



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**CINÉTICA DE LIBERACIÓN Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE
CÁPSULAS DE HIDROGEL CONTENIENDO ÁCIDO CLOROGÉNICO:
EFECTO DE LA RELACIÓN EN PESO ALGINATO-ALMIDÓN
MODIFICADO**

T E S I S

para obtener el grado de Doctor en Biotecnología

P R E S E N T A

M. C. Gustavo Lozano Vázquez

CoDirección

**Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros
Dr. Héctor Escalona Buendía**

Asesor

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

México, D.F.

Julio 2015



El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado de calidad (PNPC) del CONACyT con la referencia 001465

México, D.F. a 24 de Julio del 2015

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

CINÉTICA DE LIBERACIÓN Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE CÁPSULAS DE HIDROGEL CONTENIENDO ÁCIDO CLOROGÉNICO: EFECTO DE LA RELACIÓN EN PESO ALGINATO-ALMIDÓN MODIFICADO.

Que presentó:

M.C. y T.A. Gustavo Lozano Vázquez

Comité tutorial

Directores: Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros
Universidad Autónoma Chapingo

Dr. Héctor Escalona Buendía
Universidad Autónoma Metropolitana

Asesores: Dr. E. Jaime Vernon Carter
Universidad Autónoma Metropolitana

Comité de evaluación:

Presidente: Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez
Universidad Autónoma Metropolitana

Secretario: Dra. Angélica Román Guerrero
Universidad Autónoma Metropolitana

Vocal: Dr. César Ramírez Santiago
Universidad Autónoma Chapingo

Vocal: Dra. Landy Hernández Rodríguez
Universidad Autónoma Chapingo



AGRADECIMIENTOS

- A mis padres hermosos, Gabino y Lidia, por todo su amor y apoyo, *raíces de todo mí ser.*
- A mis queridos hermanos de sangre y alma, Sandy, César y Beto, gran soporte y ejemplo, *los siempre incondicionales.*
- A mis sobrinos, Saida y Said, mis cómplices juguetones, *los provocasonrisas.*
- A Nancy, mi complemento, mi contraparte, mi renovación, *mi hermoso amor.*
- A mi pequeño Ángel, motivación para nunca desistir, *mi changuito querido.*
- A mi querida familia, los sangre, los compartidos y los del alma. *mi gran red.*
- A los que de alguna forma ya no están, sólo en poemas, entre ellas, mi *Fabio teatrera* D.E.P.
Luciernaga curiosa
- A la Dra. Consuelo, al Dr. Héctor, al Dr. Jaime y Al Dr. José, mis ejemplos, inspiración y grandes guías en este sendero académico, muchas gracias por su profesionalismo, apoyo, confianza, paciencia y amistad.
- A la Maestra Yolanda Hornelas, al Dr. Sepúlveda y a la Dra. Cris, por su valiosa colaboración en las micrografías.
- A los miembros del comité de evaluación: Dra. Angélica, Dra. Landy, Dr. César y Dr. José Ramón Verde, muchas gracias por su valiosa colaboración y observaciones, por su apoyo para lograr esta meta.
- A mis compañeros y amigos: Yazu, Angy R., Carmen, Héctor, Abraham, Daniel, Moy, Gerardo, Alex, Deisy, Juan Carlos, Dany, Dona, Sinaí, Lau, Landy, Ofé, César, Blanca, Oscar, Angélica, gracias por su compañerismo, disposición para enseñarme y apoyarme, gracias por su amistad. **Los carnales de batalla.**
- Al CONACyT, por el apoyo económico otorgado.

“Desarrollo y crecimiento junto a otros, nunca sobre otros”

ÍNDICE

	Paginas.
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
1.- MARCO TEÓRICO	4
1.1.-Matrices biopoliméricas para el encapsulamiento de nutraceuticos	5
1.2.-Biopolímeros	7
1.2.1.-Alginato de sodio (AS)	7
1.2.2.-Almidón.	8
1.2.2.1.-Almidones modificados.	8
1.3.- Hidrogeles	9
1.3.1.-Hidrogeles de alginato de calcio	11
1.4.- Antioxidantes	12
1.4.1.- El ácido clorogénico estabilidad y su actividad terapéutica	13
2.- OBJETIVOS	14
Objetivo general	15
Objetivos particulares	15
3.- HIPÓTESIS	16
4.- JUSTIFICACIÓN	18
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. Materiales	21
5.2. Elaboración de cápsulas de hidrogel usando diferentes relaciones en peso: AS/Ca ²⁺ (R _{AS/CaCl2}).	21
5.3. Elaboración de cápsulas de hidrogel de alginato de sodio-almidón de tapioca modificado (CH _{AC/AT})	22
5.4. Morfología, diámetro y esfericidad de las cápsulas	23
5.5. Propiedades texturales de las cápsulas	23
5.6. Microestructura	24
5.7. Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)	24
5.8. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier-Reflectancia Total	24

Atenuada (EITF-RTA)	
5.9. Actividad antioxidante del ACG y eficiencia de encapsulación	25
5.10. Hinchamiento	25
5.11. Estabilidad del ACG encapsulado	26
5.12. Cinética de liberación del ACG encapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas.	26
5.13. Propiedades viscoelásticas	27
5.14.- Propuesta de desarrollo de un alimento funcional lácteo que incorpore las $CH_{AC/AT}$	27
5.15.- Estabilidad de las $CH_{AC/AT}$ en refrigeración	27
5.16. Prueba de aceptación por consumidores	28
5.17. Análisis de datos	28
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1. Efecto de la relación en peso: alginato de sodio/ Ca^{2+} , sobre las propiedades texturales de las cápsulas hidratadas	30
6.2. Textura de las cápsulas de alginato de calcio-almidón de tapioca modificado.	30
6.3. Microestructura de las $CH_{AC/AT}$.	32
6.4. Eficiencia de encapsulamiento y actividad antioxidante del ACG.	36
6.5. Hinchamiento	37
6.6. Estabilidad	37
6.7. Análisis térmico	38
6.8. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier-Reflectancia Total Atenuada (EITF-RTA).	40
6.9. Cinética de liberación bajo condiciones gastrointestinales simuladas.	42
6.10. Viscoelasticidad de los hidrogeles de alginato de calcio-almidón de tapioca modificado.	45
.....6.11.- Elección de formulación de $CH_{AC/AT}$ acorde a las características de liberación deseada.	47
6.12. Propuesta de desarrollo de un alimento funcional lácteo que incorpore las $CH_{50/50}$.	47
6.13.- Estabilidad de las $CH_{AC/AT}$ en refrigeración.	48

6.14.-Prueba de aceptación en consumidores.	49
7.- CONCLUSIONES	56
8.- BIBLIOGRAFÍA	59
9.- ANEXOS	66
ANEXO 1. Evaluación sensorial	67
ANEXO 2. Artículo Publicado	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura química del alginato de sodio. G: Ácido Gulorónico; M: Ácido Manurónico.	7
Figura 1.2. Esquema de la interacción entre el catión calcio (círculo grande) y los grupos -OH y -COO- del alginato.	11
Figura 1.3. Esquema representativo de la estructura formada por las cadenas de ácido gulurónico y cationes calcio (también conocida como “caja de huevo”).	11
Figura 1.4. Formación de redes entre cadenas de alginato de sodio y el calcio. a) solución de alginato de sodio con las secuencias poligulurónicas representadas como sierras; b) efecto quelato de las secuencias poligulurónicas sobre los iones Ca^{2+} causando el entrecruzamiento y por ende la gelificación.	12
Figura 1.5. Ácido clorogénico	13
Figura 6.6. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido de la superficie de las cápsulas de hidrogel de alginato de calcio con almidón de tapioca ($CH_{AC/TS}$). Izquierda, magnificación a 70×; derecha magnificación a 500×: (a y b) $CH_{1/0}$, (c y d) $CH_{0.75/0.25}$, (e y f) $CH_{0.5/0.5}$ y (g y h) $CH_{0.25/0.75}$.	33
Figura 6.7. Imágenes mediante Microscopía Electrónica de Barrido: Cortes transversales de las cápsulas de hidrogel de alginato de calcio con almidón de tapioca ($CH_{AC/TS}$): (a) $CH_{1/0}$, (b) $CH_{0.75/0.25}$, (c) $CH_{0.5/0.5}$, (d) $CH_{0.25/0.75}$ a magnificaciones de 2000×; (e) Vista lateral de $CH_{0.25/0.75}$ a magnificaciones de 3000×, que muestran la internación de los gránulos de almidón en la matriz de alginato de sodio; y (f) $CH_{0.25 / 0.75}$ con magnificación a 5000×, donde se puede observar la cruz de Malta de restos de almidón nativo.	35
Figura 6.8. Termograma de Calorimetría Diferencial de Barrido del ACG (curva A), alginato de sodio (curva B), cápsula de alginato de calcio ($CH_{1/0}$) sin y con ACG (curvas C y D) y cápsulas de alginato de calcio con almidón de tapioca ($CH_{0.5/0.5}$) sin y con ACG (curvas E y F).	39
Figura. 6.9. Espectros de IR de ACG (curva A), alginato de sodio y almidón de tapioca (curvas B), cápsulas de alginato de calcio $CH_{1.0/0.0}$ sin y con ACG (curvas C y D), y cápsulas de alginato de calcio con almidón de tapioca ($CH_{0.5/0.5}$) sin y con ACG (curvas E y F).	41

Figura. 6.10. Liberación de ACG a partir de cápsulas de alginato de calcio-almidón de tapioca modificado, bajo condiciones (a) gástricas (pH 2.3) y (b) sales biliares (pH 6.8).	44
Figura. 6.11. (a) Factor de pérdida como función del % de deformación de las hidrogeles de alginato con almidón de tapioca y (b) relación inversa entre el % de liberación% y el factor de pérdida a deformación elevada.	46
Figura 6.12..-Prueba de nivel de agrado	52
Figura 6.13.- Agrado general	53
Figura 6.14.- Intención de compra.	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6.1. Efecto de la relación en peso de alginato de sodio- Ca^{2+} sobre las propiedades geométricas y texturales de las cápsulas de alginato de calcio (CH_{AC}).	31
Tabla 6.2. Morfología, humedad y textura de las cápsulas de alginato de sodio-almidón de tapioca modificado ($\text{CH}_{\text{AC/AT}}$)	31
Tabla 6.3. Eficiencia de encapsulación, características de liberación, porcentaje de inhibición e hinchamiento de las cápsulas $\text{CH}_{\text{AC/AT}}$.	36
Tabla 6.4. Tasa de descomposición de primer orden (k_1), exponente de ley de potencia (n_{KP}) y exponente de difusión-relajación (m) de la cinética de liberación del ACG bajo condiciones gastrointestinales simuladas.	45
Tabla 6.5. Estabilidad de las cápsulas durante su almacenamiento bajo refrigeración	49
Tabla 6.6. Valores medios de atributos, agrado general e intención de compra de los licuados de yogurt.	50
Tabla 6.7. Evaluación de atributos sensoriales. Valores parciales y valores acumulados	51
Tabla 6.8. Agrado general. Valores parciales y valores acumulados	53
Tabla 6.9. Intención de compra. Valores parciales y valores acumulados	54

RESUMEN

En este trabajo se determinó el efecto de la relación en peso de alginato de sodio (AS)/almidón de tapioca modificado (AT) sobre las propiedades fisicoquímicas y liberación de ácido clorogénico (ACG) de cápsulas de hidrogel. Soluciones de AS/AT en diferentes relaciones en peso ($R_{AS/AT}$: 1/0, 0.75/0.25, 0.5/0.5 and 0.25/0.75), adicionadas con ACG (40 mg/100 mL), fueron incorporadas gota a gota en una solución de cloruro de calcio para obtener cápsulas de hidrogel de alginato de calcio rellenas con AT. El tamaño de las cápsulas, morfología, eficiencia de encapsulación, propiedades viscoelásticas y texturales, liberación de ACG bajo condiciones gastrointestinales simuladas y la interacción molecular entre los componentes de las cápsulas usando Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (EITF) fueron evaluadas. La incorporación de AT tuvo un efecto sobre las $CH_{AS/AT}$ con mayor diámetro, pero menor esfericidad y contenido de humedad que aquellas formadas únicamente por AS. Mayor eficiencia de encapsulación de ACG fue presentada por $CH_{0.5/0.5}$ (98.76%) y $CH_{0.25/0.75}$ (96.71%). Los resultados de CDB mostraron que el ion Ca^{+2} estabilizó la estructura del alginato de sodio a través de entrecruzamiento molecular y que el ACG no interactuó con la matriz encapsulante. Por su parte los datos obtenidos a partir de EITF revelaron interacción entre el AT y el AS. La liberación de ACG a partir de las $CH_{AS/AT}$ bajo condiciones gastrointestinales simuladas, se relacionó con la porosidad y la tortuosidad de la matriz. El % de liberación de ACG más elevado (89.9 %) lo presentaron las $CH_{0.75/0.25}$, las cuales mostraron los valores más bajos de $Tan \delta$ -% deformación, dureza y cohesividad. El modelo de difusión-relajación que involucró a estos dos mecanismos, fue el que mejor describió a los datos experimentales de liberación del ACG. Por otro lado se eligió la formulación $CH_{50/50}$, para ser incorporadas a licuados de yogurt comercial con cereales, sabores fresa y nuez, los cuales fueron evaluados sensorialmente por 79 consumidores. El licuado de yogurt sabor fresa fue calificado como “me gusta moderadamente” (53.16%) y “me gusta mucho” (26.58%); mientras que aquel sabor nuez fue calificado como “me gusta moderadamente” (32.91%) y “me gusta mucho” (45.57%). Los atributos de apariencia, textura y sabor de los licuados de yogurt fueron mayoritariamente calificados como "me gusta moderadamente" y "me gusta mucho". Las respuestas más frecuentes para la intención de compra fueron positivas.

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the effect of sodium alginate (AS)/modified tapioca starch (AT) weight ratio on the physicochemical properties and chlorogenic acid (ACG) release of hydrogel beads. AS/AT solutions in different weight ratios (1/0, 0.75/0.25, 0.5/0.5 and 0.25/0.75), added with AC (40 mg/100 mL), were dripped into calcium chloride solution for obtaining calcium alginate hydrogel beads filled with AT. The beads size, morphology, encapsulation efficiency, textural and viscoelastic properties, ACG release in simulated gastrointestinal conditions, and the molecular interactions between beads components using Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (EITF) were evaluated. AT incorporation yielded $CH_{AS/AT}$ with higher diameter, but lower sphericity and moisture content than those formed by AS. Higher ACG encapsulation efficiency was presented by $CH_{0.5/0.5}$ (98.76%) and $CH_{0.25/0.75}$ (96.71%). CDB results showed that Ca^{+2} ion stabilized AS structure by molecular crosslinking and ACG did not interact with the encapsulation matrix. Meanwhile EITF data revealed that interaction between AT and AS occurred. AC release from the $CH_{AS/AT}$ under simulated gastrointestinal conditions was related to porosity and tortuosity of the matrix. Highest release % of AC occurred for $CH_{0.75/0.25}$, which showed the lowest $Tan \delta$ -strain %, hardness and cohesiveness values. The diffusion-relaxation model involving two mechanisms described better the ACG release experimental data. $CH_{50/50}$ were incorporated to yogurt smoothies containing cereals and strawberry or nutty flavors, which were sensory evaluated by 79 consumers. The strawberry yogurt smoothie was scored as “like moderately” (53.16%) and “like very much” (26.58%); while nutty yogurt smoothie was scored as “like moderately” (32.91%) and “like very much” (45.57%). The appearance, texture and flavor attributes of the yogurt smoothies were mostly scored as “like moderately” (32.91%) and “like very much”. The most frequent responses for purchase intent were positive.

