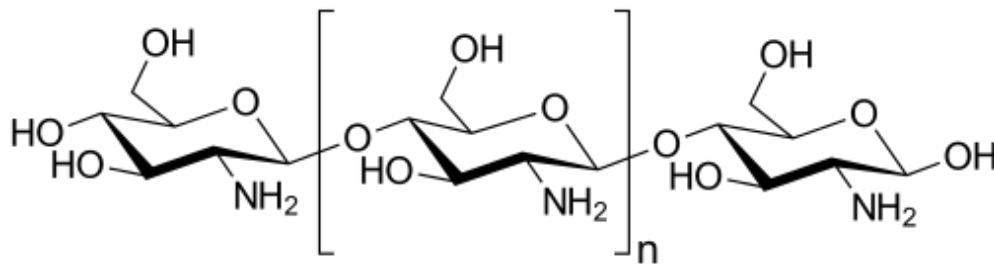


Figura 3 Estructura de quitosano completamente desacetilado

La Goma Tragacanto es un polisacárido cargado negativamente que se obtiene de varias especies de Astragalus, un tipo de planta, tiene una larga historia en el uso como estabilizador, además de aumentar la viscosidad para emulsiones alimenticias. Este biopolímero forma muchas ramas, es un carbohidrato hidrofílico heterogéneo. Es levemente ácido y posee una pequeña proporción de proteína (bajo el 4%) (Gavlighi et al., 2013) Este biopolímero ha sido reconocido como seguro (GRAS) desde 1961 y puede ser usado en concentraciones de 0,2 a 1,3% en alimentos. Como posee alta resistencia al ácido y habilidades estabilizadoras, emulsificantes y gelificadoras tiene numerosas aplicaciones en la industria de alimentos. (Jain et al., 2016)

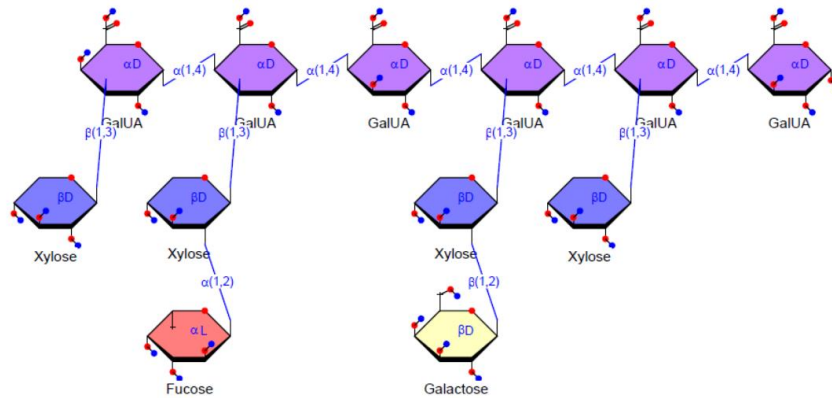


Figura 4 Estructura de una parte parcial de Goma Tragacanto

La Goma Árábica, también un polisacárido cargado negativamente, se extrae de la savia endurecida de varias especies de acacias. Es una mezcla compleja de glicoproteínas y polisacáridos. Es altamente utilizado en la industria alimentaria debido a su alta solubilidad y baja viscosidad en altas concentraciones, y sus propiedades de emulsionante y microencapsulante (Espinosa et al., 2007)

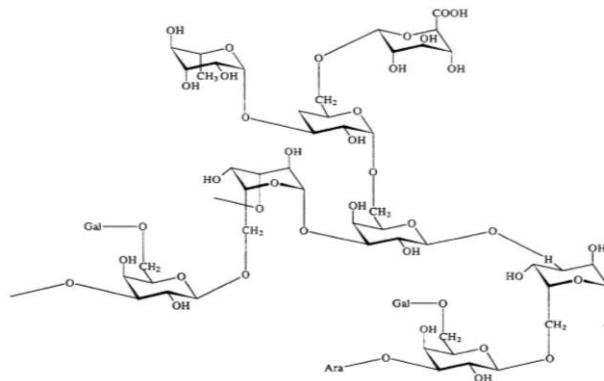
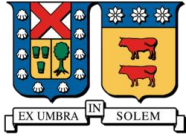


Figura 5 Estructura de Goma Árábica

La Gelatina es un coloide gel (es decir, una mezcla semisólida a temperatura ambiente), incolora, translúcida, quebradiza e insípida, que se obtiene a partir del colágeno procedente del tejido conectivo de animales, hervido en agua. La gelatina es una proteína compleja, es decir, un polímero compuesto de aminoácidos. Como sucede con los polisacáridos, el grado de polimerización, la naturaleza de los monómeros y la secuencia en la cadena proteica determinan sus propiedades generales. Una notable propiedad de las disoluciones de esta molécula es su comportamiento frente a temperaturas diferentes: son líquidas en agua caliente (coloide tipo sol) y se solidifican en agua fría (coloide tipo gel).



2.3 Emulsión aceite en agua

Una emulsión es una dispersión inmiscible de un líquido (fase dispersa) en otro (fase continua). Las emulsiones se clasifican en dos grupos, el primero consiste en gotas de aceite dispersadas en una fase acuosa llamado aceite en agua u O/W (oil in water), por ejemplo, la leche, la crema, mayonesa, sopas y salsas. El otro grupo corresponde a gotas de agua dispersadas en aceite llamado agua en aceite o W/O (water in oil), margarina y mantequilla son un ejemplo de esto. Las emulsiones son producidas homogenizando el aceite en una fase acuosa en presencia de uno o más emulsificantes (Guzey & McClements, 2006).

Un emulsionante es una sustancia que estabiliza la emulsión, normalmente un surfactante. Un ejemplo es la yema de huevo que, gracias a la lecitina, estabiliza la emulsión de la mayonesa. Algunas veces la fase interna puede actuar como emulsionante y como resultado da una nanoemulsión. (Hu et al., 2016)

La utilización de ultrasonido como asistente en la formación de emulsiones fue de los primeros usos que se le dio a esta tecnología. La irradiación de ultrasonido genera cavitación en el líquido al alcanzar el mínimo de amplitud de presión, y aquí es cuando sucede la emulsión. (Shashank et al., 2008) El ultrasonido son ondas de sonido con frecuencias más altas que la capacidad auditiva humana y generan en líquidos ondas alternativas de baja y alta presión, esta diferencia hace que se generen y colapsen burbujas de vacío, este es el fenómeno llamado cavitación.

Las emulsiones de tipo aceite en agua son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria porque permiten una mayor retención y estabilidad de los compuestos activos. Pueden estar presentes el producto final o ser productos intermedios, como partículas del compuesto activo.) (Silva et al. 2015)

El principal desafío para las aplicaciones de emulsiones en la industria alimentaria y para el suministro de dichos productos es su inestabilidad termodinámica porque todos estos sistemas son propensos a coalescer (McClements, 2004; Tadros, 2009). Además, el uso de emulsionantes y aditivos no reconocidos como seguros (GRAS) no está permitido en los alimentos. Esta restricción reduce considerablemente las opciones de surfactante y presenta un desafío importante en el desarrollo de nuevos productos (Shanmugama et al., 2014). El uso de biopolímeros como agentes emulsionantes y/o estabilizantes ha sido un enfoque exitoso para el diseño de emulsiones altamente estables (Bouyer et al, 2012).

La distribución del tamaño de las gotas de aceite es otro factor importante en la estabilización de las emulsiones porque los tamaños más grandes aceleran la desestabilización. La emulsificación con ultrasonido de alta intensidad mejora notablemente esta característica. (Silva et al. 2015)

2.4 Microencapsulación

La tecnología de microencapsulación fue primeramente presentada en los años 50 por Green y Schleicher, con una patente registrada para la preparación de capsulas que contenían tinturas que se utilizarían incorporándolas a papel con propósitos de derechos de autor (Ghosh, 2006). Hoy en día se utiliza para proteger sustancias microscópicas sensibles a distintos factores ambientales, permitiendo una liberación controlada. El ingrediente activo o material del núcleo puede ser protegido, temporalmente o permanentemente, por un material que lo envuelve. La microencapsulación se enfoca en incrementar la efectividad de sustancias seleccionadas en la industria. (Paulo & Santos, 2017)

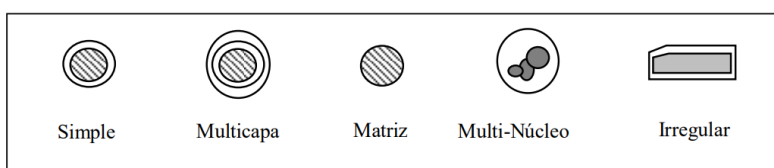


Figura 6 Tipos de microcápsulas

La industria alimenticia es uno de los grupos que más aportan al progreso de esta tecnología, superado solamente por la industria farmacéutica, y esta motivación se debe primeramente a que han incrementado las demandas de consumidores y los requerimientos de los productos, como por ejemplo la adición de sustancias funcionales. Generalmente estos ingredientes son inestables tanto al ambiente como a los procesos y es por esto que las técnicas de microencapsulación surgen para solucionar esta problemática. Estos elementos funcionales pueden regular el color, sabor y textura de los alimentos, también pueden ser utilizados como preservantes o ingredientes bioactivos.

Tabla 1 Ejemplos de ingredientes microencapsulados en la industria alimenticia

Campo de aplicación	Ejemplo	Referencia
Saborizante	Aceite de limón	Bhandari et al., 1999
	Aceite de menta	Koo et al., 2014
	Aceite de vainilla	Yang et al., 2014
Endulzante	Aspartame	Rocha-Selmi et al., 2013
	Sucralosa	Rocha-Selmi et al., 2013
	Xylitol	Santos et al., 2015
Colorante	Annatto	De Marco et al., 2013
	β -caroteno	Donhowe and Kong, 2014
	Oleorresina turmérica	Donhowe and Kong, 2014
Vitaminas solubles en grasa	Vitamina A	Junyaprasert et al., 2001
	Vitamina D2	Shi and Tan, 2002
	Vitamina E	Sharipova et al., 2016
Vitaminas solubles en agua	Vitamina C	Desai and Park, 2005



Probiótico	Bifidobacterium spp.	Hansen et al., 2002
	Bifidobacterium longum	Amine et al., 2014
	Lactobacillus acidophilus	Fávaro-Trindade, 2002

Existen métodos físicos, fisicoquímicos y químicos de microencapsulado.

Métodos físicos: **Recubrimiento en bandeja**, dónde las partículas se van recubriendo lentamente con el material externo; **recubrimiento en suspensión aérea**, las partículas del núcleo deben ser sólidas y se suspenden en una corriente de aire, luego se les aplica un solvente volátil que les deja una delgada capa polimérica protectora; **extrusión centrífuga**, un chorro de líquido a recubrir es rodeado por solución protectora; **boquilla vibradora**, la microencapsulación se logra mediante una microgranulación que ocurre al usar un flujo laminar por una boquilla que vibra, la gelificación se logra interna (proceso sol-gel) o externamente (adición de un binder); y finalmente **spry-drying**, o secado en spray, la solución que contiene el material activo disuelto en el polímero se pulveriza y seca dejando al componente atrapado.

Métodos físico-químicos: **gelificación ionotrópica**, donde las unidades de ácido úrico del alginato se reticulan (crosslink) con cationes multivalentes; **Separación de la fase de coacervación**, consiste en tres pasos que se llevan a cabo en continua agitación, primero la formación de tres fases químicas inmiscibles, fase líquida vehículo, fase de núcleo y fase de recubrimiento, el segundo paso es cuando el recubrimiento envuelve al material de núcleo y finalmente la rigidización de la cubierta.

Métodos químicos: **Policondensación interfacial**, dos reactantes reaccionan rápidamente en la interfase, un compuesto que contiene un hidrogeno activo (como amina o alcohol) y otro con ácido clorhídrico, generando una pared flexible que cubre la emulsión; **reticulación interfacial**, un derivado de la policondensación interfacial, desarrollado para evitar el uso de diaminas tóxicas, reemplazándolas por un biopolímero, como una proteína. La reacción ocurre en la interfase de la emulsión, donde el ácido cloruro reacciona con diversos grupos funcionales de la proteína formando la membrana; **Polimerización in situ**, la polimerización del monómero ocurren en la superficie de la partícula del núcleo; **Matriz de policondensación**, el material del núcleo es incrustado en una matriz polimérica durante la formación de las partículas, es similar al "spray-drying" solo que la solidificación de la matriz puede ser causada por un cambio químico.

En esta investigación se utiliza la coacervación compleja (o coacervación de complejos, complex coacervation en inglés). Por un lado, debido a la viabilidad del proceso en sí, es un proceso no muy complejo, fácil de replicar y con buenos resultados en la bibliografía, y por otro lado debido a los implementos en laboratorio que dificultaban utilizar el secado en spray, otro método altamente utilizado en este tipo de investigaciones.

2.5 Digestión *in vitro*

Si bien al usar animales o personas para realizar la digestión del elemento que desea estudiar (digestión *in vivo*) se obtienen resultados más precisos, es un proceso de alto costo y que consume mucho tiempo, por esta razón es que se ha dedicado mucho esfuerzo en el desarrollo de técnicas *in vitro*.

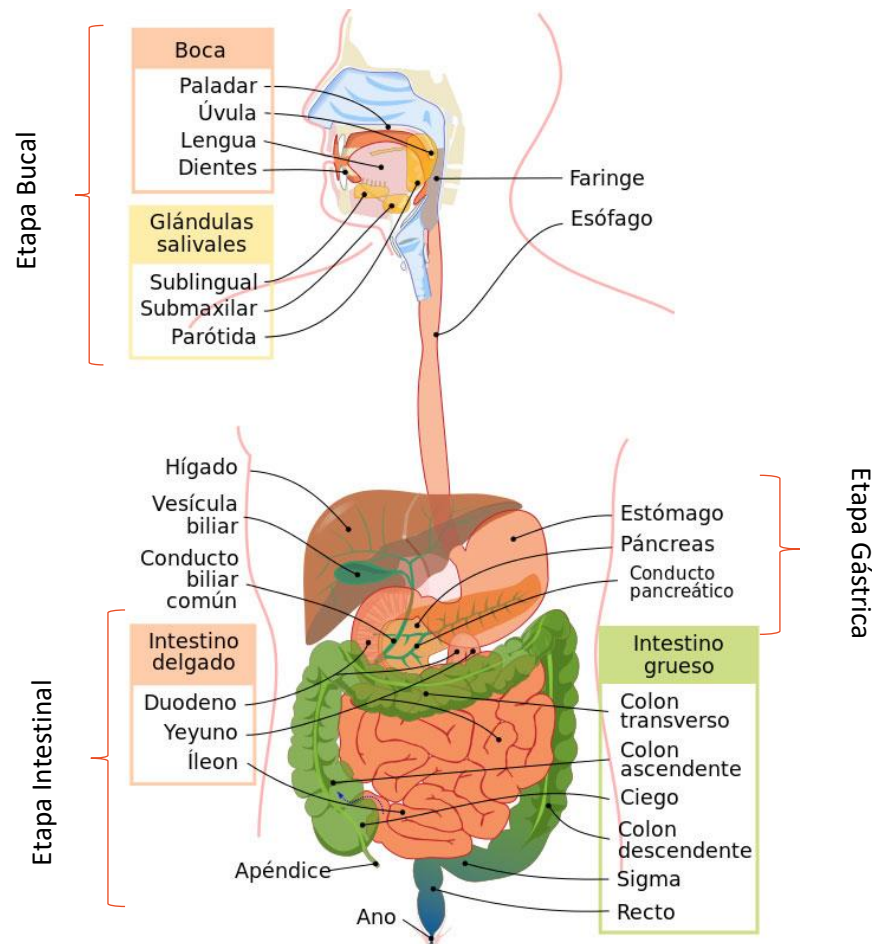


Figura 7 Sistema digestivo

El proceso digestivo en su totalidad se divide en tres etapas: bucal, gástrica e intestinal. La primera etapa se divide en la masticación y en la insalivación, formando el bolo alimenticio. En la etapa gástrica el bolo alimenticio atraviesa el esófago gracias a los movimientos peristálticos de los músculos de sus paredes e ingresa al estómago a través del cardias, acá se mezcla con los jugos gástricos (ácido clorhídrico y enzimas varias) que lo degradan hasta formar el quimo, una papilla blanquecina. El quimo pasa al duodeno a través del píloro y se junta con los jugos intestinales, pancreático y biliar, haciendo que las grasas se emulsionen facilitando la acción de las enzimas. Es a nivel del intestino delgado donde la mayoría de los nutrientes, y en el caso del β -caroteno, son absorbidos, es por esto que se apunta a una liberación a nivel intestinal.