INTRODUCCIÓN

Las moléculas de antioxidantes son comúnmente utilizadas como complementos de la dieta, debido a su potencial para la prevención de algunas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo e inflamación por patogénesis por hipertensión (Lykkesfeldt y Svendsen, 2007), así como también de algunas de carácter cardiovascular en arterias coronarias (Heitzer, Schlinzig, Krohn, Meinertz, T., y Münzel, 2001). En general existe una gran variedad de antioxidantes, tales como enzimas (catalasa, superóxido dismutasas y varias peroxidases), así como otro tipo de estructuras moleculares, tales como glutatión, vitaminas (C, A y E) y ácidos fenólicos. Un caso particular de estos últimos es el ácido clorogénico (ACG), ácido 5- cafeoilquínico, conformado por la unión entre el ácido cafeico y el ácido quínico, mediante un enlace tipo éster. El ACG es muy abundante en algunas frutas, en vegetales y sobretodo en el café (Clifford, 1999; Gonzalez-Romero y Verpoorate, 2009). Se sabe que el ACG tiene actividad antioxidante, por actuar como eliminador de radicales libres (Sato, Itagaki, Kurokawa, Ogura, Kobayashi, Hirano, Sugawara, y Iseki, 2011; Rice-Evans, Miller, y Paganga, 1996; Mitra, 2010; Pal, Banerjee, y Ghosh, 2012). En adición, se ha informado que el ACG ejerce una amplia gama de efectos terapéuticos; como por ejemplo, inhibición de la peroxidación lipídica de las lipoproteínas de baja densidad (Laranjinha, Vieira, Almeida y Modeira, 1996), actividad antimutagénica (Shibata, Sakamoto, Oka y Kono, 1999), así como prevención a la inflamación intestinal (Shin *et al.*, 2015), entre otros. También ayuda al cuerpo humano a mejorar su resistencia contra ciertas enfermedades relacionadas al daño oxidativo, reduce la grasa y construye músculos fuertes (Ji, Jiang, Lu, Sheng, Wang y Wang, 2013). Sin embargo, el ACG es fácilmente oxidable y sensible a la luz (Chao, Wang, H., Zhao, Zhang y Zhang, 2012), lo cual limita su aplicación en la industria alimentaria. Así, el desarrollo de sistemas acarreadores de este compuesto que lo protejan contra factores ambientales de deterioro y faciliten su incorporación a sistemas alimenticios complejos de manera eficiente, es un tópico de estudio interesante.

La microencapsulación es considerada como una técnica adecuada para proteger compuestos bioactivos, aislándolos de factores ambientales nocivos para ellos, tales como la temperatura, luz, pH, humedad y oxígeno. Esta técnica se basa en rodear a los compuestos bioactivos con una matriz biopolimérica semipermeable, evitando o retardando su contacto con los factores ambientales de deterioro (Borgogna, Bellich, Zorzini, Lapasin, y Cesàro, 2010). Un tema de investigación actual es el mejoramiento de las propiedades fisicoquímicas y de liberación de estas matrices biopoliméricas, así como su obtención a costos más eficientes.

El material encapsulante más ampliamente usado es el alginato, un polielectrolito aniónico natural extraído de varias especies de algas, compuesto por unidades (1-4) β -D manuronato (M) y α -L-

guluronato (G), las cuales están presentes en las macromolécula lineal en bloques homopoliméricos de cada monómero, junto con bloques de secuencia alternada (Donati, Holtan, Mørch, Borgogna, Dentini, y Skjåk-Braek, 2005).

El alginato presenta varias características que lo hacen una opción de material útil para encapsulación, tales como bajo costo, uso simple, biodegradabilidad, biocompatibilidad, capacidad para sufrir asociaciones cadena-cadena y formación de geles en la presencia de iones divalentes, como el Ca^{2+} . (Fang, Al-Assaf, Phillips, Nishinari, Funami, y Williams, 2008). Sin embargo, los geles de alginato son susceptibles a desintegración en la presencia de exceso de iones monovalentes, agentes quelantes de Ca^{2+} y ambientes químicos agresivos (Smidsrod, y Skjak-Braek, 1990). Los geles de alginato también presentan alta permeabilidad debido a su estructura porosa e hidrofílica, lo cual provoca la liberación rápida de los materiales atrapados (Chan *et al.*, 2011; López-Córdoba, Deladino, y Martino, 2014; Martin, Lara-Villoslada, Ruiz, y Morales, 2013); lo que pudiera considerarse un inconveniente en algunas aplicaciones (Hosseini *et al.*, 2014). Algunos autores han informado que los alginatos pueden formar matrices con mejoradas propiedades estructurales y funcionales mediante la adición de otros polímeros como material de relleno (Wu, He, Chen, Han y Li, 2014; López Córdoba, Deladino y Martino, 2013; Chan *et al.*, 2011). Hosseini *et al.* (2014) encontraron que la presencia de almidón resistente en microcápsulas de alginato, dio lugar a una mayor eficiencia de encapsulación de nisina y capacidad de carga; mientras que López-Córdoba *et al.* (2013) informaron que la incorporación de gránulos de almidón mejoró las características de liberación de cápsulas a base de alginato.

Existen pocas investigaciones acerca de la combinación de alginato con almidón químicamente modificado. Es interesante observar que estos almidones presentan digestibilidad reducida, por lo que pueden calificar como almidones resistentes, y pueden desempeñar un papel importante en la salud humana (Chung, Shin, y Lim, 2008). No hay reportes disponibles sobre la caracterización del efecto de la relación en peso alginato-almidón químicamente modificado sobre las propiedades estructurales, mecánicas, de carga y de liberación de microcápsulas conteniendo bioactivos. Este conocimiento es relevante considerando que los mecanismos más importantes que regulan la tasa de liberación de los compuestos bioactivos (difusión, hinchamiento, biodegradación/erosión y presión osmótica) dependerán de la composición de la matriz biopolimérica y el fluido circundante (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995; Barba, d'Amore, Chirico, Lamberti y Titomanlio, 2009).

El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos de la relación en peso alginato-almidón de tapioca modificado ($R_{AS/AT}$) sobre la cinética de liberación y propiedades fisicoquímicas de cápsulas de hidrogel ($CH_{AC/AT}$) conteniendo ácido clorogénico.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1.-Matrices biopoliméricas para el encapsulamiento de nutraceuticos

Existen varias razones para encapsular compuestos nutraceuticos (compuesto o sustancia natural con acción benéfica para la salud humana), moléculas relacionadas con características sensoriales (de color, olor y sabor) o probióticos (bacterias benéficas al organismo humano). Para cualquiera de estas opciones, los motivos que más destacan para su incorporación en un vehículo, están: su almacenamiento, transportación, protección ante condiciones adversas, creación de distintas formas de administración, regulación de su cinética de liberación para su entrega en un sitio específico y enmascaramiento de sabores u olores, entre otros. El tamaño de cápsula puede llevarse a varios niveles, ya sea nano, micro o sólo encapsulación, pudiendo constituir matrices biopoliméricas, de origen proteínico, sacárido o de ambos.

Para el caso en el que se elaboran cápsulas de tamaño micrométrico en el que se usan matrices poliméricas, se puede mencionar algunos ejemplos: sea el caso de colorantes, como la indicaxantina, que es un tipo de betaláina procedente de la tuna, que fue encapsulada en una matriz de maltodextrina, obtenida a partir de un proceso de secado por aspersion. Se caracterizó el polvo de color amarillo brillante, determinando su carácter antioxidante mediante la técnica de inhibición o secuestro de radicales libres, con ABTS ($\bullet +$) y por reducción del radical férrico, esto en presencia y en ausencia de maltodextrina. Los investigadores concluyeron que es recomendable el uso de la maltodextrina como matriz estabilizante de estos pigmentos (Gandía-Herrero, Jiménez-Atiénzar, Cabanes, García-Carmona y Escribano, 2010). Los compuestos polifenólicos provenientes de la hoja de *Quercus resinosa*, también conocido como encino roble, fueron encapsulados por Rocha-Guzmán, Gallegos-Infante, González-Laredo, Harte, Medina-Torres, Ochoa-Martínez y Soto-García, 2010. En este caso, se buscó enmascarar la elevada astringencia de las hojas, proteger a los polifenoles y favorecer su incorporación a un producto alimenticio. Cabe mencionar que en el norte de México se prepara una bebida refrescante a partir de estas hojas. Para la encapsulación de los polifenoles se utilizaron mezclas de caseinato y lactosa, logrando con ello la conservación de su capacidad antioxidante, evaluada mediante el consumo del radical DPPH. La quercitina es un antioxidante con potencial para aplicar en terapias dirigidas a tratamientos anti-inflamatorios del intestino, fue encapsulada en nanopartículas de ácido poli-D-L-láctico (PLA), mediante el método de evaporación de disolvente, logrando mejorar la solubilidad, la permeabilidad y la estabilidad de esta molécula (Kumari *et al.*, 2010). Elagitaninos de granada fueron encapsulados en nanopartículas autoensambladas a base de gelatina mediante su unión con este biopolímero. Se demostró que los elagitaninos encapsulados disminuyen los efectos apoptóticos de células de leucemia HL-60 (Zheng, Susan, Percival, Bonard y LiweiGu., 2010).

Por otro lado, la gelación de biopolímeros constituye una técnica para la obtención de matrices biopoliméricas útiles para el encapsulamiento de agentes bioactivos. Fundamentalmente existen tres mecanismos para la gelación de biopolímeros: térmico, enzimático y mediante factores de entrecruzamiento. La gelación térmica de biopolímeros, como es el caso de lactoproteínas, para la preparación de microcápsulas insolubles en agua, muestra ciertos inconvenientes, tanto para algunos nutraceuticos, como para bacterias probióticas, así como también para ciertos antioxidantes termosensibles (Chen y Subirade, 2006). La gelación de biopolímeros mediante procedimiento enzimático ha sido aplicada para la encapsulación de probióticos. (Heidebach, Först y Kulozik. 2009); fue el caso de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19 y *Bifidobacterium lactis* Bb12 en matrices de lactoproteínas geladas mediante la acción de quimosina. Las microcápsulas obtenidas tuvieron un diámetro medio de $68 \pm 5 \mu\text{m}$ y protegieron a las células probióticas contra condiciones gástricas simuladas.

El uso de factores de entrecruzamiento de cadenas biopoliméricas permite la formación de estructuras llamadas hidrogeles, útiles para la producción de cápsulas insolubles en agua con potencial de incorporación en alimentos, i.e. xantana, guar, curdland (Williams, Sadar, y Martin, 2009), alginato, pectina (Bierhalz, da Silva, y Kieckbusch, 2012); así mismo, quitosano, carboximetil celulosa (CMC), carragenina, gelatina y todos los polímeros antes mencionados, se han usado para la encapsulación de diversos probióticos, observando que las matrices resultantes ofrecieron protección a las células probióticas durante el almacenamiento y cuando fueron adicionados a productos lácteos y bajo condiciones gastrointestinales simuladas (Anal, y Singh, 2007). Sin embargo, se han señalado algunas complicaciones en el uso del entrecruzamiento de biopolímeros para la obtención de cápsulas; por ejemplo, las altas viscosidades de las dispersiones acuosas de los polisacáridos, que restringen su uso a concentraciones muy bajas, alrededor del 2 al 4 %, lo cual trae como consecuencia la formación de estructuras de pared de baja densidad que proporcionan un efecto de barrera, aveces limitado (Crittenden, Weerakkody, Sanguansri y Augustin, 2006). En adición, este mecanismo de gelación produce cápsulas relativamente grandes, con diámetros entre 1 y 3 mm, que ocasionan efectos adversos en la calidad sensorial del alimento en el que se incorporan (Sandoval-Castilla, Lobato-Calleros, García-Galindo, Álvarez-Ramírez, y Vernon-Carter, 2010). López-Córdoba *et al.* (2013) encapsularon antioxidantes de tipo polifenólicos, provenientes de hierba mate, mediante el entrecruzamiento de alginato de sodio con CaCl_2 , usando almidón como agente de relleno. Estos autores informaron que la eficiencia de encapsulamiento incrementó de 55% a 65% en la presencia de almidón, asimismo, determinaron que durante la liberación de los antioxidantes bajo condiciones gástricas, los fenómenos que intervinieron fueron los de difusión y erosión.

El enfoque de este trabajo está dirigido al encapsulamiento de ACG en matrices de alginato de sodio, usando cloruro de calcio como agente de entrecruzamiento y almidón químicamente modificado, como agente de relleno, por lo que a continuación se hace una descripción general de estos compuestos.

1.2.-Biopolímeros

Los **biopolímeros** (del griego *poly*: «muchos» y *mero*: «parte», «segmento») son macromoléculas orgánicas, de origen biológico, formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros; algunos de ellos son aminoácidos, cuyos polímeros conforman a los péptidos y proteínas; de manera análoga, existen los monómeros de carbohidratos, aldosas y cetosas, con grupos funcionales sustituidos o no, los cuales están unidos mediante enlaces glucosídicos, que dependiendo de sus componentes, conforman distintos polímeros; algunos ejemplos de ellos son el alginato y el almidón. Un copolímero es una macromolécula compuesta por dos o más unidades repetitivas distintas, que pueden unirse de diferentes formas por medio de los enlaces químicos mencionados (Fennema, 2008).

1.2.1.-Alginato de sodio (AS): Es un copolímero binario no ramificado, de origen natural, extraído de diversas especies de algas. Dicha macromolécula se compone de dos monómeros: ácido malurónico (M) y gulurónico (G), los cuales forman enlaces β -1-4-D-M y α -1-4-L-G (Figura 1.1). La composición del AS depende de la variedad de alga y el tejido de origen. Los monómeros están arreglados en patrones o bloques a lo largo de la cadena, con regiones homopoliméricas llamadas bloques M o bloques G e inter-dispersas con regiones de estructuras alternantes (bloques MG).

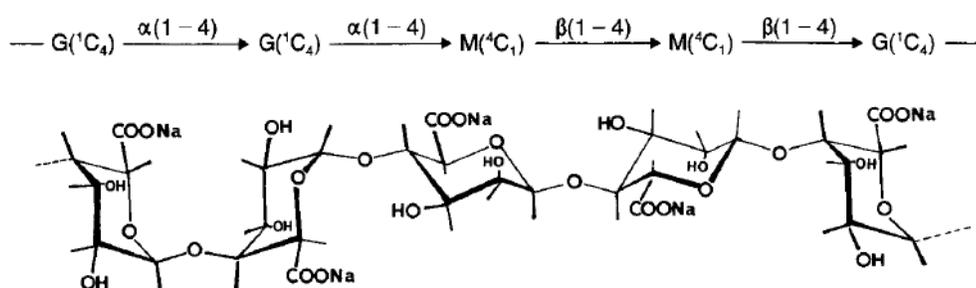


Figura 1.1. Estructura química del alginato de sodio. G: Ácido Gulorónico; M: Ácido Manurónico. Fuente: Olav Smidsrød y Gudmund Skjåk-Braek. (1991).

El AS constituye el material encapsulante más ampliamente usado. Desde este punto de vista, el AS presenta varias ventajas, entre ellas, uso muy simple, biodegradabilidad, biocompatibilidad y bajo costo. En presencia de cationes divalentes (por ejemplo, Ca^{2+}), las cadenas del AS se entrecruzan para

formar geles 3D, un ejemplo de estos es el alginato de calcio (AC) (Olav y Gudmund, 1991). (Figuras 1.2, 1.3 y 1.4)

1.2.2.-Almidón. El almidón nativo es el principal componente de reserva de plantas, frutos y animales. Químicamente, es una mezcla de dos polisacáridos: amilosa y amilopectina. En general, los almidones contienen 17-27% de amilosa y el resto de amilopectina, aunque estos porcentajes varían según su fuente vegetal, variedad, así como tejido del cual se extraen. La amilosa es un polímero de cadenas lineales de 200 a 2500 unidades glucosa y peso molecular de hasta un millón de daltones, es un α -D-glucano, cuya unidad repetitiva es la maltosa, las cuales están unidas entre sí por enlaces α -(1-4). La amilopectina, se trata de un polímero ramificado, conformado por cadenas residuales de α -D-glucopiranosidos, unidos por enlaces α -(1-4) y con ramificaciones en α -(1-6); cada molécula suele reunir de 2,000 a 200,000 unidades de glucosa y su peso molecular es muy alto ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltones. Se identifican dos grupos de cadenas: insustituibles y sustituibles por otras cadenas, “A” y “B” respectivamente. La cadena “B” forma la columna de la molécula de la amilopectina y se extiende sobre dos o más racimos, cada racimo contiene de dos a cuatro cadenas “A” estrechamente asociadas. Las áreas cristalinas se presentan cada 0.6-0.7 nm y contienen la mayor cantidad de enlaces α -(1-6), siendo relativamente susceptibles a los agentes hidrolíticos (ácidos y enzimas) (Fennema, 2008)

1.2.2.1.-Almidones modificados. Cuando el almidón nativo es sometido a algún tipo de transformación química, es posible obtener una variante conocida como almidones modificados, dichos cambios, repercuten en sus propiedades físicoquímicas, nutricionales y tecnológicas. Los tipos de modificaciones a los almidones pueden llevarse a cabo mediante varias vías, ya sea por tratamientos térmicos, pre gelatinización, hidrolización por pH's extremos, blanqueamiento con peróxido, oxidación con hipoclorito de sodio, tratamiento con enzimas, adición de diversos grupos, tales como fosfatos, ésteres, hidroxipropilos o carboximetilos; así como también, cambios en sus cargas electrostáticas. En ciertos casos, es posible obtener un atributo extra, lográndose así almidón resistente (AR); éste se define como la suma del almidón y de los productos de degradación del almidón, que no son absorbidos en el intestino delgado; o dicho de otra forma, es la porción de almidón que no es fácilmente digerida y por lo tanto resiste las condiciones degradativas previas (resistente a pHs bajos y a la amilasa), hasta llegar al intestino delgado (Erlinger *et al.*, 1992). A la fecha se identifican varias categorías de almidones resistentes:

AR1, almidón físicamente inaccesible, debido a la presencia de tabiques celulares, se da en los granos, semillas o tubérculos; principalmente se encuentran en elaborados de granos, semillas y legumbres.

AR2: corresponde a gránulos de almidón nativos, encontrados en el interior de la célula vegetal; presentando lenta digestibilidad debido a las características intrínsecas de la estructura cristalina de sus gránulos (ejemplo: aquellos encontrados en chicharos crudos, plátanos verdes y papas crudas) Al interior del gránulo, el almidón se encuentra empaquetado en un modelo radial, y se encuentra relativamente deshidratado. Esta estructura compacta, limita la accesibilidad de las enzimas digestivas, como las amilasas, lo que significa que hay almidón parcialmente hidratado y parcialmente gelatinizado. Se clasifican en tres tipos principales: A (por ejemplo, la mayoría de los almidones de cereales), B (por ejemplo, plátanos verdes y los almidones de papa cruda) y C (la mayoría de los almidones de leguminosas). Al ARS2, se llama al almidón rico en amilopectina (cristalino) (Haralampu, 2000). AR3, almidón retrogradado; almidón que se ha cocinado y luego se enfría y se almacena por periodos de tiempo, desde varias horas a varios meses y es altamente resistente a la amilasa (papas, pan, cereales, productos alimenticios con prolongados o repetidos tratamientos de calor húmedo) (Rodrigues, Lobo y Lemos, 2003). AR4, a este grupo pertenecen los almidones químicamente modificados. Estos almidones muestran cierta resistencia al ataque de ciertas enzimas por la formación de enlaces glucosídicos. Ejemplos de estos almidones son los sustituidos químicamente por grupos ésteres o fosfatos; sin embargo, hay infinidad de modificaciones químicas, entre ellas el uso de enzimas, de ácidos o álcalis, modifican los niveles de amilosa y de amilopectina.

Estudios indican que el almidón resistente pasa por el intestino delgado sin ser digerido, ya que es resistente a la acción de la enzima α -amilasa y al pH gástrico. Esto los convierte en una porción significativa de carbohidratos, que serán fermentados por las bacterias colónicas, dando lugar a ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) y disminución del pH colónico, comportamiento comparable al de la fibra dietética tradicional. El almidón resistente produce cantidades más elevadas de butirato que la fibra dietética, compuesto asociado con una incidencia más baja de cáncer de colon, mediante la supresión de la proliferación de células tumorales. El almidón resistente disminuye también el tiempo del tránsito intestinal y aumenta el volumen fecal (Hylla, Gstner, Dusel, 1998)

1.3.- Hidrogeles.

Los hidrogeles son sistemas en estado coloidal, los hay naturales y sintéticos, compuestos por polímeros hidrofílicos, insolubles en agua, blandos, elásticos y tienen la habilidad de hincharse en presencia de agua, lo que hace que aumente considerablemente su volumen hasta alcanzar un equilibrio físico-químico. Los hidrogeles al encontrarse deshidratados (xerogel), se convierten en estructuras cristalinas (Shiraishi, Imai y Otagiri, 1993). Los hidrogeles forman estructuras reticulares, debido a

fuerzas covalentes cohesivas, que producen el entrecruzamiento; también pueden intervenir interacciones iónicas, que son relevantes, en las que se requiere un balance entre el ión-polímero; adicionalmente, se presentan fuerzas intermoleculares, tales como electrostáticas, hidrofóbicas, interacciones dipolo-dipolo y de manera muy importante por número, puentes de hidrógeno. Además de lo anterior, existen otros factores que influyen sobre la capacidad de hinchamiento del gel, ya que además del grado de entrecruzamiento, es muy importante la presencia en su estructura molecular de grupos funcionales de carácter hidrofílico; los hay neutros, (-OH, -SH, -CONH₂), que producen interacciones H₂O-polímero y/o iónicos (-COO⁻, SO₃⁻, -CONH₃⁺), también generan interacciones H₂O-polímero e ion-polímero cargado, éstos últimos tienen mayor afinidad con el agua y por tanto mayor capacidad de retención de ésta (Olav y Gudmund.,1991). Así, los geles formados por polielectrolitos se hinchan más que aquellos conformados por biopolímeros neutros. El hinchamiento, así como la tacticidad, cristalinidad y/o elasticidad del biopolímero son influenciados por factores ambientales, tales como pH, fuerza iónica, temperatura, presión, tipo de disolvente e incluso, por factores electromagnéticos (Qiu y Park, 2012).

Porosidad en hidrogeles. Dependiendo del tipo de interacciones entre los componentes de los hidrogeles, se formarán arreglos 3D con estructuras relativamente “abiertas” o “cerradas”; por ejemplo, medios ácidos tienden a relajar dichas estructuras; mientras que medios alcalinos o neutros, como es el caso del intestino delgado, tienden a compactarlas (Avendaño-Romero, López-Malo, y Paola, 2013). Una estructura “abierta” obtiene poros más grandes, que una estructura cerrada, esto a su vez, incide sobre difusión de moléculas en el interior y exterior de la matriz polimérica (Eng-Seng., *et al.*, 2010). La porosidad de los hidrogeles de AS se ha relacionado con su composición; donde las redes se configuran, según la proporción de la secuencia de sus residuos; es decir, alginatos con una gran cantidad de residuos MG, tienen menor rigidez que los que tienen gran cantidad de residuos MM; mientras que los que tienen zonas con mayor cantidad de residuos GG, son los más rígidos; sin embargo, a mayor presencia de G, se contribuye a la formación de estructuras más quebradizas, lo cual se refleja en poros más abiertos (5-200 nm) (Hoffman, 2012). La incorporación de materiales de relleno, por ejemplo, la polietilenamina, proteínas y otros biopolímeros como el almidón, (Chan *et al.*, 2011; Wu, H. *et al.*, 2014), pueden afectar también la estructura de los hidrogeles, reforzándola o debilitándola, dependiendo de la existencia de interacciones atractivas o de repulsión entre éstos y el polisacárido base. Para estimar la tasa de liberación del compuesto bioactivo, es importante considerar, si éste interactúa con la matriz biopolimérica (López-Córdoba *et al.*, 2014).

1.3.1.-Hidrogeles de alginato de calcio. El AS, es un polielectrolito aniónico ($-\text{COO}^-$), lo que le permite interactuar con cationes divalentes, como el Ca^{2+} (interacciones ión-ión), hay interacciones dipolo-dipolo entre los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{COOH}$, también las hay dipolo-ión; estas interacciones son, $-\text{OH}$ con el Ca^{2+} (Figura 1.2), todo lo anterior, se ve favorecido en las regiones G, originándose así arreglos estructurales conocidos como “caja de huevo” (Figura 1.3), ubicándose el Ca^{2+} en el interior de dos cadenas poliméricas de ácido gulurónico; en contraste, las regiones heteromonoméricas MG y los bloques M, se mantienen como polímeros lineales más abiertos con respecto a los anteriores (Figura 1.4).

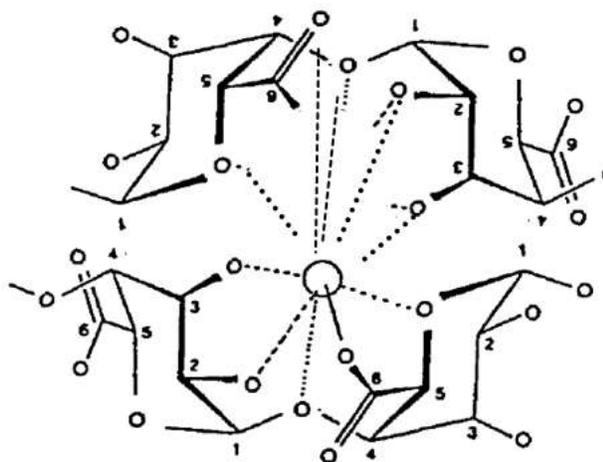


Figura 1.2. Esquema de la interacción entre el catión calcio (círculo grande) y los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{COO}^-$ del alginato. Fuente con modificaciones: Olav Smidsrød y Gudmund Skjåk-Braek. (1991).

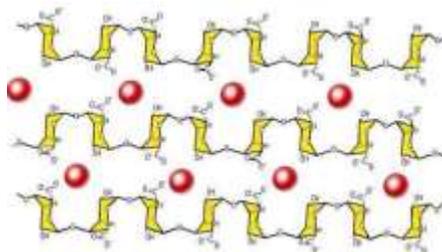


Figura 1.3. Esquema representativo de la estructura formada por las cadenas de ácido gulurónico y cationes calcio (también conocida como “caja de huevo”). Fuente: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/alginato.html> (Julio 2015)

La interacción del calcio con las cadenas de G y parcialmente con bloques GM, se genera de tal forma que las cadenas se entrecruzan, dando estructuras ordenadas y con cierta flexibilidad (Figura 4), en consecuencia, dada la fuerza de interacción, los espacios se van cerrando y atrapando agua, hasta cierto equilibrio, que produce que dicha estructura se hinche (López-Córdoba, *et al.*, 2013).

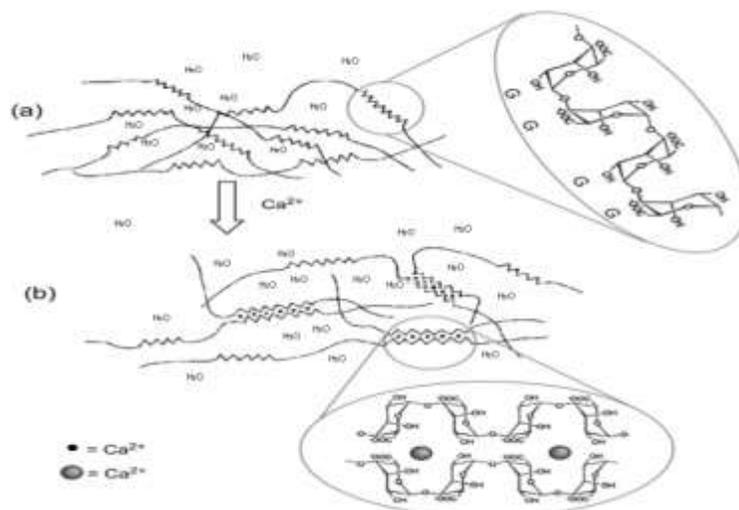


Figura 1.4. Formación de redes entre cadenas de alginato de sodio y el calcio. a) solución de alginato de sodio con las secuencias poligulurónicas representadas como sierras; b) efecto quelato de las secuencias poligulurónicas sobre los iones Ca^{2+} causando el entrecruzamiento y por ende la gelificación. Fuente con modificaciones: Ayarza, L. 2014.

Cuando mezclas de alginato y almidón químicamente modificado son gelificadas en la presencia de iones Ca^{2+} , se dan las siguientes interacciones; además de las ya mencionadas $-COO^-$ de ácido gulorónico - Ca^{2+} - $-COO^-$ de ácido gulorónico, también se da entre el almidón químicamente modificado-calcio-almidón químicamente modificado, las cuales son interacciones ion-dipolo, entre el Ca^{2+} y los átomos de oxígeno de los grupos $-OH$, por su carga parcial negativa. Adicionalmente, existirán enlaces por puente de hidrógeno entre los grupos $-OH$ del almidón y los grupos $-COOH$ y $-OH$ del alginato con el agua usada como medio de dispersión.