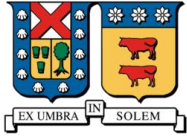


Cada etapa del sistema digestivo se puede reproducir en el laboratorio, existen distintas técnicas que varían en complejidad, tiempo, recursos. Para este estudio las fases más importantes son la gástrica e intestinal, debido a que las microcápsulas deben resistir la primera y comenzar a liberar el β -caroteno en la segunda.

Tabla 2 Ejemplos de modelos estáticos de digestión in vitro mayormente usados

Etapa digestiva	Componentes inorgánicos	Enzimas u otros	pH	Tiempo	Referencia
Estomago	NaCl	Pepsina	2	1 h	Garrett et al., 1999
I. delgado	NaHCO ₃	Pancreatina, Extracto de Bilis	7,5	2 h	
I. delgado	CaCl ₂	Lipasa Pancreática	7	2 h	Hu et al., 2010
I. delgado	Tris-maleate, CaCl ₂ , NaCl	Pancreatina, Taurodexicaloato sódico, fosfatidilcolina	6,5	0,5 h	Williams et al., 2012
Estomago	NaCl, NaH ₂ PO ₄ , KCl, CaCl ₂ , NH ₄ Cl	Pepsina, glucosa, ácido gulcorónico, urea, glucosamina, BSA, mucina	2	2 h	Versantvoort 6.8 5 min et al., 2005
I. delgado	NaCl, NaHCO ₃ , KH ₂ PO ₄ , KCl, MgCl ₂ , CaCl ₂	Pancreatina, lipasa, Urea, BSA, extracto de bilis	6,5 - 7	2 h	

Los modelos en general pueden dividirse en estáticos y dinámicos, los primeros hacen cada fase por separado, utilizando la composición enzimática u química de cada una, mientras que los dinámicos simulan además las fuerzas mecánicas dinámicas. Para el caso del β -caroteno en aceite estas fuerzas no son tan determinantes, por ende, los modelos estáticos son suficientes. (Quanquan et al., 2018)



3 Materiales y métodos

3.1 Materias primas y reactivos utilizados

β -caroteno (Sigma-Aldrich, >97%)

Aceite de maravilla Belmont

Quitosano (Q, Quitoquímica)

Goma Arábica (GA) (Decora cake)

Goma Tragacanto (GT)

Gelatina (GEL)

Sal sódica de Caseína de leche bovina (Sigma-Aldrich)

Ácido clorhídrico técnico (32%)

Hidróxido de sodio (G.A. Ventas)

Tripolifosfato de sodio (NaTPP) (Sigma-Aldrich, grado técnico 85%)

Agua destilada

Cloruro de sodio (G.A. Ventas)

Papel filtro (Advantec 5C)

Acetato de Etilo (JT Baker 99,9%)

Sodio fosfato monobásico y dibásico (G.A. Ventas)

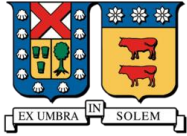
Pancreatina de páncreas porcino (Sigma)

Lipasa de páncreas porcino (Sigma) 100-500 u/mg

Extracto de bilis porcino (Sigma)

Pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma) 3200-4500 u/mg

Mucina de mucosa gástrica porcina (Sigma) tipo III, ácido siálico 0,5 – 1,5%. polvo parcialmente purificado



3.2 Equipos

Agitador orbital (REMI, Dragonlab 0520-5)

Placa calefactora (Labtech, thermo scientific)

Centrífuga (Hermle z323k)

Espectrofotómetro UV-Vis Genesis 5 (Spectronic Instrument Inc.)

Balanzas analíticas (Radwag WTB2000, Electronic balance JD400-3)

pH-metro (Jenco visión plus pH6175)

Estufa (Mettler GmbH & Co. KG)

Nanosizer (modelo 7590, Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido)

Ultrasonido (Qsonica CL-334)

Bomba de vacío (Rocker 300)

Mini-shaker (Sunflower BOECO)

Bomba de jeringa (genie touch Kent scientific)

Micropipetas (Labnet Biopette plus 1-5mL, 20-200 µL)

Microscopio electrónico de barrido (ZEISS Oxford Instrument)



3.3 Diseño de experimentos

Se realizó un diseño de 2 variables con 2 niveles cada una para 3 pares de polímeros utilizados, lo que da un total de 12 experimentos diferentes.

Las variables corresponden a:

Combinación de Biopolímeros: Goma Arábica, Goma Tragacanto o Gelatina, en conjunto con Quitosano

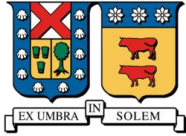
Razón entre Biopolímeros: 2 es a 1 y 1 es a 2 de masa usada.

Cantidad de aceite: 5 y 10 mL al 0,5% de β -caroteno

Tabla 3 Experimentos

Experimento	Biopolímero	Razón	Cantidad Aceite (mL)
1	Goma Arábica	2/1	5
2	Goma Arábica	2/1	10
3	Goma Arábica	1/2	5
4	Goma Arábica	1/2	10
5	Goma Tragacanto	2/1	5
6	Goma Tragacanto	2/1	10
7	Goma Tragacanto	1/2	5
8	Goma Tragacanto	1/2	10
9	Gelatina	2/1	5
10	Gelatina	2/1	10
11	Gelatina	1/2	5
12	Gelatina	1/2	10

Adicionalmente se realizaron experimentos utilizando Caseína en reemplazo de Quitosano, dónde la razón fue de 1/1 con 5 mL de aceite al 0,5% de β -caroteno



3.4 Metodología Experimental

El experimento en si tiene varias etapas: preparación, caracterización y digestión de las microcápsulas, estudios de estabilidad de almacenaje.

3.4.1 Preparación de las dispersiones mixtas de biopolímeros y coacervación compleja

Se prepararon dispersiones de biopolímeros mediante la adición de cantidades conocidas de cada uno en 100 mL de agua destilada sometida a una agitación suave, con el objetivo de obtener concentraciones de 1,5% y 3%. Para el Quitosano es necesario diluirlo en una solución al 2% v/v de ácido acético (Jain 2016, Bustræen 2014). Se agitan suavemente a 45°C durante 2 horas y se dejan reposar 12 horas para su total hidratación (Jain, 2016). La solución de Tripolifosfato (TPP) se obtiene disolviendo 2g de NaTPP en 100 mL de agua destilada. La preparación del aceite con β -caroteno es previa a los experimentos, se masan cantidades conocidas de β -caroteno en un vaso de precipitado y luego se añade el volumen de aceite necesario llegando a una concentración de 0,5% p/v. Se deja agitando a temperatura de 45°C por 1 hora. Luego se almacena cubierto con papel alusa para evitar la penetración de la luz.

El proceso de coacervado comienza con la adición del aceite a 100 mL de la solución de biopolímero secundario (GA, GT, Gel). La mezcla entra en un proceso de pre-emulsión, dónde se agitada a 1000 rpm por 5 minutos, luego se trasvasija a tres tubos falcon y se les aplica ultrasonido con un sonicador Qsonica CL-334 a 320 W de potencia durante 2 minutos para completar la emulsión (Silva et al., 2014). Luego de completarse la emulsión se separan 2 mL para realizar mediciones de potencial Z y diámetro de gota en Nanosizer (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido). Se trasvasija nuevamente a un vaso de precipitado de 500 mL y se agita a 1000 RPM mientras se hace gotear la solución de Quitosano a razon de 4mL/min utilizando una bomba de jeringa Genie Touch. Durante esta fase es necesario controlar que el pH de la solución se encuentre en el óptimo (pH=4) mediante la adición de ácido clorhídrico 2M. Al finalizar el proceso de goteo es necesario mantener la agitación durante 2 horas más para asegurarse de que reaccione completamente. Se trasvasija una tercera vez a tubos falcons y se centrifuga a 7000 RPM por 7 minutos para la separación de fases. Luego de retirar el sobrenadante, se retira la fase sólida en un tubo falcon y se deposita en un freezer a -20°C. Tras 12 horas se sacan las muestras congeladas, se lavan y filtran para retirar tanto el aceite sobrante y la mayor cantidad de agua sin dañar las microcápsulas.



3.4.2 Caracterización de las microcápsulas

3.4.2.1 Curva de calibración

Primero se realiza una curva de calibración con acetato de etilo y β -caroteno de laboratorio para poder medir la concentración de β -caroteno en las microcápsulas. Para realizar esta curva se toman cantidades conocidas de β -caroteno y se disuelven en Acetato de Etilo, y luego se va diluyendo en factores. Cada vez se utiliza un espectro fotómetro para determinar la Absorbancia a 450nm de longitud de onda.

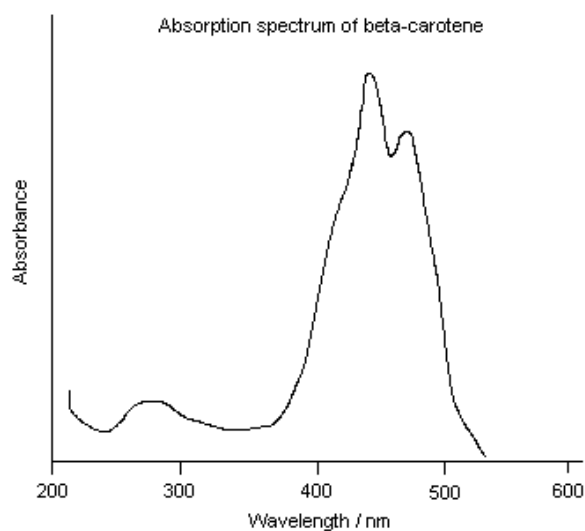


Figura 8 Espectro de absorción del β -caroteno

Este procedimiento se realiza 3 veces y se saca un promedio. Los resultados se encuentran en el capítulo 6.

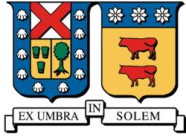
3.4.2.2 Masa total microcápsulas húmedas

La masa total de cada experiencia se determina luego del proceso de lavado y filtrado. Se masa un tubo falcon vacío y se tara la balanza, luego se recuperan la mayoría de las microcápsulas presentes en el papel de filtrado, se introducen en el tubo y se vuelve a masar.

3.4.2.3 Determinación del contenido de agua

Para determinar la humedad se toman muestras de cada set de microcápsulas y se introducen en una estufa a 80°C durante 48 horas. Se masan antes de ingresar, se vuelven a masar terminado el tiempo y una tercera vez 24 horas después para asegurarse de que el último valor no cambia. La diferencia entre las masas es el agua evaporada y se obtiene la humedad.

$$\text{Contenido de agua} = \frac{M_{\text{inicial}} - M_{\text{final}}}{M_{\text{inicial}}} * 100\%$$



3.4.2.4 Rendimiento de encapsulado y concentración de microcápsulas

Para esto se utiliza la masa (M) total seca de las microcápsulas que se calcula restando la fracción de agua

$$M_{total\ seca} = M_{total\ húmeda} * (1 - Fracción\ de\ agua)$$

Luego se toma una muestra y se disuelve en cantidades conocidas de acetato de etilo para determinar, mediante espectrofotometría y utilizando la curva de calibración, la cantidad de β -caroteno presente.

$$Rendimiento(\%) = \frac{M_{\beta\text{-caroteno encapsulado}}}{M_{\beta\text{-caroteno utilizado}}} * 100$$

$$Concentración\ microcápsulas = \frac{M_{\beta\text{-caroteno encapsulado}}(mg)}{M_{microcápsulas}(g)}$$

3.4.2.5 Microscopía de Luz y electrónica.

La microscopía de luz se utiliza para determinar el tamaño de partícula para cada caso y la microscopía electrónica para ver la superficie y morfología de las partículas.

Utilizando el microscopio óptico del laboratorio se toman fotografías un aumento de 10X. Se contabilizan alrededor de 300 microcápsulas en cada caso para obtener una muestra significativa. Con cada fotografía se procede a contornear las microcápsulas con negro utilizando Photoshop y luego guardando como archivo .png.

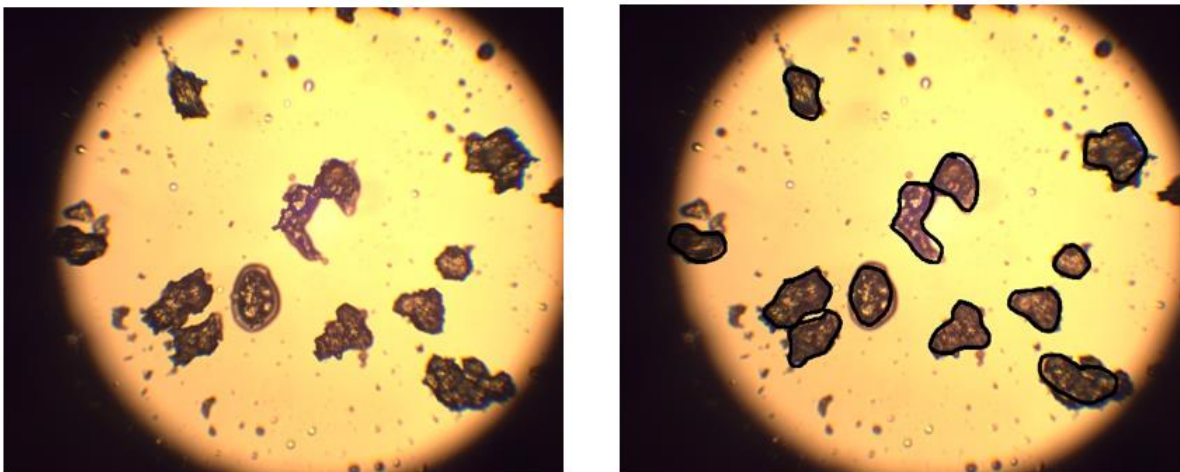
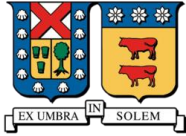


Figura 9 Contorneado de microcápsulas

Luego se ingresan al programa ImageJ. En este programa la imagen se transforma a 8 bits, y se ajusta el umbral del blanco y negro. Utilizando el mismo programa se procede a seleccionar y medir el área interna de las figuras con la herramienta de seguimiento. Utilizando una fotografía



con la escala de 0 a 100 micrones se ajustan los píxeles equivalentes y luego asociando el área de las microcápsulas al área de una circunferencia se determina un diámetro aproximado.

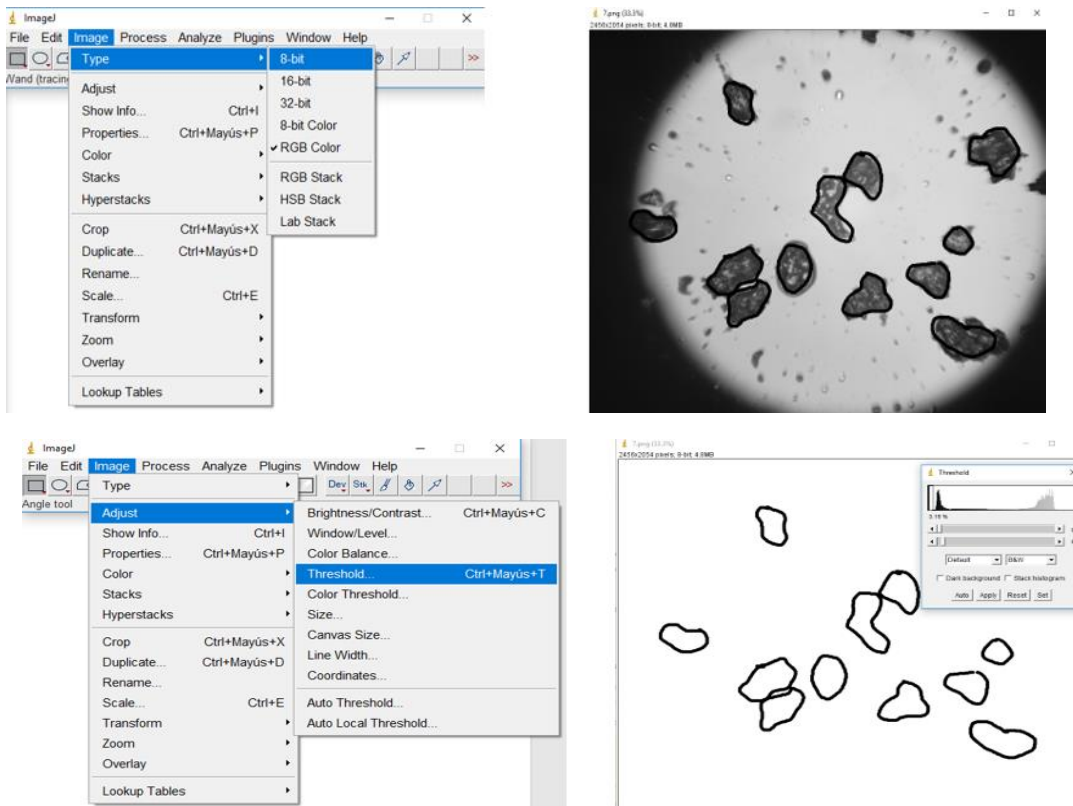
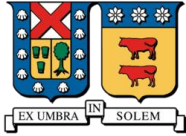


Figura 10 Medición en Imagej

Finalmente, los datos obtenidos se trabajan en Excel para determinar la bondad de ajuste mediante el test no paramétrico de kolmogorov-smirnov.