1.4.- Antioxidantes.

Derivados fenólicos, como las isoflavonas, la genisteína, la daidzeína y la gliciteína, así como los ácidos cafeíco, clorogénico, ferúlico y cumárico son considerados como antioxidantes. Su acción no consiste en la inhibición de la formación de radicales, sino en su reacción con ellos, pues al ser donadores de protones, los estabilizan mediante resonancia, produciéndose radicales del antioxidante menos activos. Estos compuestos son considerados nutraceuticos, por contrarrestar efectos negativos provocados por enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Badui-Dergal, 2006). Generalmente todos los vegetales, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, como

producto de su metabolismo secundario. Estos compuestos son indispensables para las funciones fisiológicas de los vegetales y otros son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc.). En términos químicos simples, los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático hidroxilado como fenol, p-cresol y 3-etilfenol. En particular, los ácidos fenólicos, como el cafeico, cumárico y ferúlico, presentes en los tejidos vegetales se originan por la ruta del ácido shikímico, la cual comienza con la condensación de fosfoenolpiruvato y eritrosa. Estos compuestos suelen encontrarse esterificados con azúcares u otros fenoles, o formando parte de los taninos.

1.4.1. El ácido clorogénico estabilidad y su actividad terapéutica. Constituido por ácido cafeico y ácido quínico, unidos mediante un enlace tipo éster (Figura 5), también llamado ACG; ácido 5-cafeoilquínico), es muy abundante en los vegetales, es el principal compuesto fenólico en manzanas y peras, en la hierba de Poleo (Viveros-Valdez, 2009), así como también está en grandes cantidades en el café (Gutiérrez-Maydata, 2002). El ACG posee capacidad para atrapar especies de oxígeno reactivas, singulete $^1\text{O}_2$ (Sato *et al.*, 2011; Fenema, 2008).

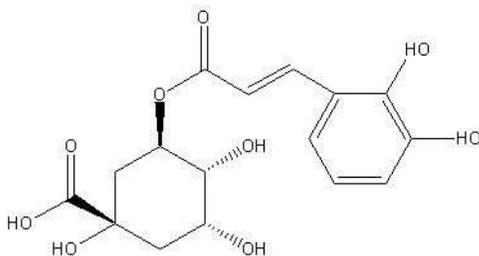


Figura 1.5. **Ácido clorogénico.** Fuente: <http://www.lineaysalud.com/que-es/acido-clorogenico> (Jun.2015)

Estabilidad de ACG. Es relativamente sensible al oxígeno, al pH ácido, pH alcalino y a la luz (Chao, Wang, Zhao, Zhang y Zhang, 2012.). Aunque el ACG es estable en un intervalo de temperatura entre 25 y 78 °C y un valor de pH de 5.7, es inestable a valores de pH de 4, 7 y 10, produciéndose cambios en la protonación de sus grupos hidroxilo (Dina y Herrera, 2005). La inestabilidad del ACG a factores ambientales, limita su aplicación en la industria alimentaria, por esta razón fue seleccionado como agente bioactivo a encapsular en este trabajo.

Actividad terapéutica: Existen reportes sobre efectos terapéuticos del ACG, tales como resistencia a la peroxidación lipídica de LDL, actividad anti-mutagénica y en prevención de inflamación intestinal (Shin *et al.*, 2015). En adición, el ACG contribuye a incrementar la resistencia contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, a reducir la grasa y a construir músculos fuertes; entre otros (Ji, *et al.*, 2013)

CAPITULO 2

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar los efectos de la relación en peso alginato-almidón de tapioca modificado ($R_{AS/AT}$) sobre la cinética de liberación y propiedades fisicoquímicas de cápsulas de hidrogel ($CH_{AC/AT}$) conteniendo ácido clorogénico.

Objetivos particulares

- Determinar la relación en peso alginato de sodio (AS)-cloruro de calcio ($R_{AS:CaCl_2}$) para la obtención de cápsulas de hidrogel AS-almidón de tapioca modificado (AT), con características texturales que las conviertan en sistemas relativamente resistentes a esfuerzos mecánicos.
- Evaluar el efecto de la $R_{AS/AT}$ sobre las propiedades fisicoquímicas (esfericidad, textura, microestructura, eficiencia de encapsulamiento, actividad antioxidante, estabilidad y viscoelasticidad) de las $CH_{AC/AT}$ conteniendo ACG.
- Determinar la cinética de liberación del ACG bajo condiciones gastrointestinales simuladas, así como su relación con las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las $CH_{AC/AT}$.
- Evaluar el potencial de la incorporación de $CH_{AC/AT}$ a un licuado de yogurt (como un derivado lácteo modelo) para la obtención de un alimento nutracéutico, que cuente con una buena aceptación sensorial por parte del consumidor, así como con una estabilidad adecuada del ACG durante el almacenamiento.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

La incorporación de almidón de tapioca químicamente modificado a geles de alginato de calcio reforzará su estructura y en consecuencia mejorará su respuesta mecánica ante la aplicación de esfuerzos externos. Asimismo, variaciones en la relación en peso alginato de sodio-almidón de tapioca químicamente modificado permitirán la obtención de cápsulas de hidrogel cargadas con ácido clorogénico (ACG), con distintos arreglos estructurales, propiedades fisicoquímicas y cinética de liberación de este compuesto bioactivo. De esta manera será posible seleccionar una formulación de cápsulas de hidrogel para la obtención de un derivado lácteo con propiedades nutracéuticas y aceptación sensorial.

CAPÍTULO 4

JUSTIFICACIÓN

El papel de los antioxidantes sobre la salud del ser humano es ampliamente reconocido, existiendo una marcada tendencia en los consumidores hacia la ingesta de antioxidantes naturales; sin embargo, estos agentes bioactivos son fácilmente oxidados y sensibles a factores ambientales. Así el desarrollo de sistemas que actúen como vehículos, protejan la naturaleza química y permitan la incorporación eficiente de antioxidantes en alimentos de consumo popular es un tema de estudio actual. Se ha informado que la funcionalidad de cápsulas de hidrogel de alginato de calcio puede ser mejorada a través de la acción de compuestos que actúen como agentes de relleno estructurales, como es el caso de los almidones. No obstante, no se ha explorado el uso de almidones químicamente modificados, los cuales presentan resistencia a la digestión. Es interesante entonces utilizar almidón de tapioca químicamente modificado (AT) como agente de relleno para la fabricación de cápsulas de hidrogel de alginato de calcio conteniendo ácido clorogénico (ACG, un antioxidante natural); así como determinar el efecto de diferentes relaciones en peso alginato de sodio-AT sobre la estructura, propiedades fisicoquímicas, eficiencia de encapsulamiento y cinética de liberación de ACG bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

CAPITULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Alginato de sodio grado alimenticio (AS; GA 175, 60.5% de ácido gulurónico) fue adquirido en CP Kelco (Lille Skensved, Dinamarca). Almidón de tapioca químicamente modificado y refinado para uso en alimentos (National Frigex, crosslinked, EU Clasificación 1442, $D_{4,3} = 13.26 \mu\text{m}$), se obtuvo de Ingredion México (Guadalajara, Estado de Jalisco, México); este almidón había sido sometido a una hidrólisis ácida suave, para reducir el contenido en amilosa, de un 25% a 1 %, se deshidrató y estabilizó térmicamente (125°C a 2 atm). Se sabe que los gránulos de almidón de relleno ofrecen estabilidad ante los choques térmicos y bajo las condiciones de gelación, por lo que es necesario mencionar, que el almidón de tapioca modificada, no tiene propiedades que se comparen con el almidón proveniente de otras fuentes botánicas, en este caso, sólo fue utilizado para estudiar el efecto como almidón de relleno, en nuestros sistemas de encapsulación, dicho almidón resistente, ofrece, tanto la reducción de costos, como una estabilidad mecánica (López-Córdoba *et al.*, 2014). Ácido clorogénico (ACG, peso molecular = 354.31 Da), extracto de bilis porcina (B8631) y los radicales libres, DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazil) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Etanol, metanol, citrato de sodio, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y cloruro de calcio, grado analítico, se adquirieron de Química Laitz, (Ciudad de México, México). Toda el agua utilizada fue destilada y desionizada (ADD).

5.2. Elaboración de cápsulas de hidrogel usando diferentes relaciones en peso: AS/Ca^{2+} ($R_{\text{AS}/\text{CaCl}_2}$)

Cuando el AS entra en contacto con iones Ca^{2+} en solución, ocurre una reacción de entrecruzamiento entre este catión y los aniones carboxilato presentes en las unidades de guluronato del alginato, resultando la formación de un gel (Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga, 2006). Así, la relación en peso AS/Ca^{2+} ($R_{\text{AS}/\text{CaCl}_2}$) es crucial sobre las características del gel formado. Por ello fue necesario determinar, mediante una titulación potenciométrica, el total de miliequivalentes (meq.) de grupos carboxilato del AS: 40 mL de una solución acuosa conteniendo 2 g de AS/100 mL (pH 6.7), fue titulada con HCl (0.1 N) hasta un pH 3.5, que es el valor de su pKa (Mi, Sung y Shyu, 2002). Un periodo de reposo de 60 s entre dos alícuotas (0.1 mL) se aplicó para permitir que la reacción llegase al equilibrio. El pH de la solución fue monitoreado continuamente con un potenciómetro (Hanna Instruments, model HI 98240, Smithfield, RI, EUA) a 25 °C. Los meq. de HCl necesarios para alcanzar el pKa, se duplicaron para calcular el total de meq. de grupos carboxilato presentes en esa solución de AS (1.86 meq/g). Esto significa que 1 g de AS requirió 0.128 g de CaCl_2 (0.046 g Ca^{2+}). A partir de

estos resultados se prepararon seis variaciones de cápsulas de hidrogel de alginato de calcio ($CH_{AC:CaCl_2}$) usando diferentes relaciones en peso $R_{AS/CaCl_2}$: 1/0.128, 1/0.256, 1/1.28, 1/2.56, 1/6.4 y 1/12.8; de esta manera la cantidad de $CaCl_2$ añadida a cada solución fue 0.256, 0.512, 2.56, 2.56, 5.12, 12.8 y 25.6 g/100 mL, respectivamente. Las cápsulas fueron codificadas como: $CH_{0.128}$, $CH_{0.256}$, $CH_{1.28}$, $CH_{2.56}$, $CH_{6.4}$ y $CH_{12.8}$, donde el subíndice numérico corresponde a la $R_{AS/CaCl_2}$.

Las CH_{AC} fueron preparadas mediante la técnica de extrusión (Sandoval-Castilla, *et al.*, 2010), con algunas pequeñas modificaciones. Soluciones de AS (2g/100 mL) se prepararon, desgasificaron y almacenaron durante 24 h a 4 °C para permitir la completa hidratación del AS. Las cápsulas se formaron mediante la adición gota a gota de 20 mL de la solución de AS en 160 mL de las diferentes soluciones de $CaCl_2$, conteniendo las concentraciones en peso requeridas para lograr cada $R_{AS/CaCl_2}$, con la ayuda de una jeringa con una aguja de 0.8 mm, 30½ G. (Muthukumarasamy, Allan y Holley, 2006). Las CH_{AC} se mantuvieron en la solución de $CaCl_2$ por 30 min a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) para su endurecimiento, se cosecharon por filtración a través de una malla plástica de 0.19 mm y lavaron con ADD tres veces. La $R_{AS/CaCl_2}$ que produjo las CH_{AC} con mayor esfericidad y propiedades texturales fue utilizada para preparar las cápsulas de hidrogel de alginato de calcio-almidón de tapioca modificado ($CH_{AC/AT}$).

5.3. Elaboración de cápsulas de hidrogel de alginato de sodio-almidón de tapioca modificado ($CH_{AC/AT}$)

Se prepararon cuatro variaciones de $CH_{AC/AT}$ a partir de 100 mL de soluciones conteniendo 2 g de AS y diferentes cantidades de AT: 0.0, 0.67, 2.0 y 6.0 g para lograr relaciones en peso ($R_{AS/AT}$) de 1/0, 0.75/0.25, 0.5/0.5 y 0.25/0.75, respectivamente. Las $CH_{AC/AT}$ fueron codificadas como: $CH_{1/0}$, $CH_{0.75/0.25}$, $CH_{0.5/0.5}$ y $CH_{0.25/0.75}$. Las soluciones se almacenaron 24 h a 4 °C para completa hidratación, se desgasificaron mediante ultrasonido y se adicionaron con 40 mg de ACG. Las $CH_{AC/AT}$ se formaron mediante la adición gota a gota de las soluciones AS/AT en una solución de $CaCl_2$ a la concentración $R_{AS/CaCl_2}$ obtenida en la sub-sección 5.2. Posteriormente, las $CH_{AC/AT}$ se mantuvieron en la solución de $CaCl_2$ por 30 min, para su endurecimiento. Después de este tiempo, las $CH_{AC/AT}$ fueron filtradas y lavadas con una solución amortiguadora (ácido acético-acetato, pH 5.5). Muestras de cápsulas frescas se usaron para las determinaciones de diámetro, esfericidad y características texturales. Otras muestras de cápsulas se deshidrataron en una estufa de convección al vacío (304 mm Hg) (Shellab modelo 1410, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, EUA) a 45 °C, hasta peso constante y una actividad de agua cercana a 0.35. Las cápsulas deshidratadas se colocaron en un desecador conteniendo una

solución saturada de $MgCl_2$ a temperatura ambiente hasta su caracterización. La actividad de agua en el desecador a esta temperatura fue de alrededor de 0.32. Las cápsulas deshidratadas se usaron para el resto de los experimentos.

5.4. Morfología, diámetro y esfericidad de las cápsulas

Treinta cápsulas $CH_{AC/CaCl_2}$ y $CH_{AC/AT}$, seleccionadas de manera aleatoria, se observaron en un microscopio de contraste de fases (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Ltd., Japón). Micrografías a una magnificación de $4\times$ fueron tomadas con una cámara digital MoticCam 2500 (Motic China Group Co. Ltd., Ningbo, Zhejiang, China). El diámetro de cada variación de cápsulas fue medido usando el software Motic-Images Plus version 2.0 software (Motic China Group Co. Ltd., Ningbo, Zhejiang, China). El factor de esfericidad (FE) se calculó mediante la siguiente ecuación (López-Córdoba *et al.*, 2014):

$$FE = \frac{d_{\max} - d_{\min}}{d_{\max} + d_{\min}}$$

Donde d_{\max} es el diámetro más grande y d_{\min} es el diámetro más pequeño, perpendicular al d_{\max} . El factor de esfericidad varía desde 0 para una esfera perfecta a aproximadamente la unidad para un objeto alargado.

5.5. Propiedades texturales de las cápsulas

Las propiedades texturales primarias de dureza, cohesividad y elasticidad (Bourne, 2002) de las $CH_{AS/CaCl_2}$ y $CH_{AC/AT}$ se determinaron usando un texturómetro Stable Micro Systems, modelo TA-XT2i (Texture Technologies Corp., White Plains, NY, EUA), equipado con una celda de carga de 5 kg. Debido a la naturaleza particulada de las cápsulas, para garantizar una buena reproducibilidad del método, se utilizó una sonda cilíndrica de acrílico con una gran área de contacto (35 mm). Cada medición se llevó a cabo a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) sobre 30 g de cada variación de $CH_{AS/CaCl_2}$ y $CH_{AC/AT}$ colocadas en el fondo de una caja Petri. La detección automática del contacto de la sonda con las cápsulas se realizó a una fuerza de contacto de 0.005 N (Sandoval-Castilla *et al.*, 2010). Las muestras se comprimieron un 30%, usando dos ciclos de compresión a una velocidad constante del

cabezal de 1.0 mm/s. Las propiedades evaluadas se obtuvieron usando el Software del equipo Texture Expert Windows Version 3.2.

5.6. Microestructura

La microestructura de las $CH_{AC/AT}$ deshidratadas se observó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Las muestras fueron cubiertas con una capa fina de oro en un Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón) y observadas usando un microscopio de alto vacío JEOL Scanning Electron Microscope JMS-6360LY (Jeol Ltd., Akishima, Japón).

5.7. Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)

Estudios de CDB fueron realizados a las cápsulas deshidratadas CH_{CA} y $CH_{AC/AT}$, con y sin ACG, así como a los polvos de AS y ACG, usando un equipo Q1000 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) previamente calibrado con un estándar de Indio. Muestras de 3.0 mg fueron pesadas en charolas de aluminio herméticamente cerradas, adicionadas con 6 μ L de ADD y selladas. Las charolas se equilibraron por 16 h a temperatura ambiente antes de ser colocadas en la cámara del equipo. Las muestras se calentaron de 20 a 300 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. Una charola vacía se usó como referencia. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

5.8. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier-Reflectancia Total Atenuada (EITF-RTA)

Se evaluaron las interacciones entre AS, AT y ACG por EITF-RTA. Para este fin, espectros EITF se obtuvieron para AS, AT y ACG por un lado, y por el otro, para las cápsulas deshidratadas CH_{AC} y $CH_{AC/AT}$ con y sin ACG, usando un Spectrum 100 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), equipado con un accesorio de muestreo RTA con un cristal universal de diamante. La velocidad del espejo fue 0.3 cm/s. Antes de cada medición el cristal RTA se limpió cuidadosamente con etanol. Durante la medición, la muestra estuvo en contacto con el diamante universal RTA. Se realizó un espectro con la celda vacía, el cuál sirvió como blanco. Este espectro se restó en todos los casos para remover los efectos distorsionadores del agua en la región de 1200-900 cm^{-1} . Para cada caso, el espectro representó un promedio de cuatro barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros fueron corregidos respecto a la línea base a 1200-900 cm^{-1} mediante el dibujo de una línea recta.

5.9. Actividad antioxidante del ACG y eficiencia de encapsulación

La actividad antioxidante del ACG encapsulado se determinó usando el radical libre 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH), de acuerdo al método propuesto por López-Córdoba *et al.* (2014), con pequeñas modificaciones. Un peso conocido de CH_{AC/AT} (~ 2.5 g) fue desintegrado mediante su suspensión en 16 mL de solución de citrato de sodio (7.5 %, p/v), aplicando agitación continua a 180 rpm y manteniendo la temperatura a 37 °C hasta su total disolución (Hosseini *et al.*, 2014). Una alícuota de 250 µL de sobrenadante se retiró y mezcló con 250 µL de agua y 3.5 mL de solución etanólica de DPPH (23 mg DPPH/L). Se utilizó un blanco con todos los elementos, excepto el ACG. La absorbancia se determinó a 517 nm hasta que la reacción alcanzó un valor estable. La actividad antioxidante se expresó como el porcentaje de inhibición (% I) del radical libre DPPH y se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%I = \frac{Abs_b - Abs_m}{Abs_b} \times 100$$

Donde Abs_b y Abs_m corresponden a la absorbancia del blanco (CH_{AC/AT} sin antioxidante) y la absorbancia de la muestra (CH_{AC/AT} con antioxidante), respectivamente. Se obtuvo una curva estándar de concentraciones de ACG (0.0125 a 0.4 mg/mL) contra valores de absorbancia usando DPPH como se describió arriba, para estimar la cantidad de ACG encapsulado. La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{ACG \text{ encapsul. (mg)}}{ACG \text{ inicial (mg)}} \times 100$$

5.10. Hinchamiento

Muestras de cápsulas deshidratadas (20 g) y 300 mL de agua se colocaron en matraces y se mantuvieron en agitación continua a 37 °C y 180 rpm. El proceso de hinchamiento se monitoreó hasta por 180 min, tomando muestras de las cápsulas hinchadas cada 10 min; el exceso de agua se removió de la superficie de las cápsulas con papel filtro Whatman No. 1 y el peso húmedo de éstas se determinó inmediatamente. La relación de hinchamiento de las cápsulas (% Hn) se estimó de acuerdo a la siguiente relación:

$$\% \text{Hn} = \frac{P_t - P_0}{P_0} \times 100$$

Donde P_t y P_0 son los pesos de las cápsulas hinchadas a tiempo t y el peso de las cápsulas deshidratadas, respectivamente.

5.11. Estabilidad del ACG encapsulado

El objetivo de elaborar $\text{CH}_{\text{AC/AT}}$, fue proteger al ACG contra condiciones ambientales adversas (luz y oxígeno). $\text{CH}_{\text{AC/AT}}$ se colocaron en cajas Petri cubiertas con papel celofán transparente y se expusieron a luz artificial, temperatura ambiente y humedad ambiental (66%). Se determinó la actividad antioxidante del ACG contenido en las $\text{CH}_{\text{AC/AT}}$ después de 28 días, de acuerdo al método descrito en la sub-sección 5.9. La estabilidad del ACG se determinó como la relación de su actividad antioxidante después de 28 días de almacenamiento ($t = 672$ h) relativa a aquella encontrada inmediatamente después de su elaboración ($t = 3$ h).

5.12. Cinética de liberación del ACG encapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas

La liberación de ACG se determinó mediante la exposición secuencial de las $\text{CH}_{\text{AC/AT}}$ a jugo gástrico simulado y sales biliares. Muestras deshidratadas de $\text{CH}_{\text{AC/AT}}$ (~ 5 g) se colocaron en vasos de precipitados conteniendo 8.8 mL de solución gástrica simulada, ajustada a un pH de 2.3 con HCl 0.1 N (Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato- Calleros, Pedroza-Islas, & Vernon-Carter, 2009) e incubó a 37 °C por 2 h en un baño de agua con agitación orbital (Precision Scientific 360, Cole Parmer, Chicago, IL, EUA). Se tomaron alícuotas de 250 μL del sobrenadante a 0, 1, 3, 5, 15, 30, 60, 90 y 120 min. Después de su exposición a jugo gástrico simulado, las $\text{CH}_{\text{AC/AT}}$ se recuperaron por filtración, lavaron con ADD y se les eliminó el exceso de agua usando papel filtro. Posteriormente, se depositaron en vasos de precipitados de vidrio conteniendo 8.8 mL de una solución de extracto de bilis porcina (0.3 g/100 mL, pH 6.8). Las mezclas $\text{CH}_{\text{AC/TS}}$ -sales biliares se incubaron a 37 °C durante 2 h en el baño de agua (Sandoval-Castilla *et al.*, 2010). Se tomaron alícuotas de 250 μL de sobrenadante a 0, 3, 5, 15, 30, 60, 90 y 120 min. El ACG liberado se determinó de acuerdo al procedimiento indicado en la sección 5.9.

5.13. *Propiedades viscoelásticas*

Las propiedades viscoelásticas dinámicas se determinaron a los hidrogeles en forma de cilindros (5 ± 0.3 mm de altura y 50 ± 0.2 mm de diámetro) de alginato de calcio-almidón de tapioca. Los hidrogeles se formaron al depositar 24 mL de solución de AS (2g/100 mL) y la cantidad requerida de AT, para obtener valores de $R_{AS/AT}$ de: 1/0, 0.75 /0.25, 0.5 /0.5 en placas Petri (diámetro: 9.5 cm \times altura: 1.3 cm). Posteriormente, 6 mL de solución de $CaCl_2$ a la misma concentración utilizada para la formación de $CH_{AC/AT}$. (Sección 5.3), fueron adicionados sobre las soluciones de AS/AT, las cuales se dejaron reposar por 12 h a temperatura ambiente, para permitir la formación de los hidrogeles. Para simplificar, los hidrogeles formados se seguirán nombrando como variaciones $CH_{AC/AT}$. Las mediciones se llevaron a cabo usando un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania), con una geometría de plato-plato estríada de 50 mm de diámetro (PP50-2). La distancia entre las placas se fijó en 5 mm. Las muestras cilíndricas de hidrogel se colocaron en el equipo y se dejaron reposar por 5 min para la recuperación de su estructura. Se llevaron a cabo barridos de amplitud a 5 °C para caracterizar la región viscoelástica lineal de los geles, aplicando un rango de deformación de 0.01 a 100% a 1 Hz. El mantenimiento de la temperatura se logró con un sistema de control y medición de temperatura Physica TEK 150P. El módulo de pérdida o factor de cedencia ($Tan \delta = G''/G'$) fue obtenido mediante el software del equipo. Los análisis se realizaron 24 h después de haberse obtenido los geles

5.14.- *Propuesta de desarrollo de un alimento funcional lácteo que incorpore las $CH_{AC/AT}$*

Una vez que se eligió una formulación de $CH_{AC/AT}$ acorde a las características de liberación deseadas, se probaron distintas marcas y presentaciones de yogurt, aflanados, bebibles y licuados de yogurt, los dos últimos con cereales, tal que, al incorporar las cápsulas justo antes de su consumo, estas fueran ingeridas íntegramente, procurando que no fueran percibidas. Sumado a esto, se consideró que el sabor de las cápsulas, fuera enmascarado por los saborizantes del producto lácteo comercial.

5.15.- *Estabilidad de las $CH_{AC/AT}$ en refrigeración*

Una cierta cantidad de $CH_{AC/AT}$ fueron almacenadas en un frasco plástico, cerrado herméticamente, en ausencia de la luz y en refrigeración (4 ° C), en las cuales se monitoreó por 35 días, los siguientes parámetros: cantidad de antioxidante, dureza, humedad e hinchabilidad, esto de acuerdo a las metodologías descritas anteriormente.

5.16.- Prueba de aceptación por consumidores

Una vez que se propuso el producto lácteo adecuado, de acuerdo a la sección 5.14, a partir de una población universitaria, se tomó una muestra de 79 consumidores, entre 19 a 38 años de edad, siendo 62.02 % mujeres y 37.97 % hombres. A cada uno de ellos se les presentó dos muestras codificadas previamente al azar, cada una con 16 g de licuado de yogurt con cereales, sabores fresa (LYF) y nuez (LYN), marca Lala (76.44% licuado de yogurt y 22.29 % yogurt aplanado natural); también, cada muestra contaba con un contenedor cilíndrico de fácil apertura (3.3 cm diámetro y 1.4 cm de altura) con 0.2g de $CH_{0.5/0.5}$ (1.27 %) Se les informó brevemente los beneficios que trae el consumo de antioxidantes de origen vegetal y luego de haber depositado las cápsulas en el licuado de yogurt y mezclado vigorosamente, evaluaron de forma individual en una computadora portátil; donde calificaron primero los atributos de apariencia y luego de consumir la muestra de un solo trago, evaluaron el sabor y la textura en boca, también evaluaron el agrado general (AG) y finalmente, la intención de compra (IC). Se usaron escalas hedónicas de 7 puntos para los atributos de sabor, textura en boca y AG (en este caso se usó una escala de 6 puntos) y para IC se usó una escala categórica de 4 puntos. Donde, tanto para evaluar atributos, como AG, en la escala, el número menor correspondió a la calificación más baja, me disgusta extremadamente (evaluación negativa) y la mayor, a la más alta, me gusta extremadamente (evaluación positiva). Mientras que para la IC, la ponderación fue; (1).Nunca lo compraría, (2). Esporádicamente lo compraría, (3). Posiblemente sí lo compraría y (4).Definitivamente sí lo compraría Dicha prueba duró aproximadamente 10 minutos por persona (Anexo 1). Los datos fueron capturados en línea por con el software *Fizz, versión 2.5*, (Biosystems, Francia) para análisis sensorial y pruebas al consumidor.

5.17. Análisis de datos

Los ensayos se realizaron por triplicado a partir de experimentos independientes, usando un diseño de experimentos completamente al azar, se sometieron los datos experimentales a un Análisis de Varianza de Clasificación Simple. Para cada caso requerido, se utilizó la prueba de Tukey, con una $p \leq 0.05$, con el fin de verificar si existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos. Para ello, se utilizó el software *Statgraphics Plus*, (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA). Para el estudio sensorial se aplicaron las pruebas t-student y Wilcoxon empleando el *Fizz, versión 2.5*, (Biosystems, Francia).

CAPITULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Efecto de la relación en peso: alginato de sodio/Ca², sobre las propiedades texturales de las cápsulas hidratadas

De acuerdo a los resultados de titulación, CH_{0.128} correspondió a la cantidad mínima de CaCl₂ requerida para neutralizar los grupos carboxilo disponibles de AS; esto es, 0.128 g de CaCl₂ (0.046 g de Ca²⁺) por gramo de AS. Una cantidad por arriba de este valor es considerada un exceso de CaCl₂, el cual induce enlaces intermoleculares entre el Ca²⁺ y las cadenas poliméricas de AS para la formación de geles. Se ha sugerido que el entrecruzamiento con los residuos G (grupos carboxilato) de los bloques G mediante el catión calcio, forma una estructura llamada “caja de huevo”, la cual controla la resistencia y las propiedades mecánicas de los geles de alginato (Smidsrod y Skjak-Braek, 1990). En la Tabla 6.1 se presentan las propiedades texturales de las CH_{AC/CaCl2} como una función del contenido de calcio. La adición de CaCl₂, entre 0.128 y 1.28 g por gramo de AS, produjo diámetros significativamente más pequeños y mayor esfericidad en las cápsulas, inducidos por encogimiento debido a fuerte entrecruzamiento entre las moléculas de AS. Sin embargo, incrementos adicionales en la concentración de CaCl₂ no tuvieron efecto significativo en el diámetro o esfericidad de las cápsulas. Por otro lado, la dureza, la cohesividad y la elasticidad tendieron a incrementar como el contenido de calcio se incrementó. En particular, valores de cohesividad y elasticidad elevados son importantes para la estabilidad de las cápsulas durante su manejo (por ejemplo, extrusión). Las CH_{6.4} y CH_{12.8} exhibieron los valores más elevados de las características texturales evaluadas, los cuales no fueron significativamente diferentes. Así se eligió una R_{AS/CaCl2} de 1/6.4, para obtener las CH_{AC/AT}. Esto sugiere que la adición de CaCl₂ alrededor de 50-100 veces más respecto a la concentración mínima requerida para la formación de enlaces intramoleculares, pudiera permitir la formación de enlaces intermoleculares entre las moléculas de AS, resultando en propiedades texturales aumentadas.