Se analizan muestras de microcápsulas de Quitosano-Goma Arábica y Quitosano-Goma Tragacanto mediante microscopía electrónica de barrido ZEISS (Oxford Instrument, EEUU).



3.4.3 Digestión *in vitro*

Muestras de 100mg de peso seco se incuban en tubos falcon con 10mL de una de dos tipos de soluciones digestivas, *solución gástrica* (HCl 2M, pH 2, 0.1% p/v pepsina; Wang et al. 2011) y *solución intestinal* (Solución buffer pH 6,8 a 7,5, pancreatina 4,8 mg/mL, Extracto de Bilis 20 mg/mL, Bicarbonato de sodio 33,6 mg/mL; Maxine et al., 2012). Cada tubo se mantiene a 37°C dentro de una estufa (Memmert GmbH & Co. KG) y se disponen en un mini-shaker que los agita para simular el movimiento peristáltico. En total son 2 tubos en solución gástrica, los cuales son retirados a los 15 y 30 minutos, y 10 tubos con solución intestinal que se retiraban a los 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 y 240 minutos. Cada muestra al terminar el tiempo de incubación se calentaba a 95°C durante 3 minutos para inactivar las enzimas digestivas y luego se enfriaba rápidamente. Las muestras eran luego centrifugadas y la solución se separaba del decantado, microcápsulas en su mayoría, y era mezclada con 25mL de Acetato de Etilo, el cual retiraba el β -caroteno al destruir la microcápsula. La cantidad de β -caroteno se obtiene mediante espectrofotometría a 450nm, utilizando como blanco la mezcla de acetato de etilo con la solución gástrica o intestinal solas. Para los cálculos se usa la curva de calibración y se contrasta con la concentración original de las microcápsulas. (Wang et al., 2011)

3.4.4 Estabilidad

Para el estudio de la estabilidad se separaron muestras en cápsulas Petri correspondientes a las combinaciones con GA y GT, en las razones 2/1. Estas se incubaron a 20°C en una estufa (Memmert GmbH & Co. KG) durante 18 días para determinar la cantidad de betacaroteno que es degradado. Cada 48 horas se mide el contenido de β -caroteno, tomando una cantidad conocida de microcápsulas, disolviéndolas en 15 mL de acetato de etilo y determinando mediante espectrofotometría a 450nm la Absorbancia para calcular la concentración de β -caroteno. Se realizan gráficos de concentración a tiempo t sobre concentración inicial (c/c_i) versus tiempo (días).



4 Resultados y análisis

4.1 Caracterización

4.1.1 Contenido de agua

En la tabla siguiente se presentan los valores obtenidos de humedad para cada preparación de microcápsulas realizada.

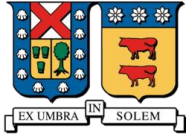
Tabla 4 Humedad microcápsulas

	Razón	Aceite [mL]	Humedad (%)
Goma Arábica	2 a 1	5	59,7 ± 0,3
	2 a 1	10	57,0 ± 2,1
	1 a 2	5	63,5 ± 0,9
	1 a 2	10	63,2 ± 1,2
Goma Tragacanto	2 a 1	5	62,9 ± 1,5
	2 a 1	10	58,7 ± 1,2
	1 a 2	5	81,2 ± 2,9
	1 a 2	10	76,0 ± 1,3
Gelatina	2 a 1	5	60,9 ± 0,7
	2 a 1	10	56,8 ± 1,6
	1 a 2	5	65,7 ± 0,4
	1 a 2	10	68,2 ± 3,2

A simple vista la combinación con Goma Tragacanto posee los mayores valores de humedad, cercana al 80%, en la razón 1/2. Y la menor humedad encontrada es del orden de 60% tanto para la Goma Arábica como para la Gelatina, ambas en razón 2/1.

Evaluando mediante un análisis de varianza multifactorial utilizando el software *Statgraphics Centurion*, con un 95% de confianza, un nivel de probabilidad de 0,05 ($p < 0,05$) y un orden máximo de interacción de 2, se determina que tanto el biopolímero utilizado como la razón entre éstos entregan diferencias significativas en los valores de humedad obtenidos, en cambio, para la cantidad de aceite no existen diferencias significativas en cada experiencia. Además, analizando mediante test de rangos múltiples (Duncan), se determina que no existe una interacción homogénea entre los factores, en cualquier combinación. Referirse al Anexo 6.2.1 para observar los resultados del análisis.

La humedad no se compara con los valores obtenidos en otras investigaciones, como en Donhowe (2014), donde variaba entre $3,5 \pm 0,7$ a $16,5 \pm 0,2$ %. Esto debido primeramente a que el proceso final conlleva un secado en spray. Otra opción utilizada es el liofilizado como es el caso de Jain (2016), pero que no realizaron mediciones de humedad de las microcápsulas.



4.1.2 Emulsión

En esta categoría, se analiza el tamaño de gota de la emulsión y potencial Z mediante Nanosizer.

Tabla 5 Potencial Z emulsión

	Aceite [mL]	Potencial Z [mV]
GT	5	-33,4 ± 4,8
	10	-34,4 ± 5,9
GA	5	-39,9 ± 6,0
	10	-43,1 ± 8,4
Gel	5	9,9 ± 3,4
	10	11,4 ± 3,6

Según los resultados obtenidos, GA y GT son los que presentan una mayor magnitud en potencial Z, logrando valores mucho mayores que los de Gelatina, entre 3 a 4 veces más grandes, mientras que GA logra un promedio un poco mayor que GT. Esto repercute un poco en la capacidad de formar microcápsulas, debido a que determina el grado de dispersión de las gotas de aceite, por lo que al Quitosano le será más sencillo envolverlas. Mientras la magnitud sea más grande, sin importar el signo, la emulsión es más estable.

Los valores obtenidos para el caso de GT se corresponden con los obtenidos en la investigación de Jain (2016), dónde a pH 4 el potencial Z ronda los $-33,89 \pm 0,98$ mV

Tabla 6 Tamaño de gota emulsión

	Aceite [mL]	Diámetro [nm]
GT	5	2874
	10	3826
GA	5	1610
	10	2750
Gel	5	511
	10	678

Para el caso del tamaño de gota los valores difieren bastante, pero a simple vista la Gelatina tendría tamaños menores.

4.1.3 Rendimiento de encapsulación y concentración de microcápsulas

A continuación, se presentan los gráficos de rendimiento para cada par de biopolímeros utilizado en los experimentos. La razón utilizada (Quitosano/biopolímero) corresponde a 2/1 y 1/2, y A5 y A10 corresponde a los ml de aceite añadidos (5 y 10 mL).

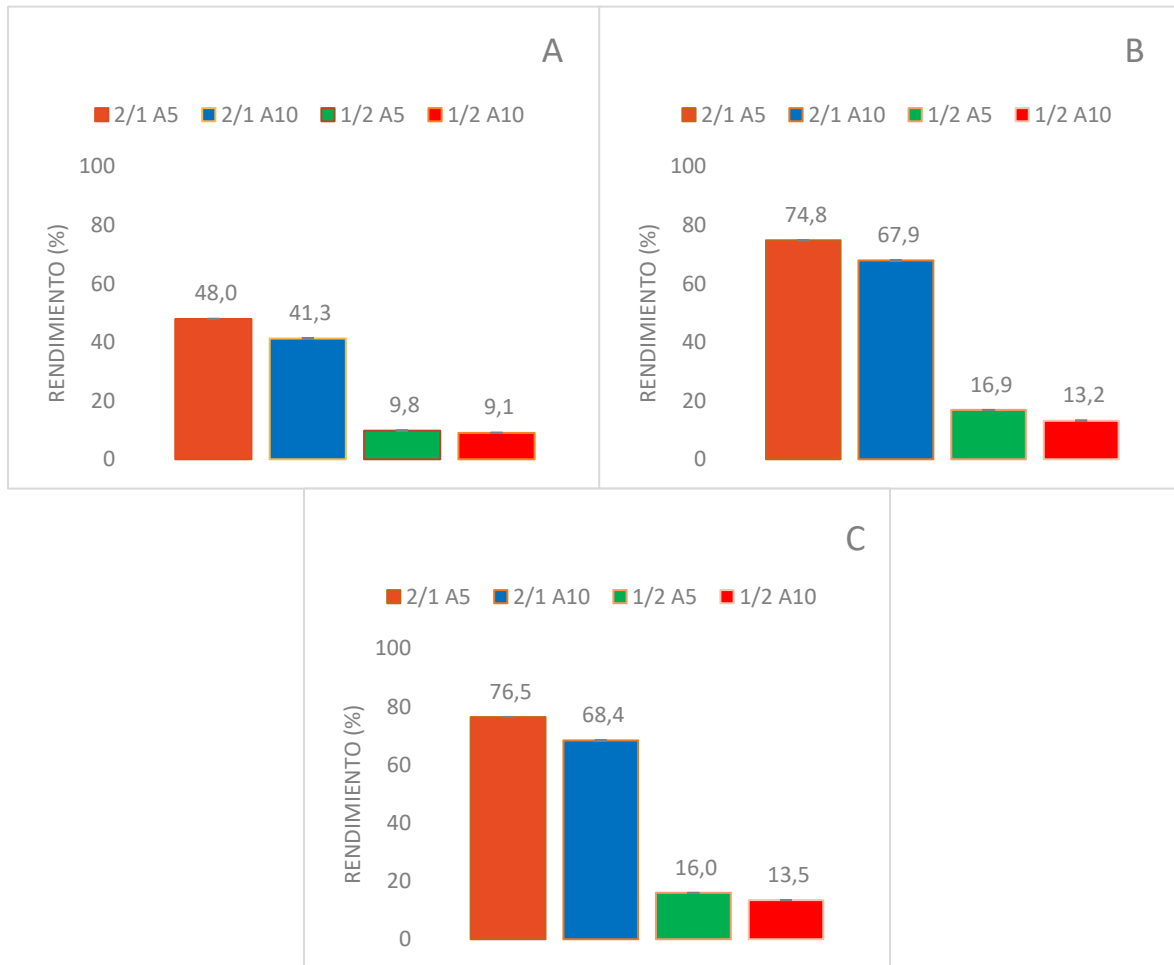


Figura 11 Gráficos de Rendimiento de microencapsulado de A) Quitosano-Gelatina, B) Quitosano-Goma Arábica y C) Quitosano-Goma Tragacanto

Se aprecia a simple vista una gran diferencia entre las eficiencias de encapsulación entre las razones utilizadas, dónde para cada combinación la razón 2/1 presenta mayores valores. Gelatina presenta los menores valores de eficiencia entre los polímeros.

Otra gran diferencia que se aprecia es en cuanto al aceite utilizado, dónde a 10 mL la eficiencia fue menor, debido a que no se logra encapsular totalmente. La mayor eficiencia es del $76,5 \pm 1,3\%$, para el caso de Q-GT 2/1 A5, seguida de cerca por Q-GA 2/1 A5 con un $74,8 \pm 0,7\%$.

Los resultados obtenidos por Jain (2016) muestran unas eficiencias similares, logrando una eficiencia de encapsulado cercana al $82,51 \pm 0,41\%$ de β -caroteno para la razón 2/1 de Caseína-GT.



En cuanto al análisis de varianza (ANOVA) los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 6 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Rendimiento (%) con un 95% de nivel de confianza. En cuanto a las pruebas de rangos múltiples (Duncan) se identifican 2 factores que comparten un grupo homogéneo, GA y GT, donde no existen entre ellos diferencias estadísticamente significativas. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0. Referirse al Anexo 6.2.2 para observar los resultados del análisis.

Se presentan a continuación los gráficos de concentración para cada combinación de biopolímeros.

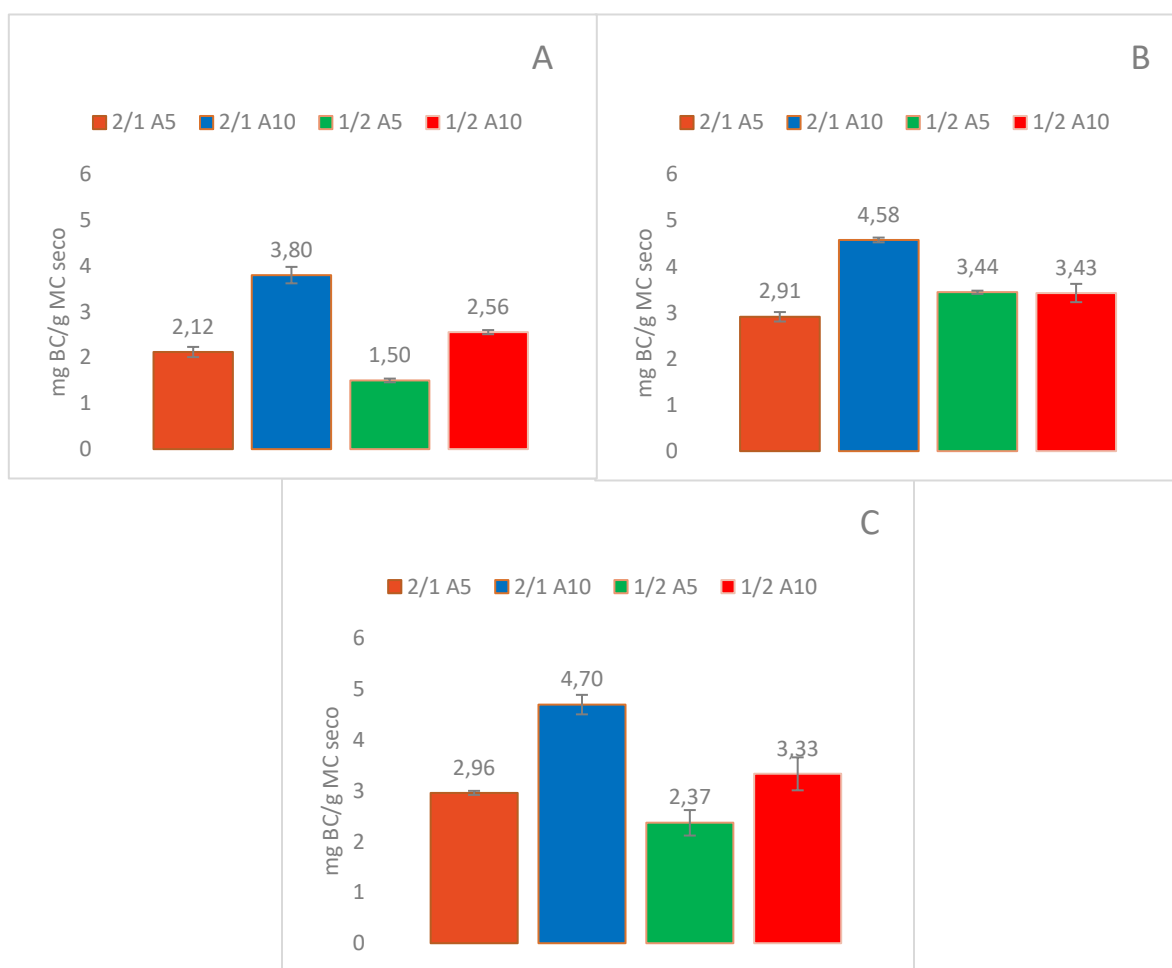
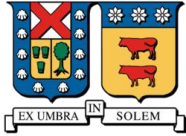


Figura 12 Gráficos de Concentración de microencapsulado de A) Quitosano-Gelatina, B) Quitosano-Goma Arábica y C) Quitosano-Goma Tragacanto

Gracias al análisis de la varianza (ANOVA) se determina que los factores presentan un efecto estadísticamente significativo sobre la concentración con una confianza del 95% ($p < 0,05$). Y



mediante el test de rangos múltiples (Duncan) se concluye que no existen factores que compartan un mismo grupo homogéneo. Referirse al Anexo 6.2.3 para observar los resultados del análisis.