6.2. Textura de las cápsulas de alginato de calcio-almidón de tapioca modificado

En la Tabla 6.2 se presentan las características geométricas y texturales de las variaciones CH_{AC/AT}. Las cápsulas rellenas con AT tuvieron diámetro significativamente mayor y menor esfericidad que CH_{1/0}; pero no fueron significativamente diferentes entre sí. Las CH_{0.5/0.5} y CH_{0.75/0.25} mostraron significativamente menor contenido de humedad y mejores características texturales y las CH_{0.75/0.25} no presentaron diferencias significativas en contenido de humedad, pero sí significativamente menor dureza y cohesividad que las cápsulas sin AT adicionado (CH_{1/0}). Estos resultados sugieren que es necesario un equilibrio adecuado entre AS y AT para el desarrollo de un arreglo estructura más

estrechamente empacado, donde el AT actúa como un relleno texturizador, proporcionando propiedades viscoelásticas más elevadas a las cápsulas de hidrogel.

Tabla 6.1. Efecto de la relación en peso de alginato de sodio-Ca²⁺ sobre las propiedades geométricas y texturales de las cápsulas de alginato de calcio (CH_{AC}).

Código de la cápsula	Diámetro (mm)	Factor de Esfericidad	Dureza (N)	Cohesividad (relación)	Elasticidad (relación)
CH _{12.8}	1.74 ±0.09 ^a	0.03±0.01 ^a	5.13±0.10 ^c	0.67±0.04 ^d	0.95±0.05 ^e
CH _{6.4}	1.78± 0.08 ^a	0.03±0.01 ^a	5.05±0.10 ^c	0.65±0.02 ^d	0.93±0.03 ^e
CH _{2.56}	1.74± 0.04 ^a	0.03±0.02 ^a	3.33±0.04 ^d	0.63±0.03 ^c	0.87±.01 ^d
CH _{1.28}	2.02± 0.12 ^b	0.04±0.01 ^a	2.34±0.08 ^c	0.62±0.02 ^c	0.57±.01 ^c
CH _{0.256}	2.95± 0.19 ^c	0.07±0.02 ^{ab}	1.97±0.13 ^b	0.51±0.03 ^b	0.51±0.02 ^b
CH _{0.128}	3.72± 0.20 ^d	0.09±0.01 ^b	0.76±0.02 ^a	0.47±0.02 ^a	0.46±0.02 ^a

Los resultados fueron obtenidos a partir de tres corridas experimentales. Superíndice con letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas.

Tabla 6.2. Morfología, humedad y textura de las cápsulas de alginato de sodio-almidón de tapioca modificado (CH_{AC/AT})

Código de la cápsula	Diámetro (mm)	Factor de esfericidad	Humedad (%)	Dureza (N)	Cohesividad (relación)	Elasticidad (relación)
CH _{1/0}	1.74 ±0.08 ^a	0.03±0.01 ^a	89.23±0.59 ^e	5.29±0.07 ^b	0.67±0.01 ^b	0.95±0.01 ^a
CH _{0.75/0.25}	1.93±0.11 ^b	0.05±0.00 ^b	88.88±0.17 ^e	5.01±0.14 ^a	0.54±0.02 ^a	0.98±0.02 ^{ba}
CH _{0.5/0.5}	1.94±0.07 ^b	0.05±0.01 ^b	87.18±0.9 ^b	5.78±0.46 ^b	0.65±0.01 ^b	1.00±0.02 ^b
CH _{0.25/0.75}	1.99±0.02 ^b	0.06±0.01 ^b	81.97±0.51 ^a	9.41±0.02 ^c	0.72±0.01 ^c	1.00±0.03 ^b

Los resultados fueron obtenidos a partir de tres corridas experimentales. Superíndice con letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas.

6.3. Microestructura de las $CH_{AC/AT}$

En la Figura 6 se presentan las imágenes MEB de las variaciones de $CH_{AC/AT}$, correspondiendo de arriba a abajo, a $CH_{1.0/0.0}$, $CH_{0.75/0.25}$, $CH_{0.5/0.5}$ y $CH_{0.25/0.75}$. El panel izquierdo corresponde a una magnificación $70\times$ de las cápsulas completas, mientras que el panel derecho, a una magnificación de $500\times$, revela sus características microestructurales superficiales. $CH_{1.0/0.0}$, conteniendo únicamente alginato, mostró una forma esférica y una superficie bastante lisa, aunque con ciertos hundimientos, los cuales pueden ser el reflejo de la presencia de algunos hoyos internos y aparentes fisuras superficiales (Figuras 6.6.a y 6.6.b). La adición de AT a la matriz de alginato produjo cambios importantes en la microestructura de las cápsulas. Los gránulos de almidón actuaron como relleno de la matriz de alginato. En las Figuras 6.6 c – h es fácilmente discernible que muchos gránulos de AT fueron embebidos en la superficie de las cápsulas, manteniendo su forma y estuvieron caracterizados por la presencia de un vacío central. A medida que la fracción de AT aumentó, las cápsulas presentaron superficies con incrementada tortuosidad y asperosidad, así como con mayor número de “baches” (Figuras 6.6.c-h). De forma interesante, las grietas (fisuras) a lo largo de la superficie de la cápsula, separando los gránulos de almidón embebidos, llevaron a una especie de estructura cavernosa porosa conectada (Chan *et al.*, 2011; Zohar-Perez, Chet y Nussinovitch, 2004). El hundimiento superficial fue menos aparente conforme la fracción de almidón se incrementó, lo que sugiere que los gránulos de almidón funcionaron como soporte estructural de la matriz alginato, modulando el encogimiento y fractura superficial después del secado.

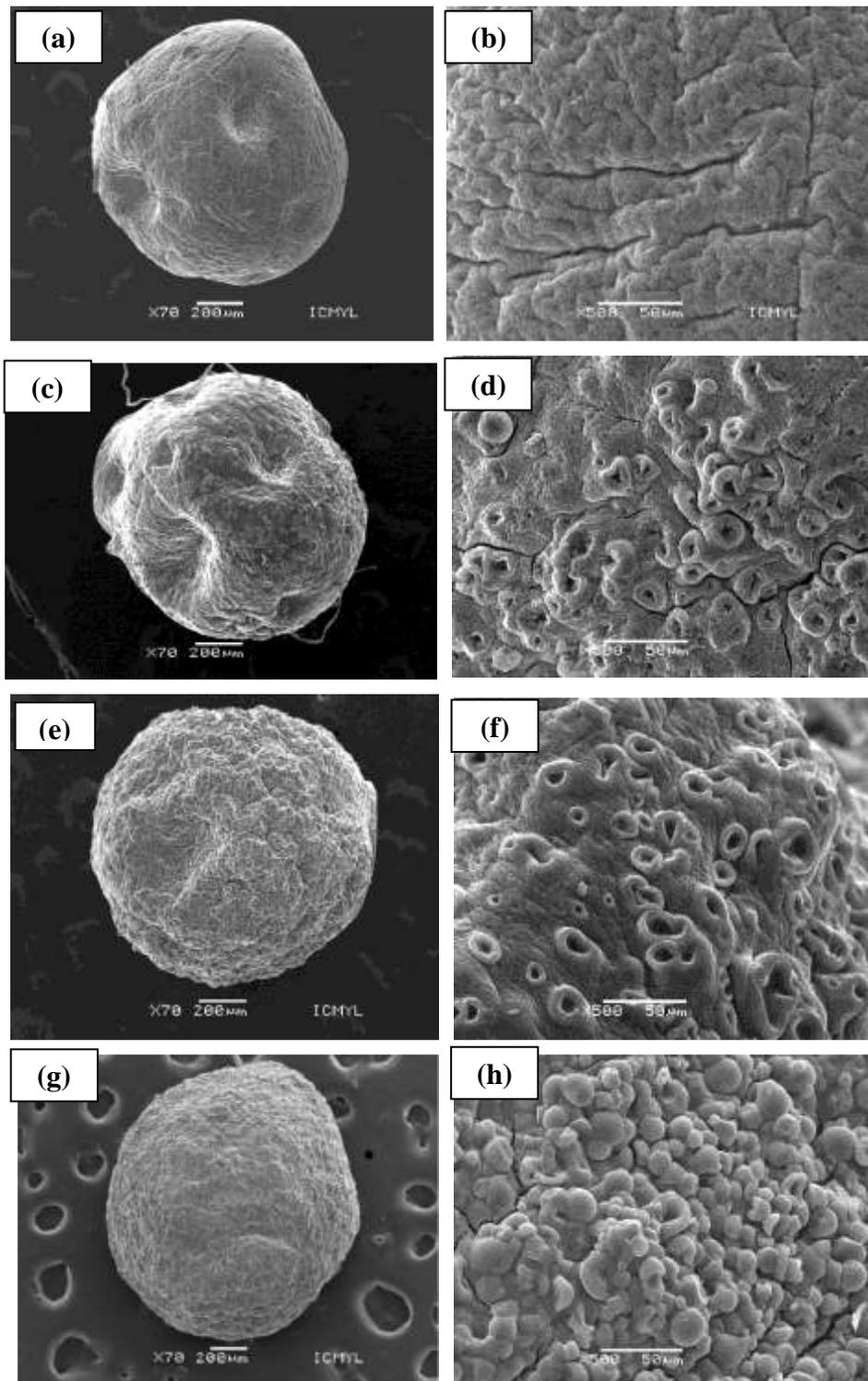


Figura 6.6. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido de la superficie de las cápsulas de hidrogel de alginato de calcio con almidón de tapioca ($CH_{AC/TS}$). Izquierda, magnificación a 70×; derecha magnificación a 500×: (a y b) $CH_{1/0}$, (c y d) $CH_{0.75/0.25}$, (e y f) $CH_{0.5/0.5}$ y (g y h) $CH_{0.25/0.75}$.

Cortes transversales se realizaron a las $CH_{AS/TS}$ para explorar los efectos del AT en su estructura interna mediante imágenes MEB (Figura 6.7). Las cápsulas de alginato de calcio ($CH_{1.0/0.0}$) (Figura 6.7a) mostraron una gran cantidad de fisuras delgadas internas, las cuales también fueron observadas en la superficie (Figura 6.6.b). La estructura interna fue homogénea, sin aparente estratificación que pudiera darse por los mecanismos de reticulación que actúan desde la superficie hasta las regiones internas. En $CH_{0.75/0.25}$, la adición de AT cambió la estructura interna, debido a la distribución homogénea de los gránulos de almidón en las regiones intersticiales (Figura 6.7.b). La adición de relativamente pequeñas cantidades de AT redujeron la extensión de las fisuras internas presentes en las $CH_{1.0/0.0}$ (Figura 6.7.a) y produjeron la formación de grietas alrededor de los gránulos de almidón embebidos (Figuras 6.7.b y 6.7.c), probablemente inducidas por el proceso de secado. A medida que la cantidad de AT se incrementó, las fisuras en la matriz tendieron a desaparecer y sólo ocurrir alrededor de los gránulos de almidón (Figura 6.7d). Aunque las imágenes MEB de las superficies de las cápsulas (Figuras 6.6. d, f y h, magnificación 500×) mostraron que los gránulos de almidón embebidos tendieron a presentar huecos centrales “tipo cráter”, las imágenes de los cortes transversales (magnificación 2000×) no mostraron esos aparentes huecos. Así los huecos no fueron causados por el proceso de encapsulación. Las vistas de los cortes transversales, lateral (Figura 6.7.e, magnificación 3000×) y perpendicular (Figura 6.7.f, magnificación 5000×), mostraron que los aparentes hoyos o huecos visualizados a bajas magnificaciones, pudieran ser los remanentes de la cruz de Malta en gránulos de almidón nativo.

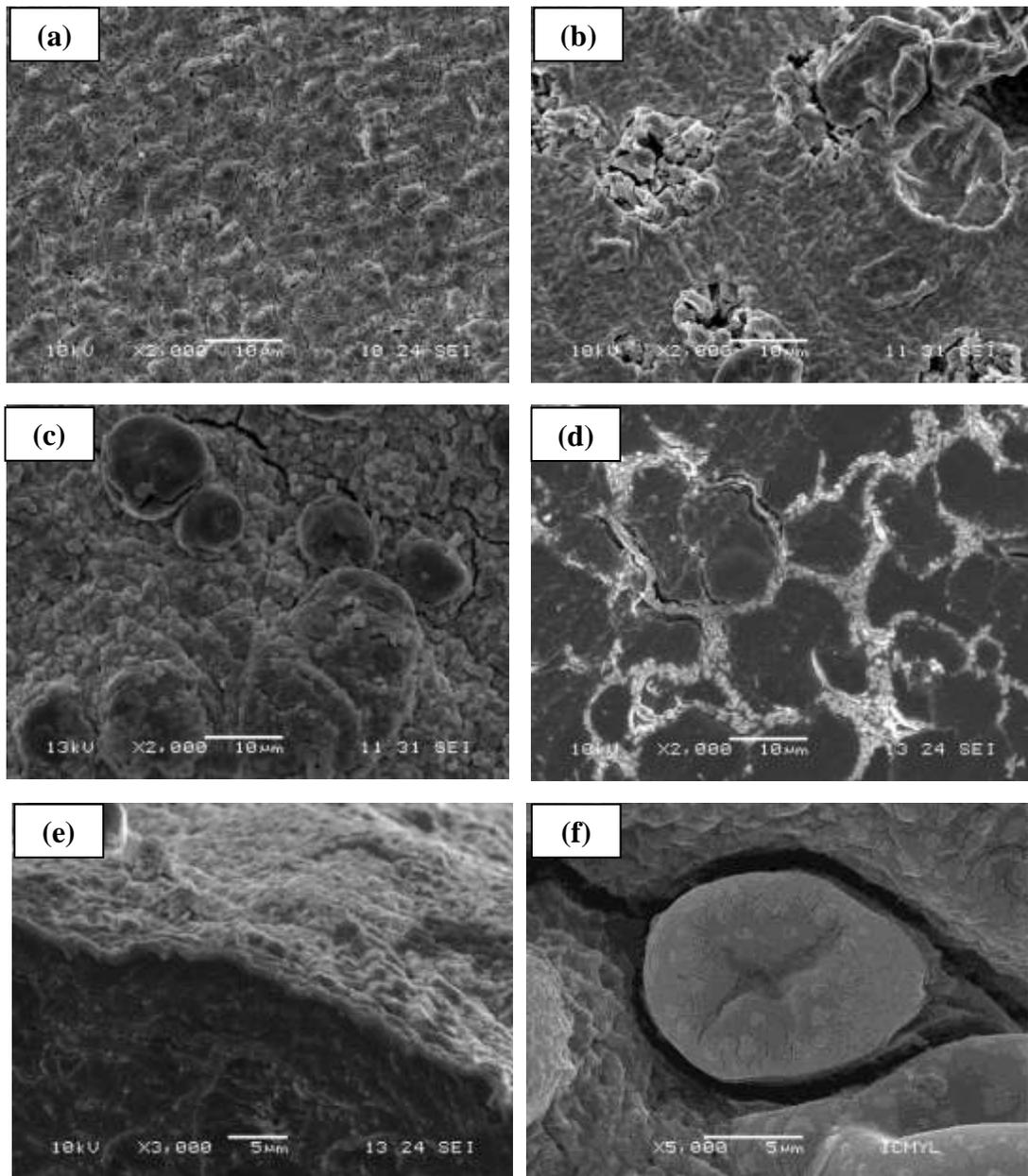


Figura 6.7. Imágenes mediante Microscopía Electrónica de Barrido: Cortes transversales de las cápsulas de hidrogel de alginato de calcio con almidón de tapioca (CH_{ACTS}): (a) $CH_{1/0}$, (b) $CH_{0.75/0.25}$, (c) $CH_{0.5/0.5}$, (d) $CH_{0.25/0.75}$ a magnificaciones de 2000×; (e) Vista lateral de $CH_{0.25/0.75}$ a magnificaciones de 3000×, que muestran la internación de los gránulos de almidón en la matriz de alginato de sodio; y (f) $CH_{0.25/0.75}$ con magnificación a 5000×, donde se puede observar la cruz de Malta de restos de almidón nativo.