Lo que más llama la atención de los datos analizados es la diferencia que existe entre los valores de rendimiento de encapsulación y concentración de las microcápsulas. Dado que acá si bien se logra un mayor rendimiento en el caso de utilizar menos cantidad de aceite en el proceso, la concentración de betacaroteno de las microcápsulas era menor. Caso contrario al utilizar mayor cantidad de aceite. Esto se debe primeramente a que al haber menos disponibilidad de aceite se facilitaba la capacidad de encapsular, pero la carga finalmente es menor, y se llega a un punto en que las microcápsulas se saturan y ya no pueden encapsular más cantidad. Realizando más experimentos se podría llegar a determinar el caso óptimo de estas condiciones para lograr un buen rendimiento y una alta concentración.

4.1.4 Tamaño Microcápsulas

Para el caso de la combinación Quitosano-Goma Arábica, los promedios de diámetro de microcápsula corresponden a 84,6 μm para el caso de 5 mL de aceite, y 77,2 μm para la mezcla con 10 mL.



Figura 13 Histograma tamaño de partículas Quitosano - Goma Arábica

Se utiliza el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov que determina la bondad de ajuste de dos distribuciones de probabilidad entre sí en situaciones donde la varianza es grande. Los análisis se realizan con un 95% de confianza y un nivel de probabilidad de 0.05 ($p < 0.05$) aceptándose en cada caso.

Para el caso de la mezcla Quitosano-Goma Tragacanto, existe una pendiente inicial mayor, debido a una mayor frecuencia en los primeros tramos de diámetros. El diámetro promedio corresponde a 65,8 μm para A5 y 71,8 μm para A10. Igualmente es aplicado el test K-S, con un 95% de confianza, aceptándose para cada caso.

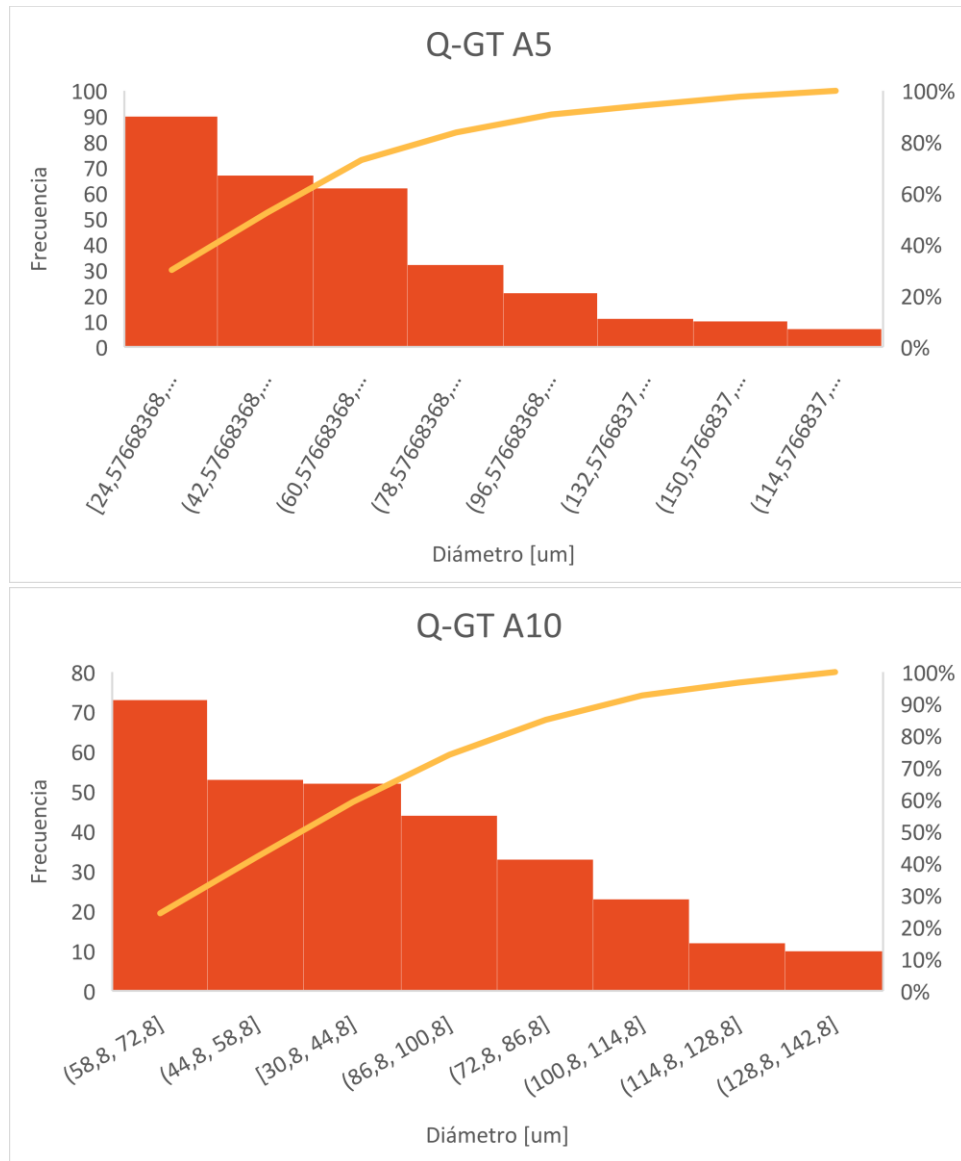


Figura 14 Histograma tamaño de partículas Quitosano - Goma Tragacanto

Los resultados de esta sección corresponden a imágenes a distintas escalas de las diversas combinaciones utilizadas para Goma Tragacanto y Goma Arábica. A continuación, se presentan fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

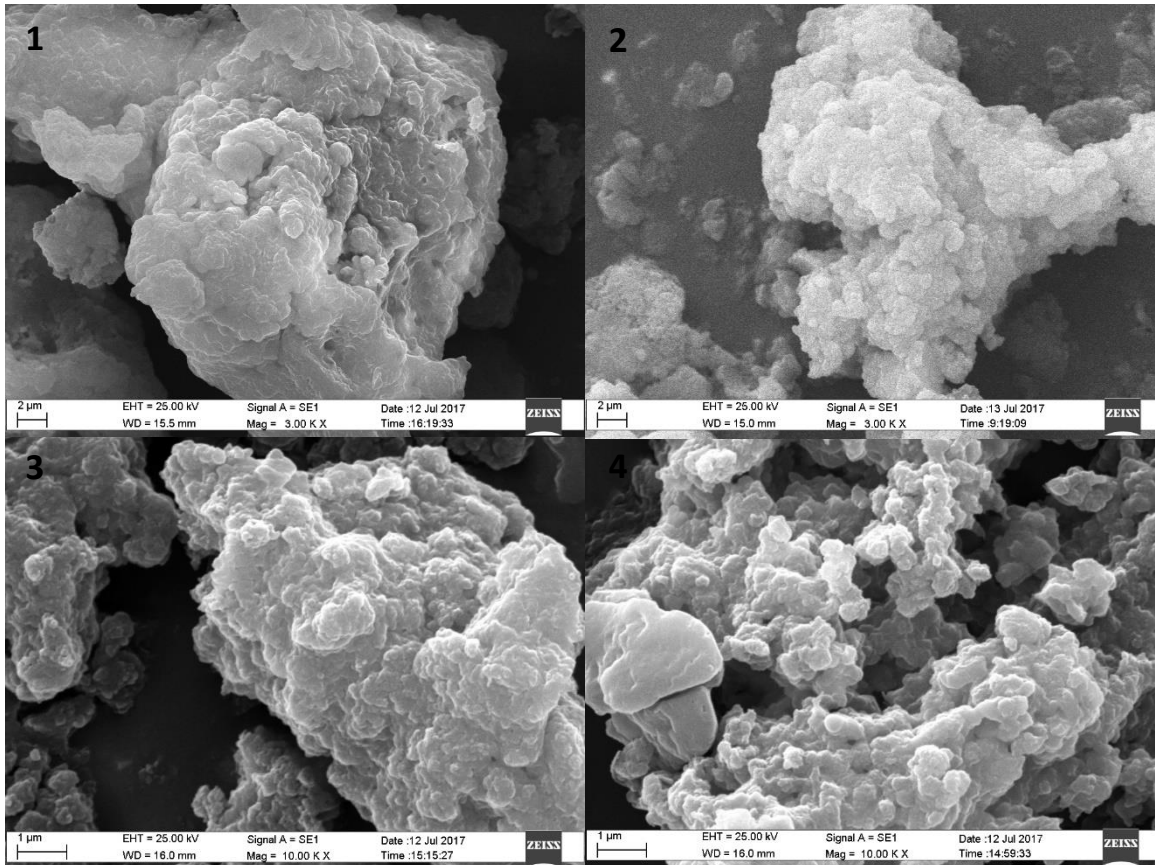


Figura 155 SEM microcápsulas 1) GA 2/1 A5; 2) GA 2/1 A10; 3) GT 2/1 A5; GT 2/1 A10

Para cada caso se aprecia una superficie bastante irregular, que facilita el atrapamiento de aceite y humedad entre los poros. El resto de las fotografías se presentan en el Anexo

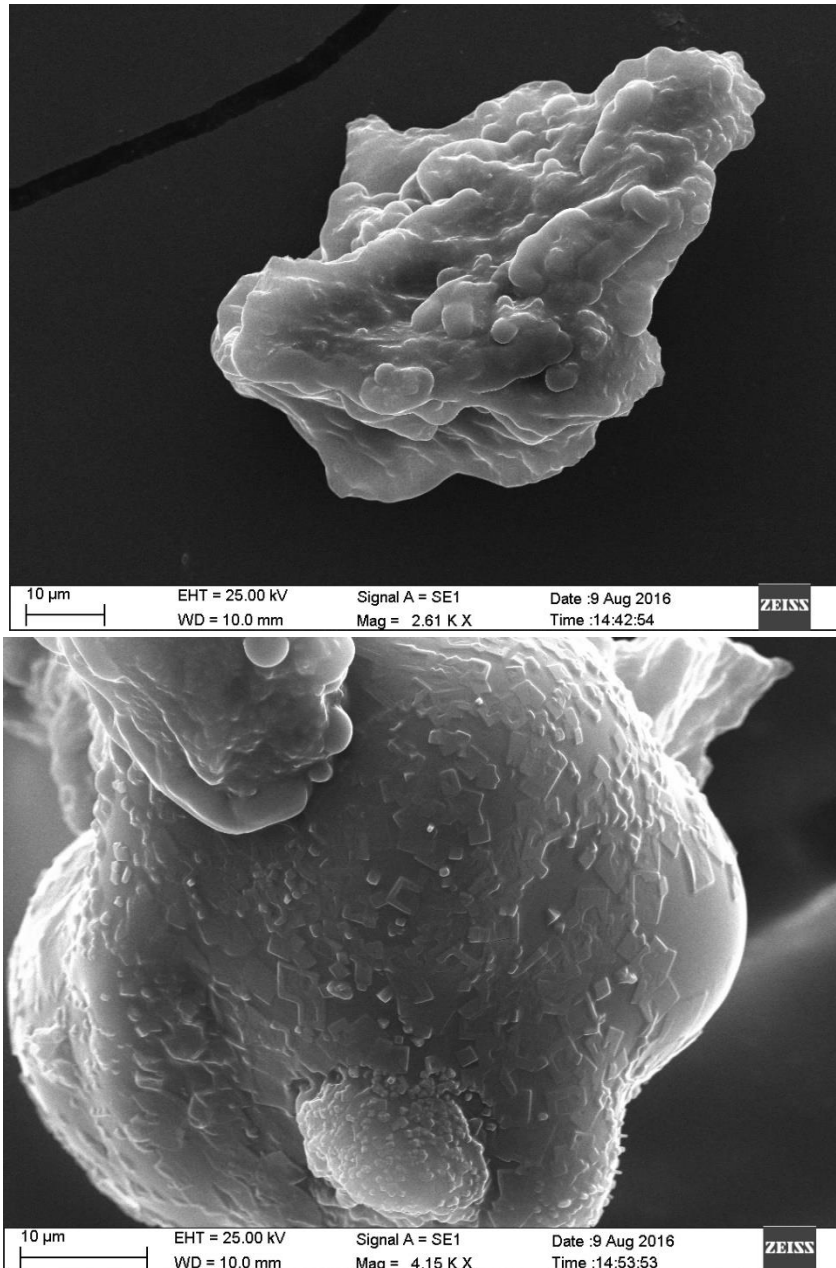


Figura 16 Microcápsulas liofilizadas



4.2 Digestión in vitro

En la tabla 7 se presentan los datos de liberación obtenidos para cada combinación utilizada en la fase intestinal.

Tabla 7 Liberación Fase Intestinal

minuto	GA		GT		Gel	
	A5	A10	A5	A10	A5	A10
30	0,42%	0,41%	0,42%	0,38%	1,17%	2,25%
60	0,48%	0,40%	0,42%	0,38%	1,17%	2,22%
120	0,46%	0,38%	0,43%	0,40%	1,18%	2,33%
240	0,53%	0,42%	0,38%	0,38%	1,04%	2,24%

No se aprecia liberación en ninguna de las combinaciones utilizadas. Aparte del método utilizado mencionado, se probaron otros similares, donde cambiaban factores como las enzimas digestivas, distintos pH, distintos métodos de agitación, sin poder observar digestión de las microcápsulas.

Se investigaron las posibles causas a este problema y se fue aislando posibles factores por los cuales la digestión no se llevaba a cabo. Uno de los primeros en analizarse fue la presencia de humedad debido a no utilizar ni secado en spray, ni liofilización. Se analizó una muestra liofilizada de microcápsulas, la cual tampoco presentó liberación en la fase intestinal, lo que lleva a concluir que la humedad de las microcápsulas y/o presencia de aceite en los poros de las microcápsulas no estaría interfiriendo.

La siguiente posible razón fue una unión muy fuerte del crosslinker, tripolifosfato (TPP), que podría estar causando este problema (Gierszewska et al., 2011; Mi et al., 1999). Si se realizaba una centrifugación de las microcápsulas, para separar la fase líquida de éstas, al no tener el crosslinker las microcápsulas se desarmaban totalmente. Se prepararon entonces microcápsulas sin TPP, donde fue necesario saltarse el paso de centrifugación para evitar la destrucción de las microcápsulas por la fuerza aplicada. Aun así, no se observa liberación en la fase intestinal.

Cabe destacar que en el caso de la Gelatina se aprecia un valor un poco superior al resto, dado probablemente a que para esta combinación filtrar era más dificultoso, aumentando la posible carga exterior de aceite entre los poros.



En cuanto a la fase gástrica, para todos los casos pareciera no haber digestión, al menos en el tiempo de residencia utilizado, nuevamente los valores son pequeños, tratándose del aceite que recubre las microcápsulas. Sucede lo mismo que en la fase intestinal con los valores en el caso de la Gelatina, debido a mayor presencia de aceite externo.

Tabla 8 Liberación Fase Gástrica

minuto	GA		GT		Gel	
	A5	A10	A5	A10	A5	A10
15	0,54%	0,43%	0,48%	0,40%	1,38%	2,37%
30	0,66%	0,50%	0,58%	0,48%	1,82%	2,82%

Con estos datos, y otras pruebas realizadas sin éxitos, se concluye que estas preparaciones no son aptas para liberación controlada en el intestino delgado.

Se realizó un experimento de digestión con microcápsulas de Cas-GT. A continuación, se presenta el gráfico de liberación obtenido.