6.4. Eficiencia de encapsulamiento y actividad antioxidante del ACG

En la Tabla 6.3 se presentan las características de encapsulación de las CH_{AC/AT}. La incorporación de AT incrementó la eficiencia de encapsulamiento de ACG; a continuación se expone una posible explicación: Durante el proceso de entrecruzamiento del alginato, pérdida de ACG puede ser causada mediante difusión desde la matriz polimérica de AS hacia la solución de CaCl₂. Es muy probable que el encogimiento de las cápsulas inducido por el entrecruzamiento, incrementó la pérdida de ACG. En este sentido, la incorporación de gránulos de almidón redujo la pérdida del antioxidante, por disminuir su difusión efectiva a través de la microestructura del alginato de calcio. Dada la estrecha porosidad de los gránulos de almidón (Sujka y Jamroz, 2007), ellos actuaron como una barrera sólida que obstruyó el transporte por difusión desde el interior de la cápsula hacia la superficie. En otras palabras la eficiencia de entrapamiento aumento conforme incrementó la tortuosidad producida por AT hasta un valor prácticamente constante. La actividad antioxidante de las cápsulas, cuantificada en términos de porcentaje de inhibición (%I), mostró un comportamiento similar al de la eficiencia de encapsulación, presentando una relación lineal descrita por la siguiente ecuación:

$$\% I = - 22.60 + 1.014 \%EE$$

Esto sugiere que el ACG tiene sólo una interacción débil con la matriz de la cápsula.

Tabla 6.3. Eficiencia de encapsulación, características de liberación, porcentaje de inhibición e hinchamiento de las cápsulas CH_{AC/AT}.

Código de cápsula	Eficiencia de encapsulación (%)	Inhibición (%)	Relación de hinchazón (%)	Liberación (%) (2h, pH 2.3)	Liberación (%) (2h, pH 6.8)
CH _{1/0}	81.69±1.8 ^a	60.29±1.5 ^a	107.04±5.1 ^a	34.46±3.143 ^b	10.75±0.889 ^b
CH _{0.75/0.25}	84.4±1.3 ^b	62.94±0.87 ^b	117.50±6.1 ^a	72.61±4.953 ^c	17.28±1.6 ^d
CH _{0.5/0.5}	98.76±1.4 ^c	77.61±0.93 ^d	156.85±7.4 ^b	37.36±1.511 ^b	12.35±0.65 ^b
CH _{0.25/0.75}	96.71±0.9 ^c	75.42±0.07 ^c	163.84±8.0 ^b	24.95±0.935 ^a	8.329±0.176 ^a

Los resultados fueron obtenidos a partir de tres corridas experimentales. Superíndice con letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas.

6.5. Hinchamiento

En muchos casos, pudiera ser conveniente secar las cápsulas y reconstituirlas antes de su uso para aplicaciones específicas. De acuerdo con los resultados referentes a cápsulas deshidratadas de alginato-almidón informados por López- Córdoba *et al.* (2014), durante los primeros 8-12 min, el hinchamiento de las cápsulas mostró un rápido incremento. Posteriormente, el hinchamiento mostró un incremento lento hasta lograr un valor estable. En el caso de nuestras $CH_{AC/AT}$ deshidratadas, la relación de hinchazón dependió de la fracción de almidón (Tabla 6.3). En efecto, a mayor contenido de almidón, mayor fue la relación de hinchazón. Una posible explicación de la hinchazón de las cápsulas es la que sigue. Las micrografías MEB presentadas en la Figura 6.6, mostraron que los gránulos de almidón redujeron fracturas grandes, pero a expensas de un incremento de fisuras alrededor de los gránulos embebidos. Tal microestructura indujo el movimiento y filtración de fluidos a través del material poroso (percolación). La presión osmótica local inducida por la percolación del agua llevó a la formación de protuberancias y de aquí a la reducción de la resistencia al transporte dentro de la matriz de encapsulación. Adicionalmente, los gránulos de almidón aumentaron el transporte de agua vía absorción por la formación de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo (Tako, Tamaki, Teruya y Takeda, 2014). De esta forma, las relaciones de hinchazón relativamente elevadas observadas para $CH_{0.5/0.5}$ y $CH_{0.25/0.75}$, reflejan la estructura porosa cavernosa altamente conectada (Figuras 6.7.b - 6.7.e), las cuales permitieron una fácil absorción de agua hacia al interior de la matriz de las cápsulas.

6.6. Estabilidad

Se sabe que existen ciertos factores ambientales que pueden tener efectos negativos sobre la actividad antioxidante del ACG. El objetivo del desarrollo de este sistema de encapsulación, además de tener un vehículo en estado sólido, fue el de proteger al ACG contra los efectos degradativos provocados principalmente por la luz y el oxígeno, condiciones ordinarias bajo las que se pueden almacenar las cápsulas. La actividad antioxidante relativa después de 28 días de almacenamiento, con respecto a la actividad antioxidante inmediata a su manufactura, varió de la siguiente manera: $CH_{1.0/0.0}$ (85.73 ± 0.78 %), $CH_{0.75/0.25}$ (80.52 ± 0.68 %), $CH_{0.5/0.5}$ (84.02 ± 0.87 %) y $CH_{0.25/0.75}$ (88.73 ± 0.78 %). Nótese que las $CH_{0.75/0.25}$, con una cantidad relativamente baja de AT, fué la que ofreció una menor protección contra degradación del ACG. Estos resultados parecen estar asociados estrechamente con la microestructura superficial e interna de las cápsulas (Figuras 6.6 y 6.7), y son acordes con las tasas de liberación de ACG bajo condiciones gastro intestinales simuladas, las cuales se discutirán en la sección 6.9.

6.7. Análisis térmico

La Figura 6.8 muestra los termogramas de CDB del ACG (curva 6.8.A), alginato de sodio (curva 6.8.B), cápsulas de alginato de calcio ($\text{CH}_{1.0/0}$) sin y con ACG (curvas 6.8.C y D) y cápsulas de alginato de calcio-almidón de tapioca ($\text{CH}_{0.5/0.5}$) sin y con ACG (curvas 6.8.E y F). El ACG (curva 6.8.A) mostró un pico endotérmico hacia abajo en 211 °C, lo que indica el rompimiento de la molécula a altas temperaturas. Similarmente, el AS (curva 6.8.B) presentó un pico exotérmico a 225-235 °C, el cual resultó del rompimiento de la molécula (Mimmo, Marzadori, Montecchio y Gessa, 2005). Este pico exotérmico fue removido después del proceso de entrecruzamiento con Ca^{+2} (curva 6.8.C), indicativo de que el ion calcio estabilizó la estructura del biopolímero vía la conformación de una estructura tipo caja de huevo formando alginato de calcio (Smidsrod y Skjak-Braek, 1990). Puede observarse que después de la adición de ACG (curva 6.8.D), la endoterma característica en alrededor de 105 y 108 °C (correspondiente a la fusión de las cápsulas) no cambió apreciablemente, lo que sugiere que no hubo interacción entre el ACG y el AS. En este mismo sentido, tanto para el AS (figura 6.8.B), como para todos los casos de alginato de calcio (figuras 6.8.C, D, E y F), se presentaron picos a los 180 °C; mientras que las muestras de alginato de calcio 6.8.C y alginato de calcio-almidón de tapioca modificado, ambos sin ACG, se observó un segundo pico endotérmico hacia la derecha (~ 190 °C), siendo de menor intensidad en ausencia de almidón, con respecto al que tiene AT, lo que sugiere que la estructura de la cápsula con almidón es más estable y requiere de mayor energías para romperla, lo que implicaría posible interacciones entre el AC y AT. Para el caso donde está presente el ACG, esta misma señal, picos exotérmicos alrededor de los 190 °C, se atenua, lo que pudiera sugerir también, que su presencia debilita la estructura reticular, observese que éste picó desapareció en presencia del ACG para el caso de las cápsulas de AS (figura 6.8.D). Finalmente, para las muestras con AT, figuras 6.8.E y 6.8.F, la descripción es parecida a la que tiene sólo AC, con la diferencia de que a la derecha del segundo pico ($T > 190$ °C), hay dos picos que representan variantes pequeñas, tanto exotérmicas, como endotérmicas, que pueden relacionarse con los gránulos de almidón; en cuanto a una posible interacción de éste con el ACG, no se es muy claro si alguno de los picos que se encuentran a mayor temperatura, pudiera corresponder al ACG;

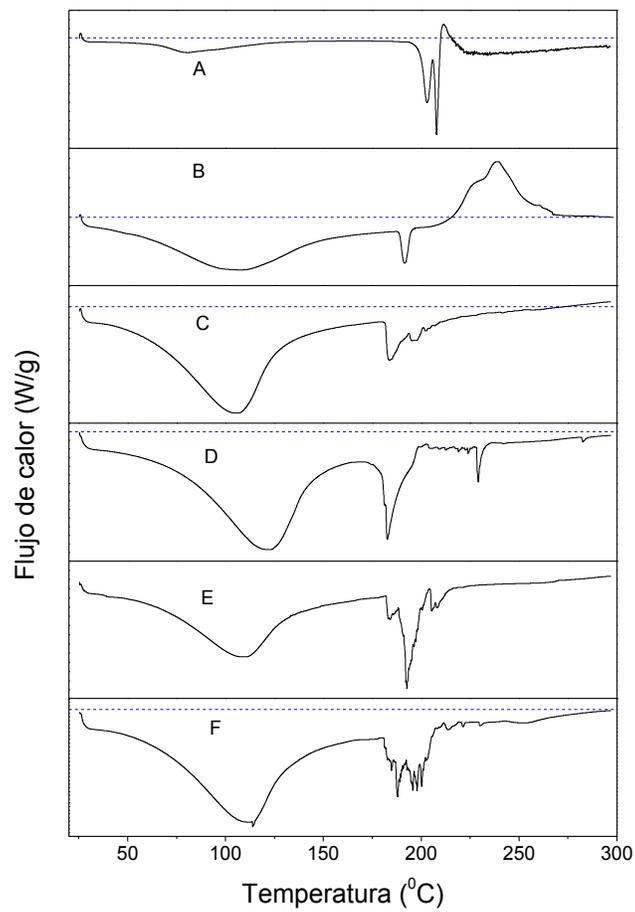


Figura 6.8. Termograma de Calorimetría Diferencial de Barrido del ACG (curva A), alginato de sodio (curva B), cápsula de alginato de calcio ($CH_{1/0}$) sin y con ACG (curvas C y D) y cápsulas de alginato de calcio con almidón de tapioca ($CH_{0.5/0.5}$) sin y con ACG (curvas E y F).

6.8. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier-Reflectancia Total Atenuada (EITF-RTA)

La Figura 6.9 muestra los espectros de infrarrojo (IR) del ACG (curva 6.9.A), AS (curva superior 6.9.B) y AT (curva inferior 6.9.B), cápsulas de alginato de calcio ($\text{CH}_{1.0/0.0}$) sin y con ACG (curvas 6.9.C y D) y cápsulas rellenas con almidón $\text{CH}_{0.5/0.5}$ sin y con ACG (curvas 6.9.E y F). El ACG mostró bandas propias de los compuestos fenólicos. La banda ancha centrada en 3380 cm^{-1} , se ha relacionado con los modos de estiramiento de los grupos -O-H. El hombro a 3218 cm^{-1} puede ser relacionado con los grupos hidroxilo involucrados en enlaces por puente de hidrógeno intermoleculares. Por otro lado, los picos a alrededor de 1520 cm^{-1} pueden relacionarse con las vibraciones C=C de los anillos aromáticos, mientras que las bandas que están alrededor de los 1270 cm^{-1} , pueden corresponder a estiramientos C-O. El espectro IR de las cápsulas de alginato de calcio conteniendo ACG (curva 6.9.D), también mostró un hombro de vibración a 1520 cm^{-1} , ausente en el espectro infrarrojo de las cápsulas sin ACG (curva C). López Córdoba *et al.* (2013) comentaron que cambios en los espectros en la región $1570 - 1540\text{ cm}^{-1}$, pueden estar relacionados a interacción entre los grupos polares de los compuestos fenólicos y los grupos carboxilato/hidroxilo de los biopolímeros. La adición de gránulos de almidón dentro de la matriz de alginato de sodio indujo cambios en la región localizada entre 1500 y 900 cm^{-1} (Curva 6.9.E). En efecto, la respuesta IR a longitudes de onda de 1156 , 1080 y 1019 cm^{-1} pueden ser relacionadas con vibraciones de C-O y C-C de las unidades de glucosa del almidón. Además, en concordancia con estudios recientes realizados por Hosseini *et al.* (2014), la adición de almidón resistente a la matriz de alginato produjo un decremento en la longitud de onda de respuesta del COO^- , de 1654 y 1464 a 1641 y 1453 cm^{-1} . El pico a alrededor de 3390 cm^{-1} fue más amplio para las cápsulas conteniendo gránulos de almidón, lo cual puede ser atribuido a la interacción almidón-alginato vía el estiramiento de grupos -OH (Kizil, Irudayaraj y Seetharaman, 2002). Finalmente, se puede apreciar que la adición de ACG, sólo produjo efectos ligeros en los patrones de IR de los biopolímeros, lo cual puede considerarse como evidencia que soporte la presencia de ACG dentro de las cápsulas rellenas con almidón.