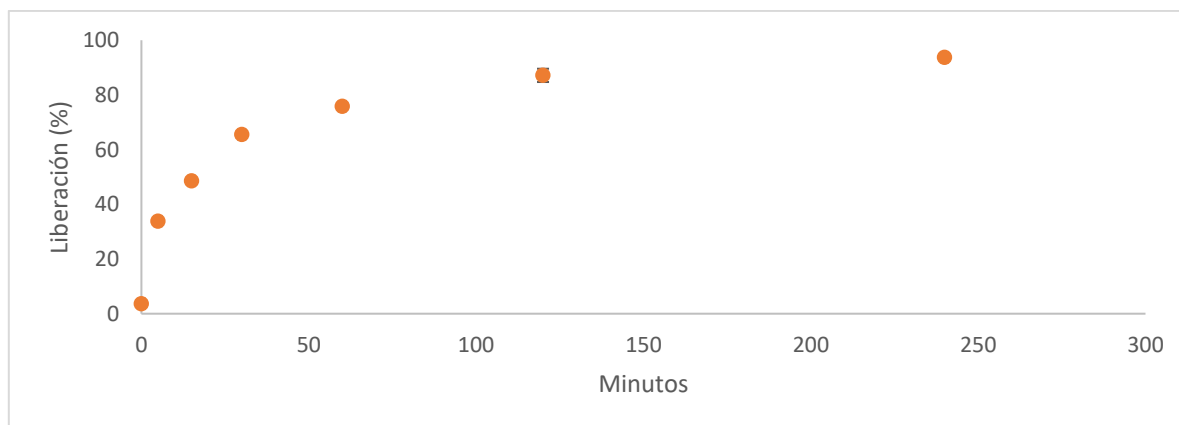
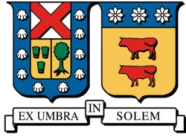


Figura 16 Gráfico digestión microcápsulas de Caseína-goma tragacanto

La caseína es una proteína que al estar a un pH ácido se coagula y precipita, y que al subirlo (mayor a 4,6) vuelve a la normalidad. Por esta razón es que al utilizarse para microencapsular logra mantener la estructura de la microcápsula durante la fase gástrica de la digestión, y destruir la microcápsula al llegar a la fase intestinal dónde el pH sube.



4.3 Estabilidad

Finalmente, los estudios de estabilidad apuntaban a ver la degradación del betacaroteno en condiciones de almacenamiento a temperaturas elevadas (20°C-25°C, debido a que la temperatura variaba bastante en la estufa). Para estas pruebas solo se consideraron las combinaciones de GT y GA, en las razones Quitosano-Biopolímero 2/1. Se contrasta la concentración en el tiempo respecto de la inicial (c/ci) versus los días de almacenamiento.

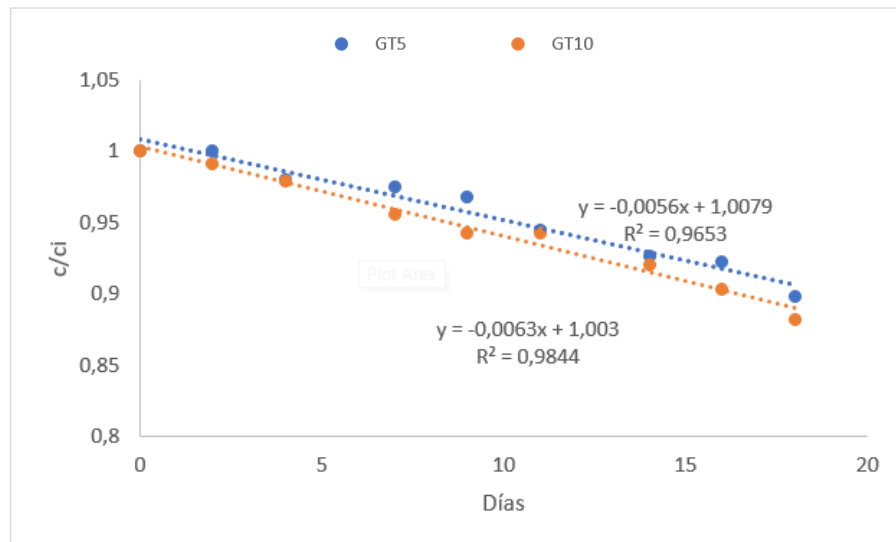


Figura 179 Gráficos de Estabilidad microcápsulas de Quitosano-Goma Tragacanto razón 2/1

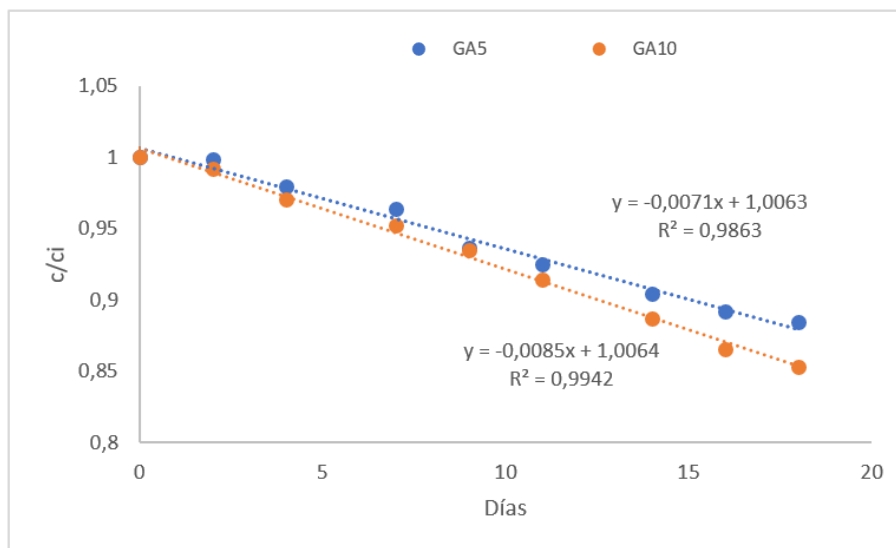
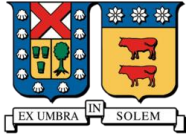


Figura 18 Gráficos de Estabilidad microcápsulas de Quitosano-Goma Arábica razón 2 /1



Para todos los casos se logra apreciar una degradación de betacaroteno de entre un 10 y un 15 % de. Muestra un comportamiento lineal con respecto al tiempo, al menos en los días analizados. Las mayores pendientes corresponden a la GA, por lo que en este caso la degradación sería mayor

La estabilidad de las microcápsulas de caseína se presenta a continuación.

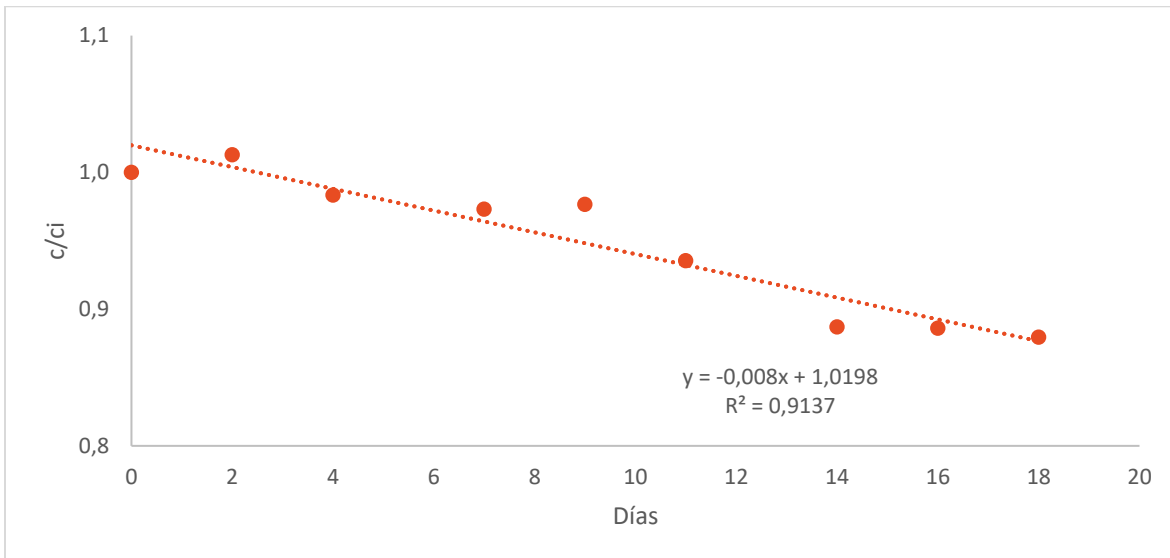


Figura 19 Gráficos de Estabilidad microcápsulas de Caseína-Goma Tragacanto

Es muy similar a las anteriores, entre un 15 y un 10% de degradación a los 18 días.

Finalmente se realiza una prueba con betacaroteno libre para contrastar obteniendo el siguiente gráfico.

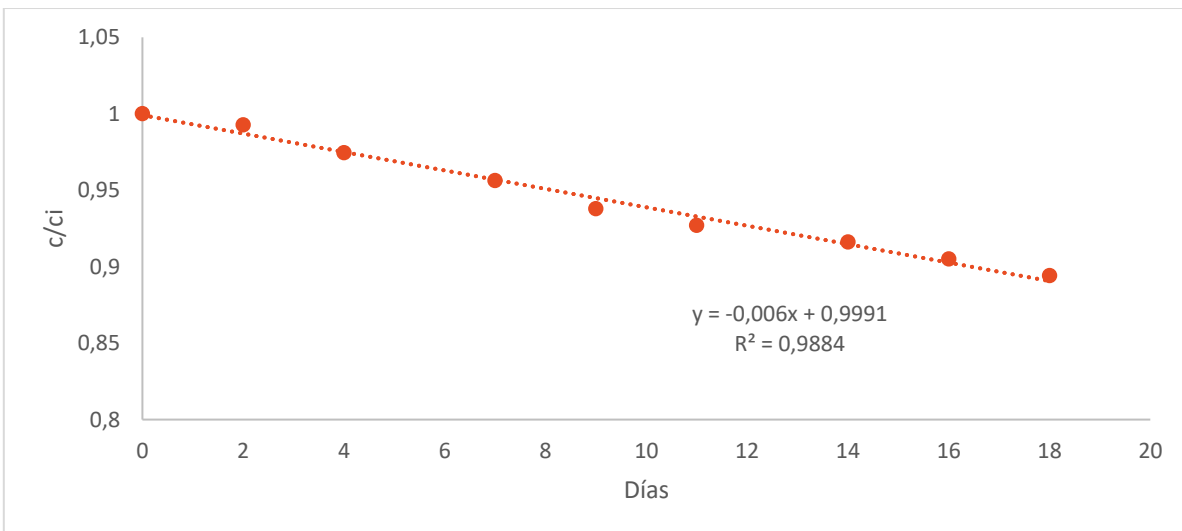
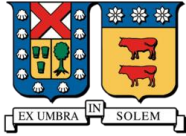


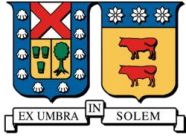
Figura 20 Gráficos de Estabilidad betacaroteno libre



No se evidencian grandes diferencias entre la presencia de una capa protectora, microcápsula, versus el betacaroteno solo, esto probablemente debido a que solo se está analizando la pérdida por calor, que logra penetrar con facilidad la capa infima de la microcápsula.

Fueron realizados ensayos estadísticos F y t para comparar las pendientes de los gráficos de estabilidad. En cuanto a las diferencias entre las pendientes para GA5 y GT5 se determina, con 95% de confianza tanto para el ensayo F y el ensayo t, que las varianzas son homogéneas y que las pendientes son estadísticamente diferentes. Lo mismo ocurre para el caso de la comparación entre GA10 y GT10 y entre GA5 y GA10; finalmente entre GT5 y GT10 las pendientes resultan ser estadísticamente similares. Para todos los casos se rechaza la posibilidad de que la pendiente sea 0.

Las pendientes en el caso del betacaroteno libre también presentan diferencias estadísticas con respecto a las microcápsulas, habiendo en este caso una menor degradación. Posiblemente se deba a la falta de liofilizado o secado en spray, lo que no deja unas muestras totalmente secas, pudiendo influenciar esto en los valores. Además por esta misma razón la muestra se encostraba.



5 Conclusiones

La protección del β -caroteno del ambiente y durante la digestión se logra gracias a la microencapsulación por coacervación compleja de biopolímeros, demostrado en los resultados obtenidos, donde no existe degradación gástrica, y la estabilidad de almacenaje muestra ser similar a la de betacaroteno libre. El utilizar Caseína en reemplazo de Quitosano en la fabricación de las microcápsulas las hace aptas para la liberación intestinal, logrando el objetivo primordial de esta investigación.

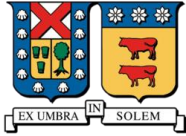
Las razones de biopolímero utilizadas impactan de gran manera el rendimiento de encapsulación de las microcápsulas, siendo una mayor fracción de quitosano importante para lograr un mayor porcentaje.

La cantidad de aceite con betacaroteno también influye, logrando un rendimiento de encapsulado mayor al utilizar menos aceite. Esto si repercute en la concentración de betacaroteno final de las microcápsulas.

La estabilidad en el almacenaje es una característica que no se logra mejorar mediante la microencapsulación, pero que puede deberse a la falta de liofilizado o secado en spray.

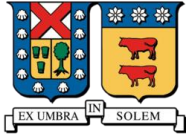
En cuanto a la digestión, no se logra una liberación controlada utilizando Quitosano como biopolímero principal, pero al usar Caseína como reemplazo si se aprecia liberación.

Como recomendaciones es necesario realizar más estudios utilizando Caseína, a distintas razones y cantidades de aceite, ya que demuestra ser una excelente opción para lograr la protección y la liberación controlada.



6 Referencias

- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J.-L., & Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1–2), 359-378
- Butstraen et al., "Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan", *Carbohydrate Polymers* 99 (2014) 608– 616
- Donhowe et al., "Characterization and in vitro bioavailability of b-carotene: Effects of microencapsulation method and food matrix" *LWT - Food Science and Technology* 57 (2014) 42-48
- Espinoza et al., "Gum Arabic-Chitosan Complex Coacervation", *Biomacromolecules* 2007, 8, 1313-1318
- F. Granado-Lorencio et al., "Biomarkers of carotenoid bioavailability", *Food Research International* 2017
- Gavlighi et al., "Tragacanth Gum: Structural Composition, Natural Functionality and Enzymatic Conversion as Source of Potential Prebiotic Activity", Kgs. Lyngby: Technical University of Denmark (DTU).
- Ghosh "Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective, firsted", Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH and CO KGaA. 2016
- Gierszewska et al., "Influence of crosslinking process conditions on molecular and supermolecular structure of chitosan hydrogel membrane", *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its ...*, Volume XVI, 2011
- Guzey & McClements , "Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry." *Advances in Colloid and Interface Science* 128–130 (2006) 227–248.
- Hu et al., "Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum arabic and lecithin and evaluation of drying technologies" *International Journal of Biological Macromolecules* 2016
- Jain et al., "Characterization of Microcapsulated -Carotene Formed by Complex Coacervation Using Casein and Gum Tragacanth", *International Journal of Biological Macromolecules* 2016
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 305-313.
- Meyers, M.A., et al., "Biological Materials: Structure & Mechanical Properties", *Progress in Materials Science*, Vol. 53, p. 1 (2008)



- Mi et al., “Kinetic Study of Chitosan-Tripolyphosphate Complex Reaction and Acid-Resistive Properties of the Chitosan-Tripolyphosphate Gel Beads Prepared by in-Liquid Curing Method”, *Polymer Physics*, Volume 37, Issue 14, 1999.
- Paulo & Santos, “Design of experiments for microencapsulation applications: A review”, *Materials Science & Engineering C* 2017
- Quanquan et al., “Factors affecting the bioaccessibility of β -carotene in lipid-based microcapsules: Digestive conditions, the composition, structure and physical state of microcapsules”, *Food Hydrocolloids* Volume 77, April 2018, Pages 187-203
- Shanmugama, A., & Ashokkumar, M. (2014). Ultrasonic preparation of stable flax seed oil emulsions in dairy systems - Physicochemical characterization. *Food Hydrocolloids*, 39, 151-162
- Shao et al. “Chemical Stability and in vitro release properties of betacarotene in emulsions stabilized by *Ulva fasciata* polysaccharide”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 102, September 2017, Pages 225-231
- Shashank et al., “Ultrasound emulsification: Effect of ultrasonic and physicochemical properties on dispersed phase volume and droplet size”, *Ultrasonics Sonochemistry* 15 (2008) 554–563
- Sherry A. Tanumihardjo, “Factors Influencing the Conversion of Carotenoids to Retinol: Bioavailability to Bioconversion to Bioefficacy”, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 72 (1), 2002, 40–45
- Silva et al., “Ultrasound-assisted formation of annatto seed oil emulsions stabilized by biopolymers”, *Food Hydrocolloids* 47 (2015) 1-13
- Tadros, T. F. (2009). *Emulsion science and technology: a general introduction*. In *Emulsion Science and Technology*, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA (pp. 1–56). Weinheim
- Vodnar et al., “Selenium enriched green tea increase stability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* in chitosan coated alginate microcapsules during exposure to simulated gastrointestinal and refrigerated conditions”, *LWT - Food Science and Technology* 57 (2014) 406-411

7 Anexos

7.1 Curva de Calibración

Los gráficos que se presentan a continuación corresponden a las 3 curvas calibración realizadas para determinar la concentración de betacaroteno en Acetato de Etilo

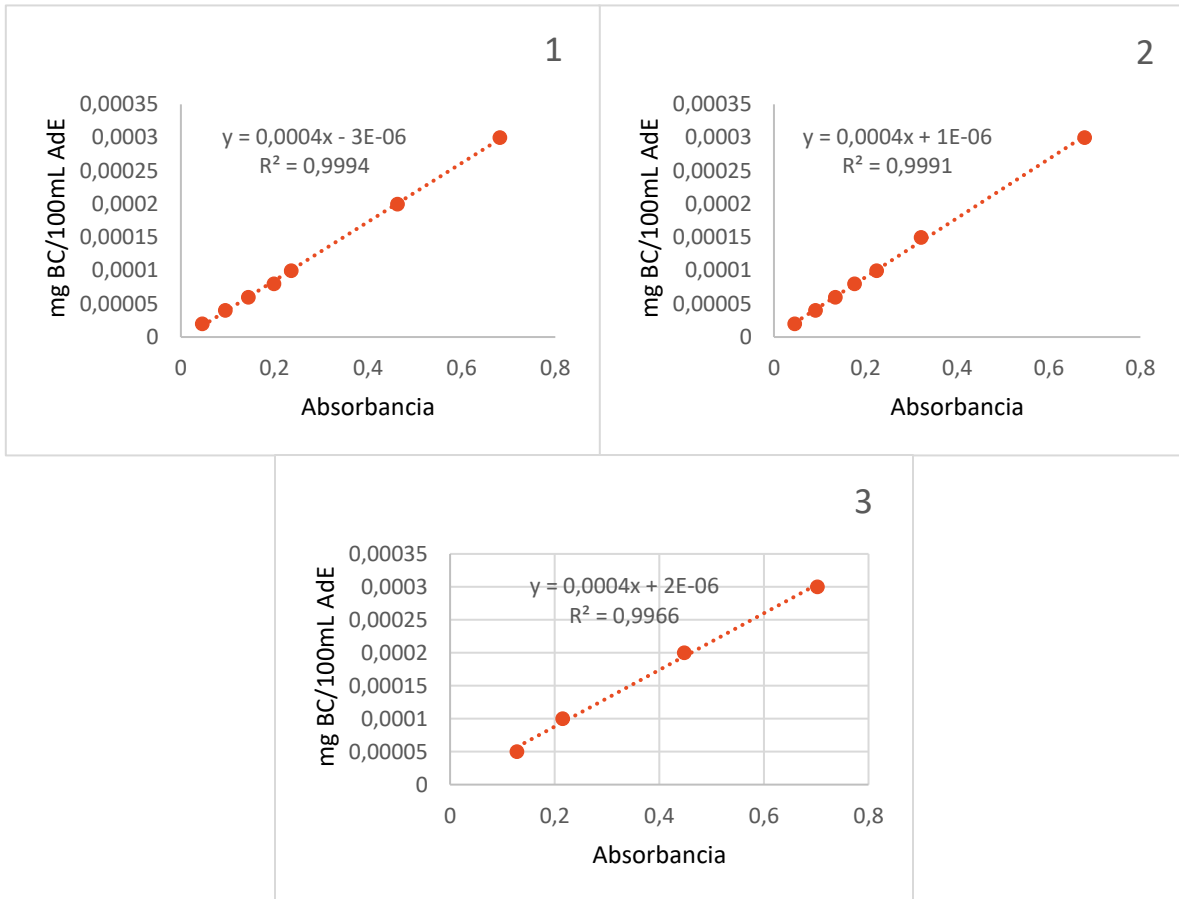
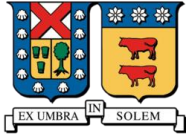


Figura 21 Curvas de Calibración

La fórmula para determinar la concentración corresponde finalmente a

$$y(\% \text{ mg}/100\text{mL}) = 4 * 10^{-4} \left(\frac{\% \text{ mg}/100\text{mL}}{A} \right) x(A) + 0$$



7.2 ANOVA resultados

7.2.1 Humedad

Análisis de Varianza para Humedad [%] - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Polímero.	511,122	2	255,561	74,29	0,0000
B:Razón [-]	958,934	1	958,934	278,77	0,0000
C: Aceite [mL]	49,4678	1	49,4678	14,38	0,0008
INTERACCIONES					
AB	265,734	2	132,867	38,62	0,0000
AC	25,7039	2	12,8519	3,74	0,0375
BC	16,0	1	16,0	4,65	0,0405
RESIDUOS	89,4383	26	3,43994		
TOTAL (CORREGIDO)	1916,4	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Humedad [%] por Polímero.

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Polímero.	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
GA	12	60,8583	0,535408	X
Gel	12	62,875	0,535408	X
GT	12	69,6667	0,535408	X

Contraste	Sig.	Diferencia
GA - GT	*	-8,80833
GA - Gel	*	-2,01667
GT - Gel	*	6,79167

* indica una diferencia significativa.

Método: 95,0 porcentaje Duncan

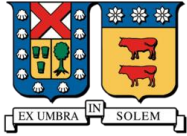
Razón [-]	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	18	59,3056	0,437158	X
0,5	18	69,6278	0,437158	X

Contraste	Sig.	Diferencia
0,5 - 2	*	10,3222

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Aceite [mL]	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	18	63,2944	0,437158	X
5	18	65,6389	0,437158	X

Contraste	Sig.	Diferencia
5 - 10	*	2,34444



Medias y 95,0% de Fisher LSD

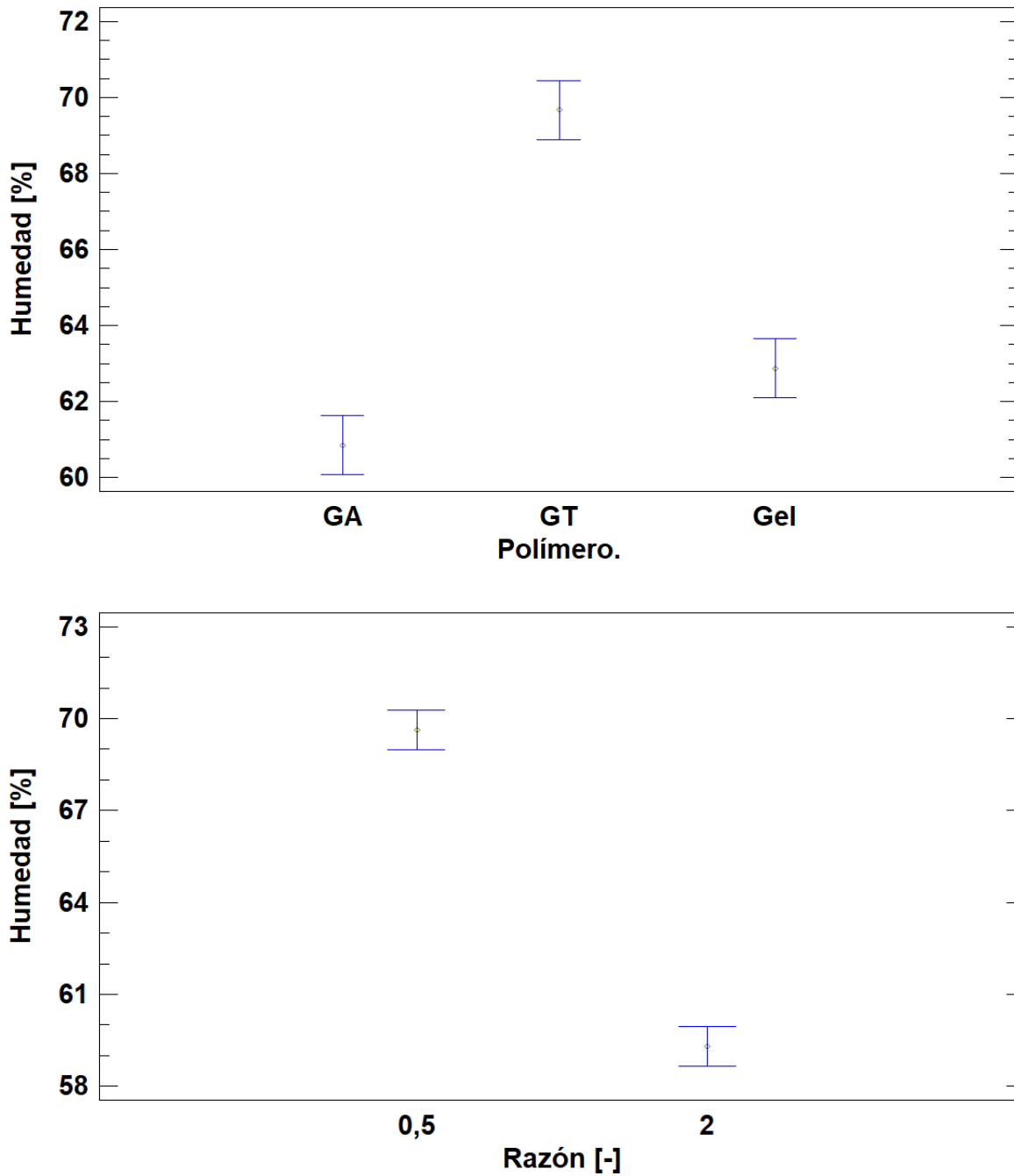


Figura 22 Gráficos de Medias Humedad, Factores Polímero y Razón

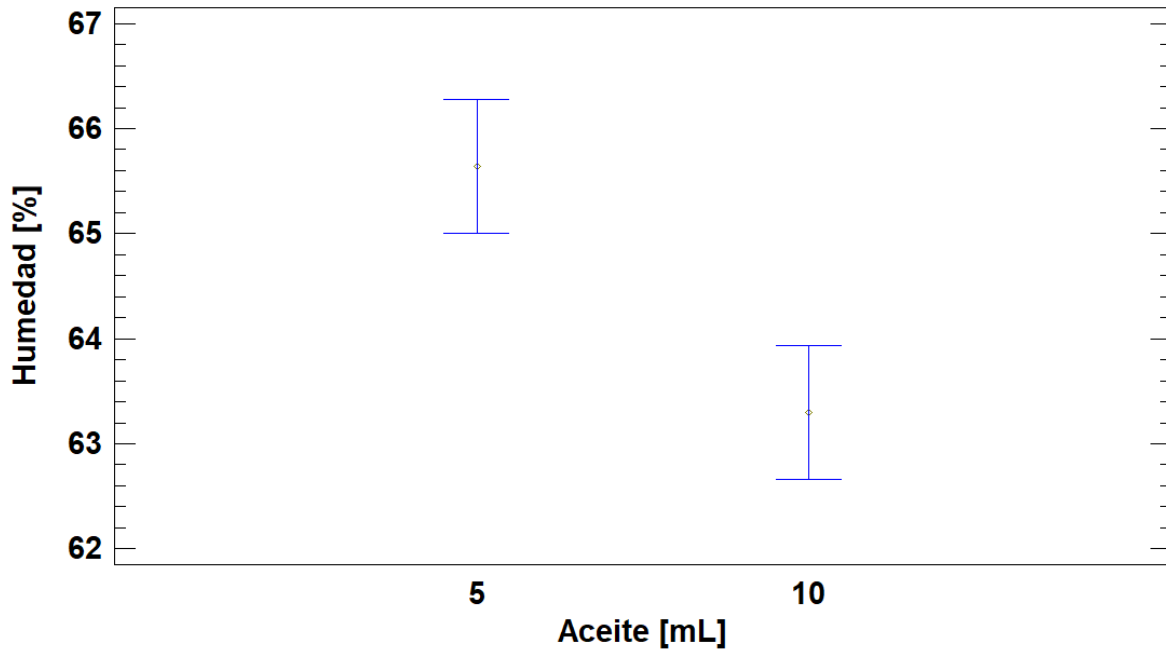
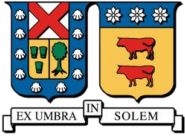


Figura 23 Gráficos de Medias Humedad, Factor Aceite.

Gráfico de Interacciones

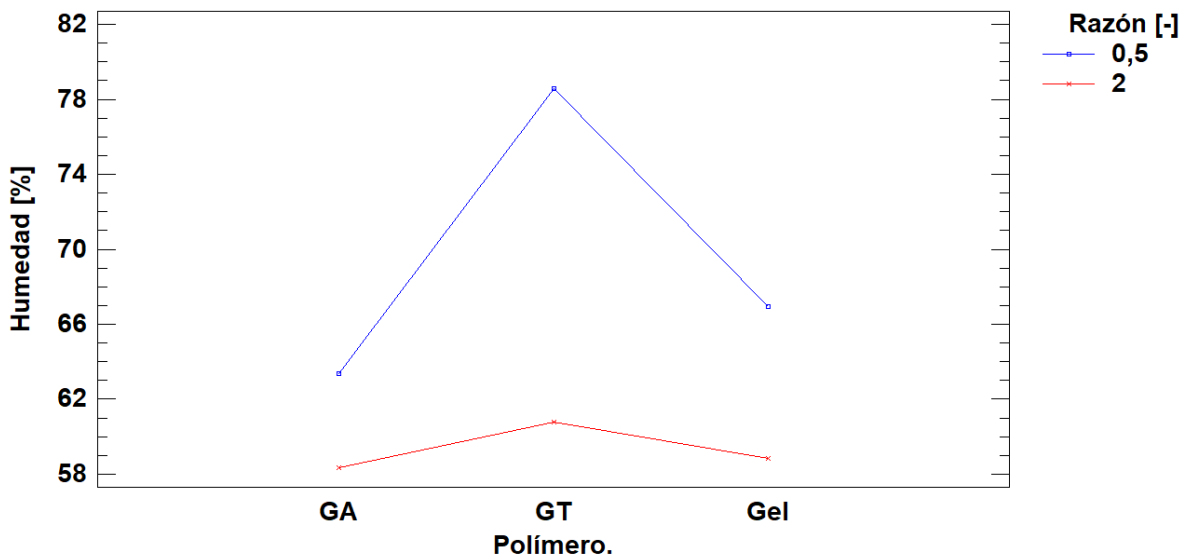


Figura 24 Gráfico de Interacciones Humedad, Factores Polímero-Razón

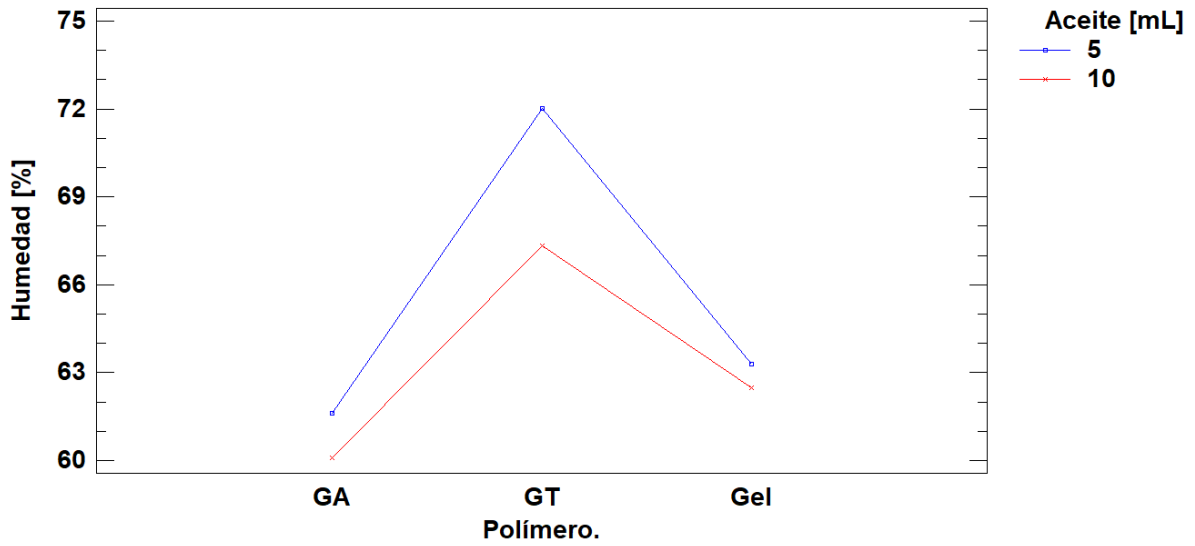
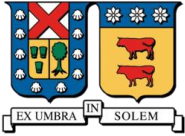


Figura 25 Gráfico de Interacciones Humedad, Factores Polímero-Aceite

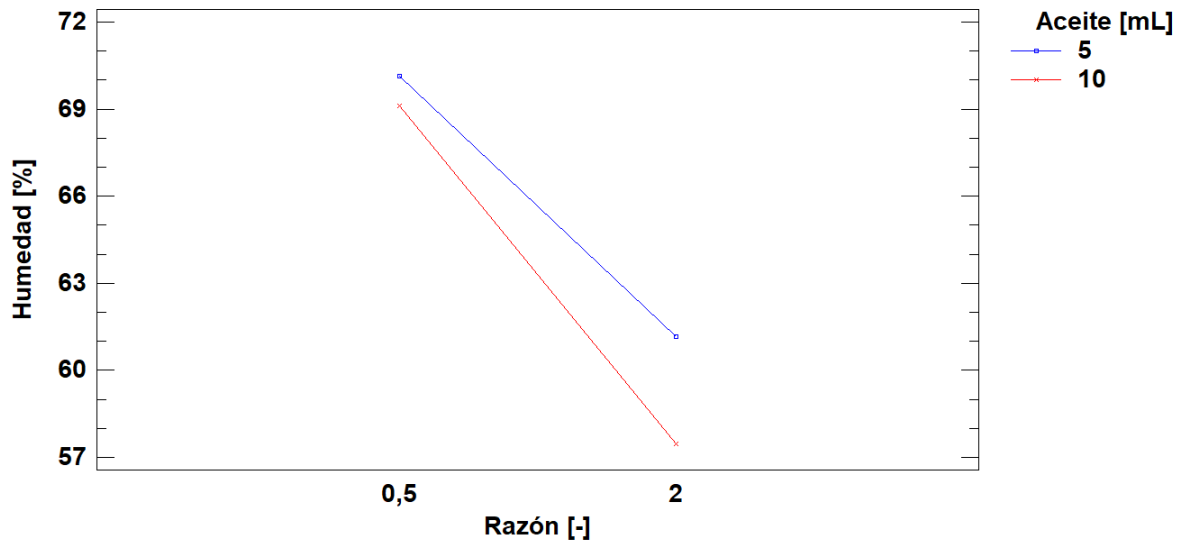
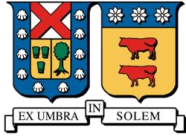


Figura 26 Gráfico de Interacciones Humedad, Factores Razón-Aceite



7.2.2 ANOVA Rendimiento

Análisis de Varianza para Rendimiento [%] - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Polímero.	2140,51	2	1070,26	1782,94	0,0000
B:Razón [-]	22265,6	1	22265,6	37092,18	0,0000
C:Aceite [mL]	204,014	1	204,014	339,87	0,0000
INTERACCIONES					
AB	953,941	2	476,97	794,58	0,0000
AC	5,06722	2	2,53361	4,22	0,0259
BC	55,0069	1	55,0069	91,64	0,0000
RESIDUOS	15,6072	26	0,600278		
TOTAL (CORREGIDO)	25639,8	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Método: 95,0 porcentaje LSD

Polímero.	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Gel	12	27,0333	0,223659	X
GA	12	43,2	0,223659	X
GT	12	43,575	0,223659	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
GA - GT		-0,375	0,650167
GA - Gel	*	16,1667	0,650167
GT - Gel	*	16,5417	0,650167

Método: 95,0 porcentaje LSD

Razón [-]	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0,5	18	13,0667	0,182616	X
2	18	62,8056	0,182616	X

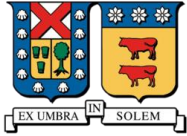
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0,5 - 2	*	-49,7389	0,530859

Método: 95,0 porcentaje LSD

Aceite [mL]	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	18	35,5556	0,182616	X
5	18	40,3167	0,182616	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
5 - 10	*	4,76111	0,530859

* indica una diferencia significativa.



Medias y 95,0% de Fisher LSD

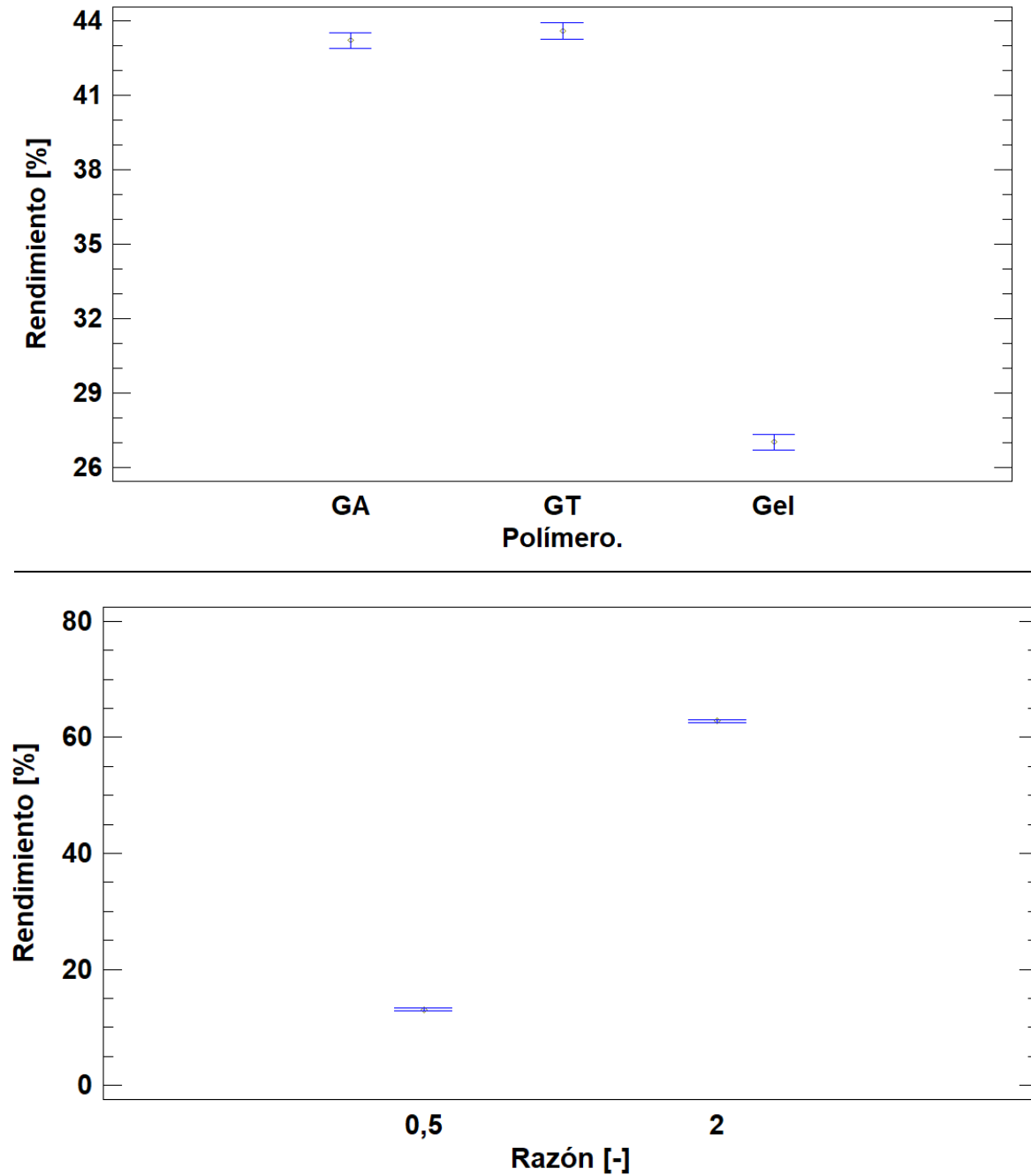


Figura 27 Gráficos de Medias Rendimiento, Factores Polímero y Razón

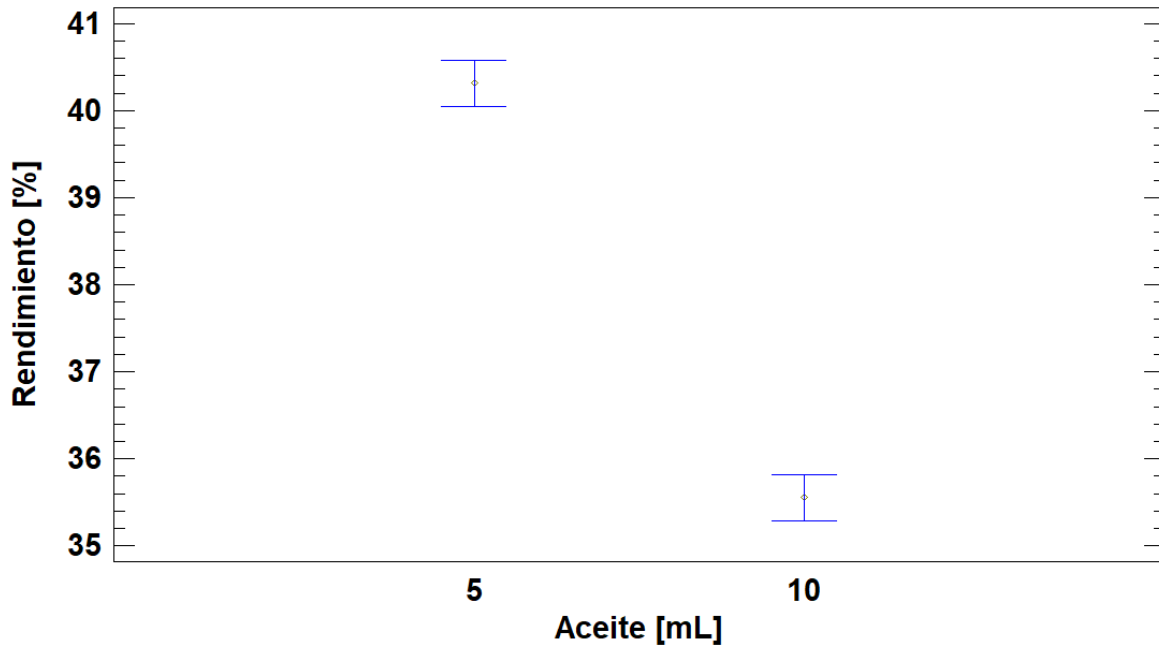
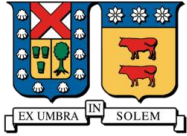


Figura 28 Gráficos de Medias Rendimiento, Factor Aceite

Gráfico de Interacciones

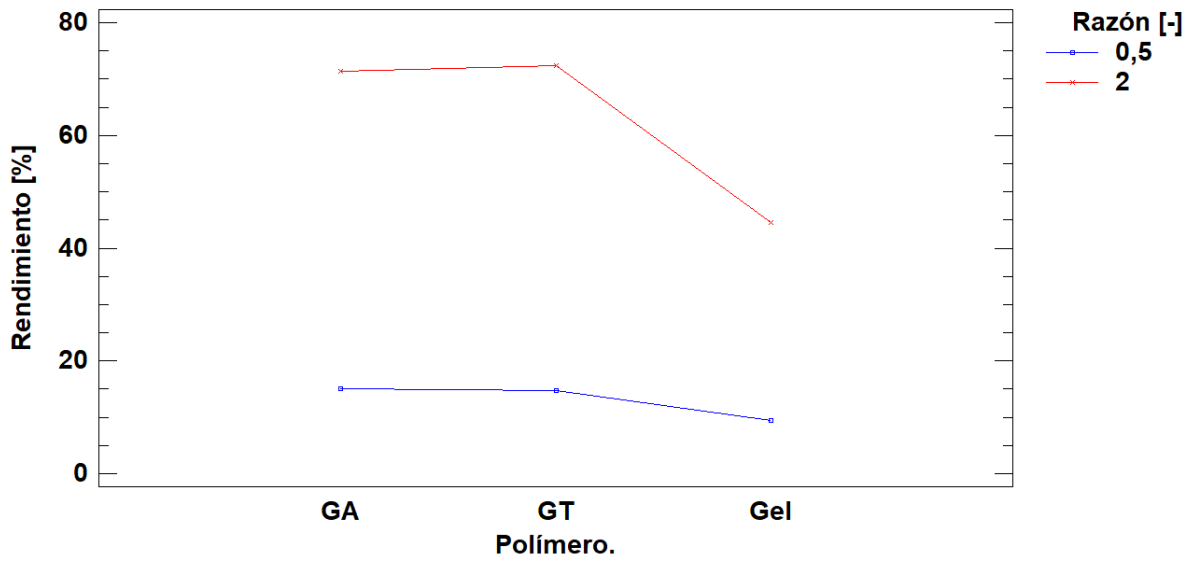


Figura 29 Gráfico de Interacciones Rendimiento, Factores Polímero-Razón

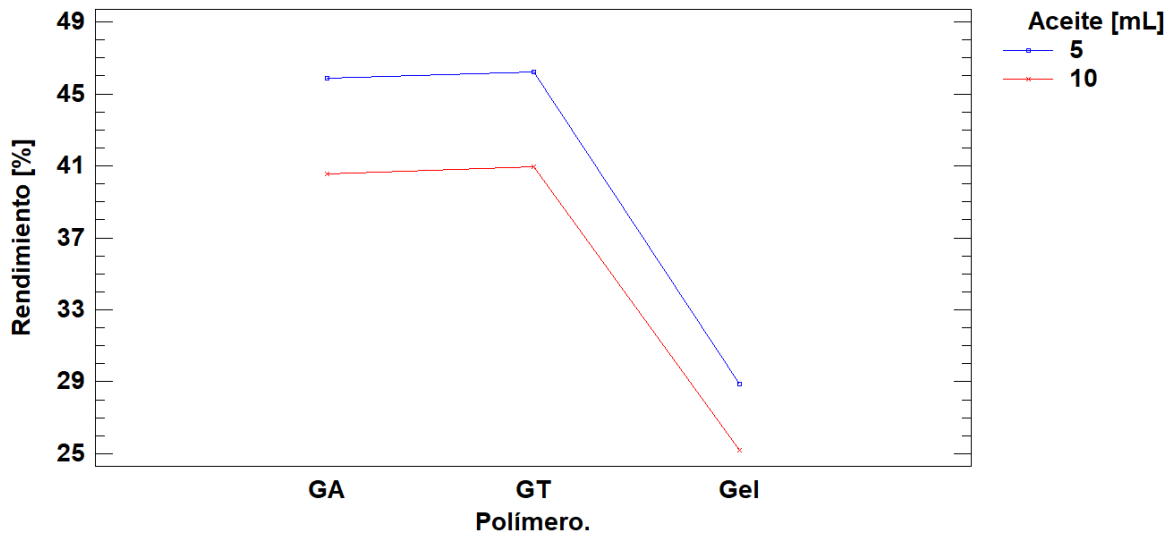
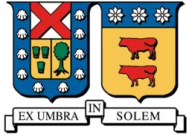


Figura 30 Gráfico de Interacciones Rendimiento, Factores Polímero-Aceite

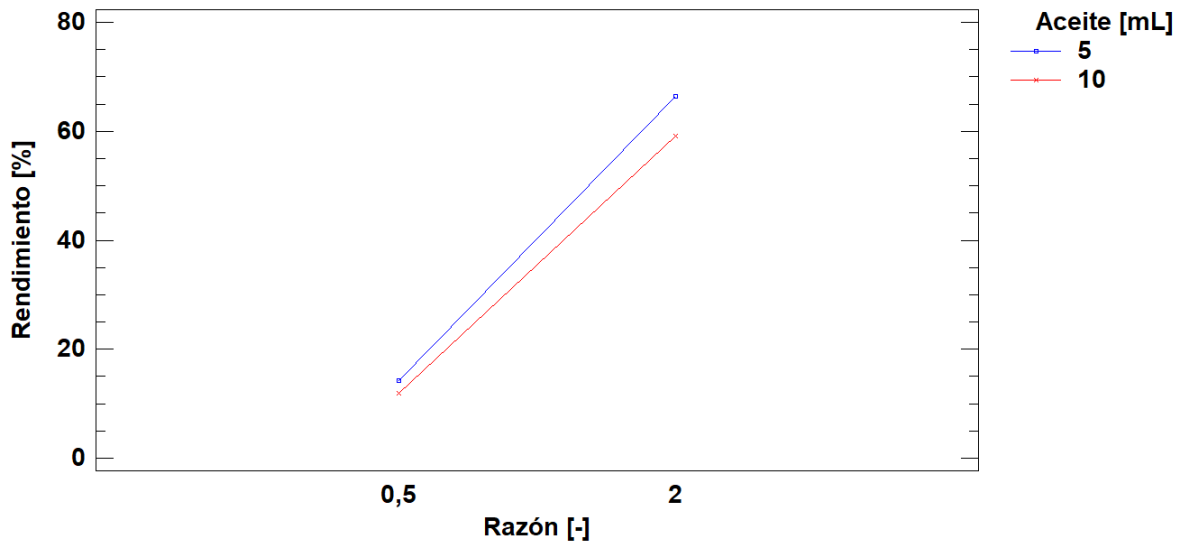
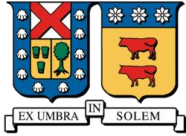


Figura 31 Gráfico de Interacciones Rendimiento, Factores Razón-Aceite



7.2.3 ANOVA Concentración

Análisis de Varianza para Concentración [mg BC g MC seca] - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Polímero.	7,93707	2	3,96854	93,25	0,0000
B:Razón [-]	4,9284	1	4,9284	115,81	0,0000
C:Aceite [mL]	12,5788	1	12,5788	295,58	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,835317	2	0,417658	9,81	0,0007
AC	0,569306	2	0,284653	6,69	0,0045
BC	2,3716	1	2,3716	55,73	0,0000
RESIDUOS	1,10648	26	0,0425571		
TOTAL (CORREGIDO)	30,327	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Método: 95,0 porcentaje LSD

Polímero.	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Gel	12	2,49417	0,0595518	X
GT	12	3,34083	0,0595518	X
GA	12	3,59167	0,0595518	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
GA - GT	*	0,250833	0,173115
GA - Gel	*	1,0975	0,173115
GT - Gel	*	0,846667	0,173115

Método: 95,0 porcentaje LSD

Razón [-]	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0,5	18	2,77222	0,0486239	X
2	18	3,51222	0,0486239	X

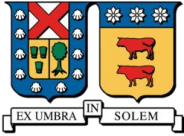
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0,5 - 2	*	-0,74	0,141348

Método: 95,0 porcentaje LSD

Aceite [mL]	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
5	18	2,55111	0,0486239	X
10	18	3,73333	0,0486239	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
5 - 10	*	-1,18222	0,141348

* indica una diferencia significativa.



Medias y 95,0% de Fisher LSD

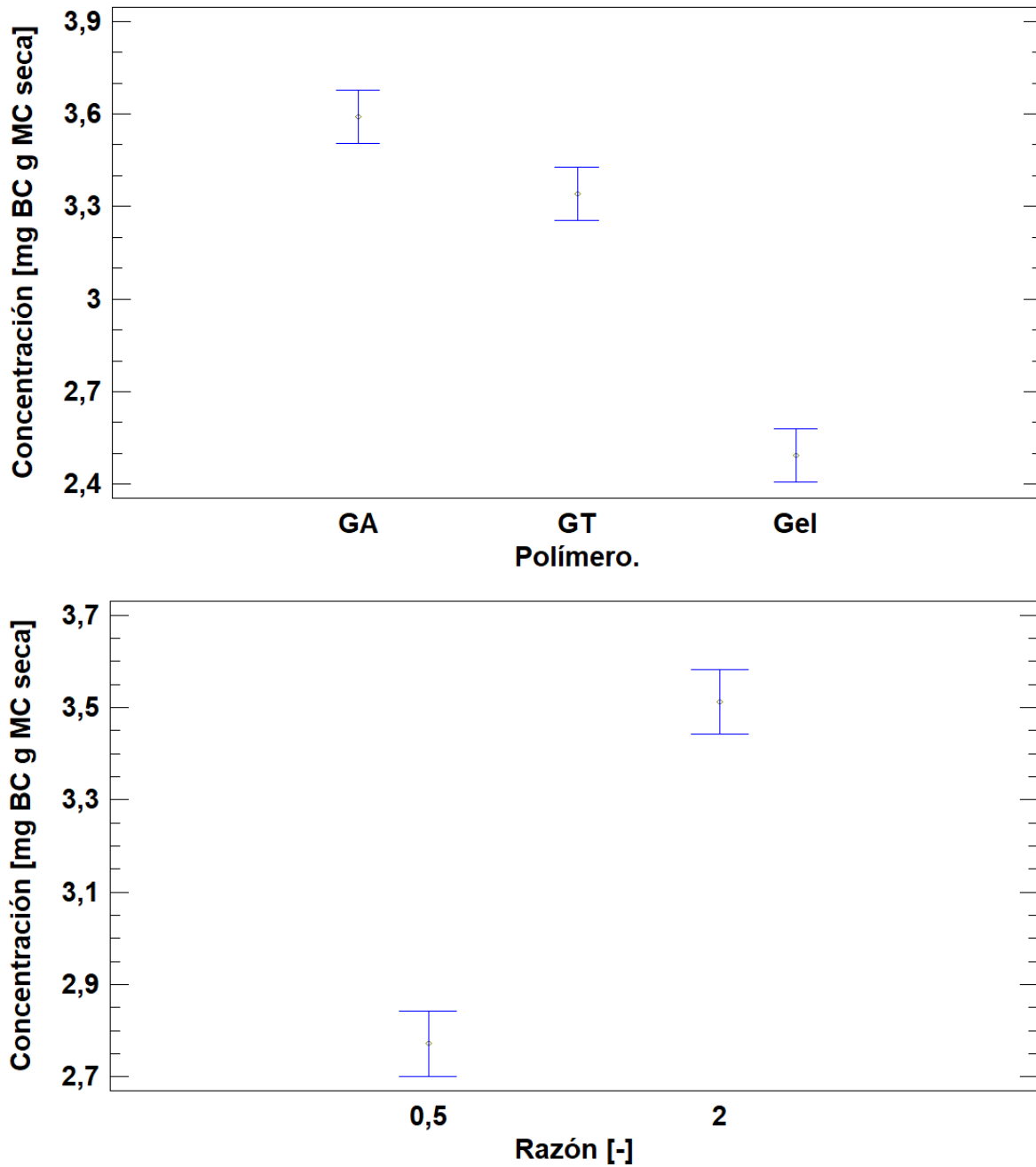


Figura 32 Gráficos de Medias Concentración, Factores Polímero y Razón

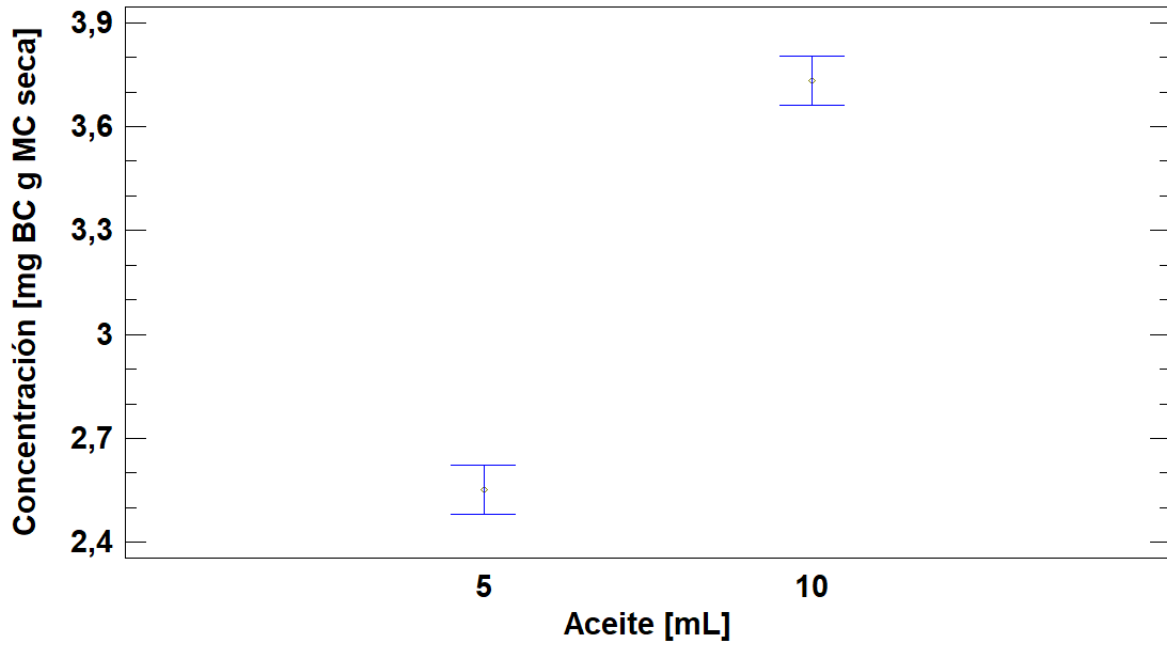


Figura 33 Gráficos de Medias Concentración, Factor Aceite

Gráfico de Interacciones

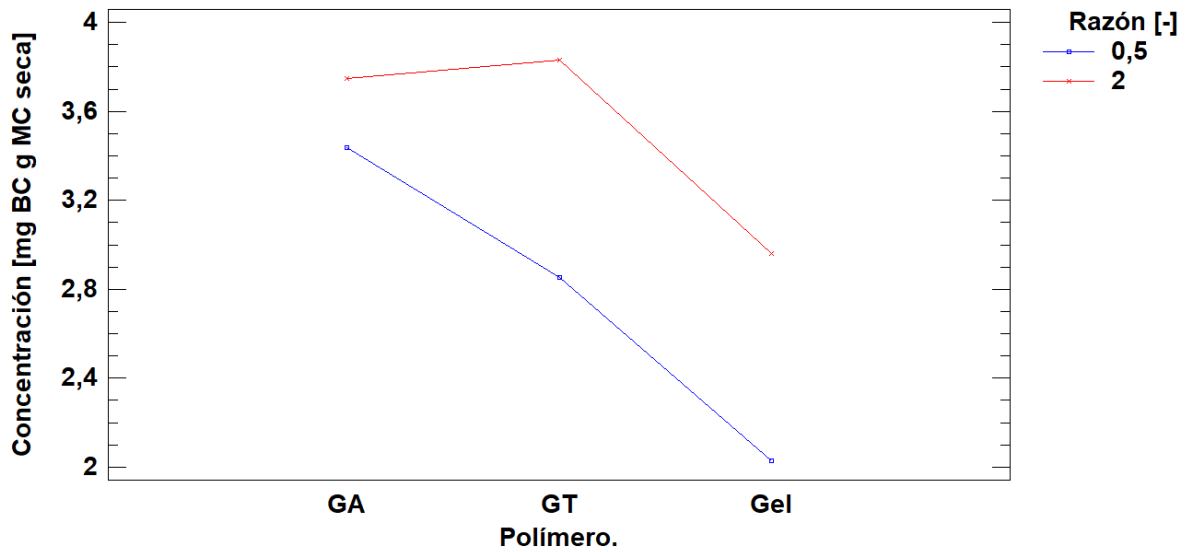


Figura 34 Gráfico de Interacciones Concentración, Factores Polímero-Razón

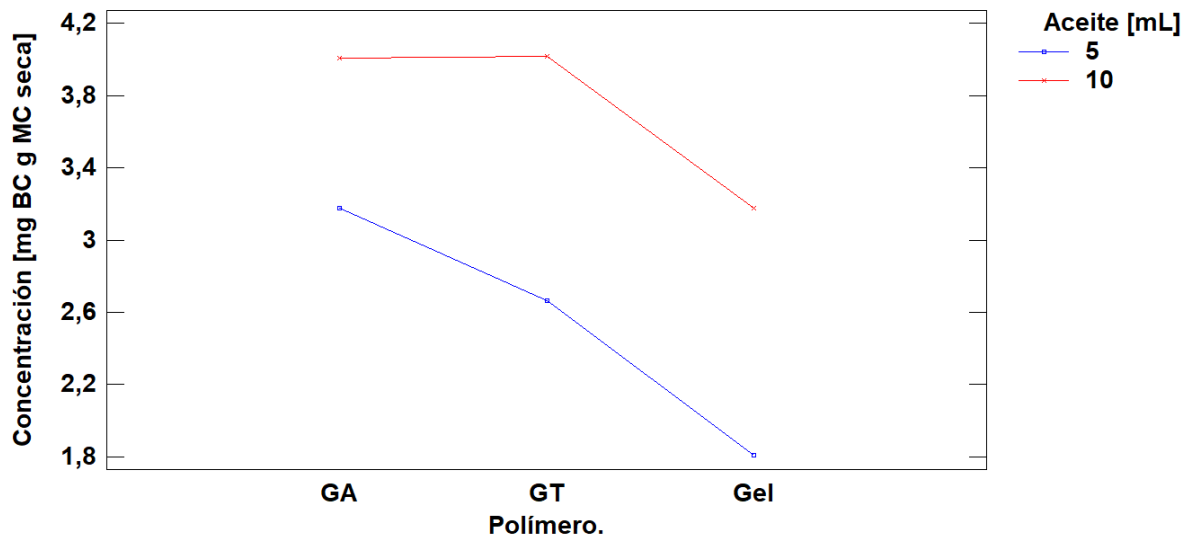
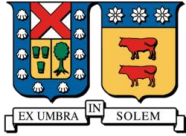


Figura 35 Gráfico de Interacciones Concentración, Factores Polímero-Aceite

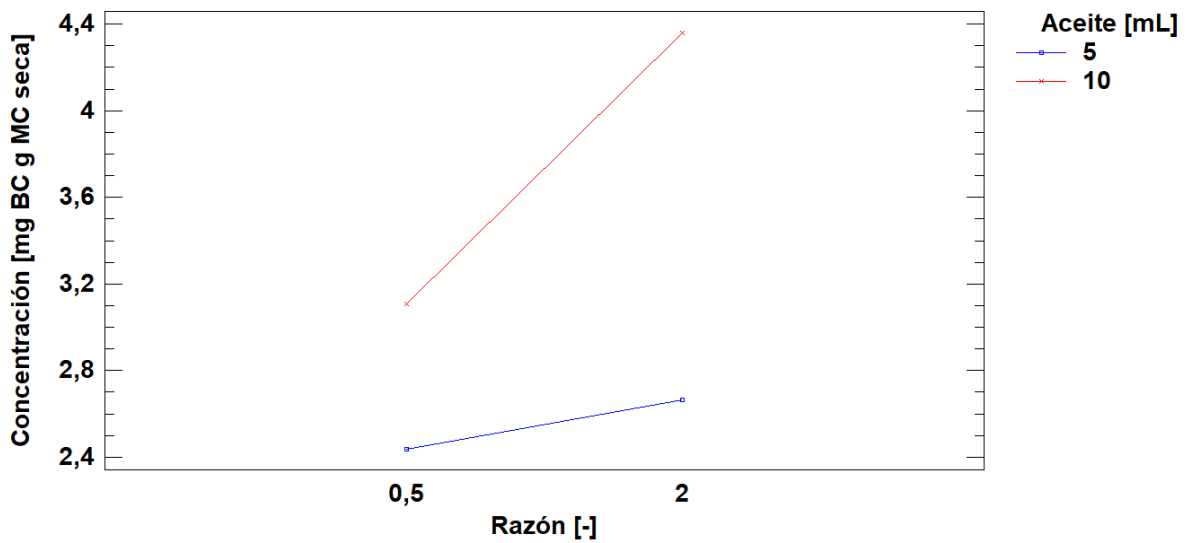


Figura 36 Gráfico de Interacciones Concentración, Factores Razón-Aceite