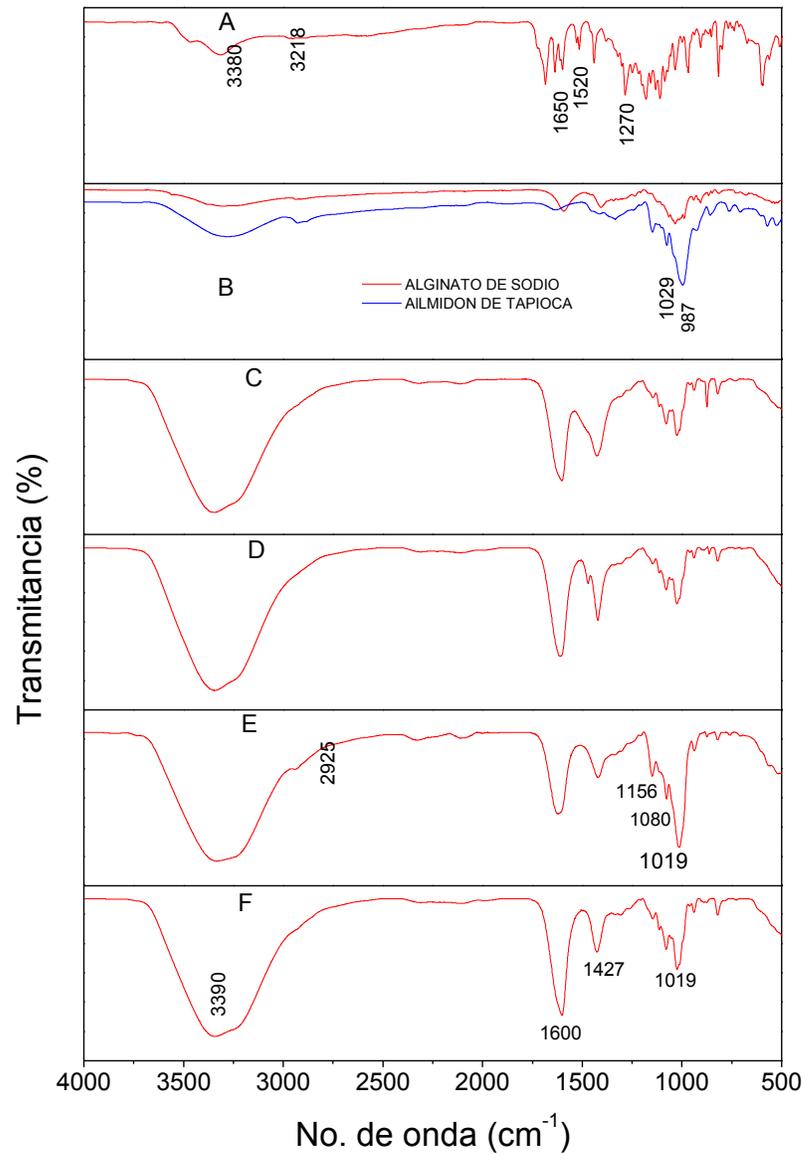


Figura. 6.9. Espectros de IR de ACG (curva A), alginato de sodio y almidón de tapioca (curvas B), cápsulas de alginato de calcio CH_{1.0/0.0} sin y con ACG (curvas C y D), y cápsulas de alginato de calcio con almidón de tapioca (CH_{0.5/0.5}) sin y con ACG (curvas E y F).

6.9. Cinética de liberación bajo condiciones gastrointestinales simuladas

La figura 10.a muestra la cinética de liberación bajo jugo gástrico simulado (pH 2.3). En los primeros 5-6 min, se observa una elevada tasa de liberación para todas las variaciones de $CH_{AC/AT}$. Esta liberación rápida no fue causada por efectos difusionales, sino probablemente por erosión y debilitamiento de la estructura de la matriz de las cápsulas, debido a hidrólisis ácida de los polisacáridos inducida por el HCl (Wang y Copeland, 2012). Después del proceso de liberación rápida, se observó un proceso lento de liberación, causado por efectos de transporte difusional. La Tabla 6.4 indica que el porcentaje de liberación más alto después de 2 h fue presentado por $CH_{0.75/0.25}$, lo cual puede estar reflejando una microestructura de cápsulas más lábil ante el ataque del ácido clorhídrico. Probablemente, la abundante cantidad de grietas alrededor de los gránulos de almidón en $CH_{0.75/0.25}$ (Figura 6.7.b) y $CH_{0.5/0.5}$ (Figura 6.7c), fue responsable del aumento en el porcentaje de liberación del ACG, así como de la absorción del agua y el consecuente hinchamiento de las cápsulas bajo condiciones gastrointestinales simuladas, en comparación con lo ocurrido en $CH_{1/0}$. En contraste, el menor % liberación fue exhibido por $CH_{0.25/0.75}$. Estos resultados anteriores sugieren que mientras las fisuras promueven pérdida de ACG de la matriz de la cápsula, altas concentraciones de AT promueven una mayor tortuosidad en la matriz, lo cual juega un importante papel en el retardo del transporte de ACG vía efectos físicos (obstrucción de transporte difusional) y electrostáticos (Rincon Bonilla y Bhatia, 2013). Esta discusión aplica también para explicar la estabilidad del ACG (subsección 6.6). Altas concentraciones de AT obstruyeron la difusión del oxígeno hacia al interior de las cápsulas, mientras que moderadas concentraciones de AT, permitieron una difusión relativamente rápida del O_2 al interior de las cápsulas a través de las fisuras. Una vez que las cápsulas estuvieron expuestas bajo las condiciones ácidas, éstas se depositaron ahora en la solución de sales biliares, que simulan las condiciones intestinales (pH 6.8). La Figura 6.10.b muestra el porcentaje de liberación adicional relativo a las condiciones gástricas previas. Las condiciones intestinales indujeron una dinámica de liberación similar a aquella de las condiciones gástricas. Sin embargo, la etapa inicial fue más pronunciada, que en la etapa anterior. Aparentemente, el cambio de condiciones ácidas a condiciones más neutras, produjo un agrietamiento más drástico en las cápsulas ya fisuradas. Este agrietamiento adicional pudo haber sido causado por un choque iónico afectando las interacciones entre calcio, alginato y almidón.

Se evaluaron los mecanismos de liberación del ACG, aplicando tres modelos empíricos (Costa y Sousa-Lobo, 2001) a los datos experimentales (Figura 10). Donde el modelo que muestra la tasa de liberación de primer orden, está dado por:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \exp(-k_1 t) \quad (1)$$

Donde M_t/M_∞ es la fracción de liberación a tiempo t y k_1 es la tasa de decaimiento. En cuanto a las leyes de potencia o modelo de Korsmeyer-Peppas (Korsmeyer, Gurny, Doelker, Buri y Peppas, 1983), éste está dado por:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^{n_{KP}} \quad (2)$$

Donde n_{KP} corresponde al exponente de difusión. El modelo de Korsmeyer-Peppas proporciona algunos conocimientos sobre los mecanismos involucrados en la liberación del ACG. De hecho, los valores de n_{KP} en el rango 0.5 – 1.0, indican una cinética de super-difusión anómala, una n_{KP} aproximado a 0.5, indica un tipo de mecanismo controlado por difusión Fickiana y finalmente, valores de n_{KP} por abajo de 0.5, reflejan cinéticas de sub-difusión anómalas. El modelo de difusión-relajación puede escribirse de la siguiente manera:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_d t^m - k_r t^{2m} \quad (3)$$

Donde el primer término representa la contribución del transporte de difusión y el segundo término representa la contribución de relajación caso-II, el cual toma en cuenta la combinación de dos mecanismos de liberación. Para estimar los parámetros de los modelos descritos anteriormente, se utilizó un procedimiento estándar de mínimos cuadrados. En la Tabla 4 se muestran los parámetros estimados para condiciones gástricas (pH 2.3) y condiciones intestinales (pH 6.8) simuladas. Para todos los casos se obtuvo que $n_{KP} < 0.5$, indicando que la cinética de liberación fue dominada por transporte de difusión no-Fickiano. De hecho, los valores de los exponentes de difusión con $n_{KP} < 0.5$ se relacionan con subdifusión en matrices complejas, tipo fractal, con moléculas moviéndose más lentamente que el movimiento browniano (Joshi, Patel, Kevadiya y Bajaj, 2009; Kevadiya, Joshi y Bajaj, 2010). En concordancia con López-Córdoba *et al.*, 2013, el mejor ajuste fue obtenido con el modelo de difusión-relajación (Ec. 3) tanto para condiciones ácidas, como intestinales. Esto no es sorprendente, ya que la ecuación (3) comprende ambos mecanismos que pueden proporcionar una mejor descripción de la cinética de liberación. El exponente m estuvo en el intervalo de 0.17-0.21, que

coincide con el reportado por López-Córdoba *et al.* (2013) para sistemas de encapsulación semejantes al nuestro. De acuerdo con Costa y Sousa-Lobo (2001) y Llabot, Manzo y Allemandi (2014), la ecuación 3 esta relacionada con la reducción de las fuerzas de atracción entre las cadenas plastificantes dentro de la matriz de encapsulación, lo cual promueve la movilidad y migración de los compuestos bioactivos, sin embargo en este caso, el flujo tortuoso del ACG, se disminuye a mayor AT.

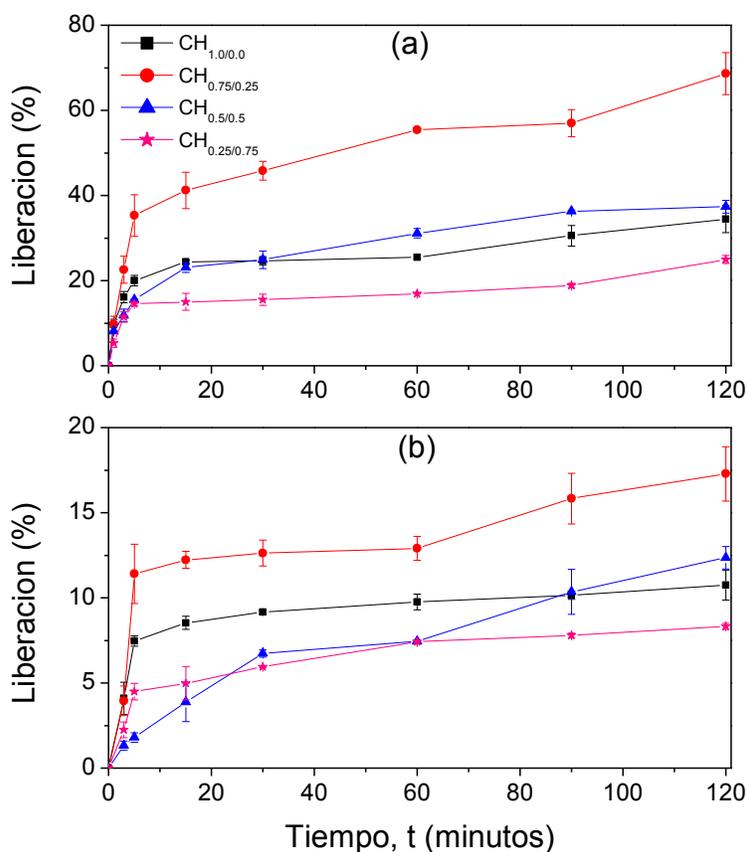


Figura. 6.10. Liberación de ACG a partir de cápsulas de alginato de calcio-almidón de tapioca modificado, bajo condiciones (a) gástricas (pH 2.3) y (b) sales biliares (pH 6.8).

Tabla 6.4. Tasa de descomposición de primer orden (k_1), exponente de ley de potencia (n_{KP}) y exponente de difusión- relajación (m) de la cinética de liberación del ACG bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

Código de cápsula	Gástricas k_1 (min^{-1})	Intestinales k_1 (min^{-1})	Gástricas n_{KP}	Intestinales n_{KP}	Gástricas m	Intestinales m
CH _{1/0}	0.26±0.02 ^a $R_{corr}^2 = 0.93$	0.22±0.01 ^a $R_{corr}^2 = 0.91$	0.22±0.02 ^a $R_{corr}^2 = 0.94$	0.17±0.02 ^a $R_{corr}^2 = 0.90$	0.18±0.03 ^a $R_{corr}^2 = 0.98$	0.15±0.03 ^a $R_{corr}^2 = 0.96$
CH _{0.75/0.25}	0.13±0.02 ^b $R_{corr}^2 = 0.93$	0.19±0.01 ^b $R_{corr}^2 = 0.90$	0.34±0.03 ^b $R_{corr}^2 = 0.95$	0.44±0.01 ^b $R_{corr}^2 = 0.91$	0.19±0.05 ^a $R_{corr}^2 = 0.96$	0.21±0.04 ^b $R_{corr}^2 = 0.96$
CH _{0.5/0.5}	0.09±0.01 ^c $R_{corr}^2 = 0.91$	0.12±0.02 ^c $R_{corr}^2 = 0.92$	0.32±0.02 ^b $R_{corr}^2 = 0.93$	0.41±0.02 ^b $R_{corr}^2 = 0.92$	0.18±0.02 ^a $R_{corr}^2 = 0.98$	0.21±0.02 ^b $R_{corr}^2 = 0.97$
CH _{0.25/0.75}	0.12±0.01 ^b $R_{corr}^2 = 0.93$	0.09±0.02 ^d $R_{corr}^2 = 0.93$	0.23±0.03 ^a $R_{corr}^2 = 0.94$	0.26±0.03 ^c $R_{corr}^2 = 0.93$	0.17±0.05 ^a $R_{corr}^2 = 0.97$	0.17±0.03 ^c $R_{corr}^2 = 0.96$

Los resultados fueron obtenidos a partir de tres corridas experimentales. Superíndice con letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas.

6.10. Viscoelasticidad de los hidrogeles de alginato de calcio-almidón de tapioca modificado

Una red 3D se formó por entrecruzamiento de las moléculas de alginato de calcio y los gránulos de AT, con características viscoelásticas. Los hidrogeles se sometieron a deformaciones oscilatorias relativamente grandes. La Figura 6.11.a muestra los valores del factor de pérdida, $\text{Tan } \delta$, como función de la deformación. Un régimen lineal se observó que para deformaciones menores de 3.0 % de deformación. En esta zona, el factor de pérdida de todas las variaciones de hidrogeles tuvo un valor de alrededor de 0.25 (lo que refleja un comportamiento predominantemente sólido).

A porcentajes de deformación mayores, el valor de $\text{Tan } \delta$ fue > 1 , indicando un comportamiento predominantemente viscoso. En esta región de deformaciones relativamente grandes, los hidrogeles presentaron diferencias en la magnitud de $\text{Tan } \delta$. Los valores más bajo y más altos fueron observados para CH_{0.75/0.25} y CH_{0.25/0.75}, respectivamente. De manera interesante, el primer hidrogel presentó el

mayor % de liberación de ACG, mientras que el último mostró el menor % de liberación. Este efecto se describe en la Figura 6.11.b, donde una relación inversa entre % de liberación de ACG, después de las condiciones gastrointestinales, y el factor de pérdida a 100 % de deformación puede ser observada. Valores altos del factor de pérdida, se relacionan con mejores propiedades de flujo. Por tanto, un mayor flujo, menor riesgo por defectos de las perlas (grietas y fisuras) durante el hinchamiento y bajo condiciones GI

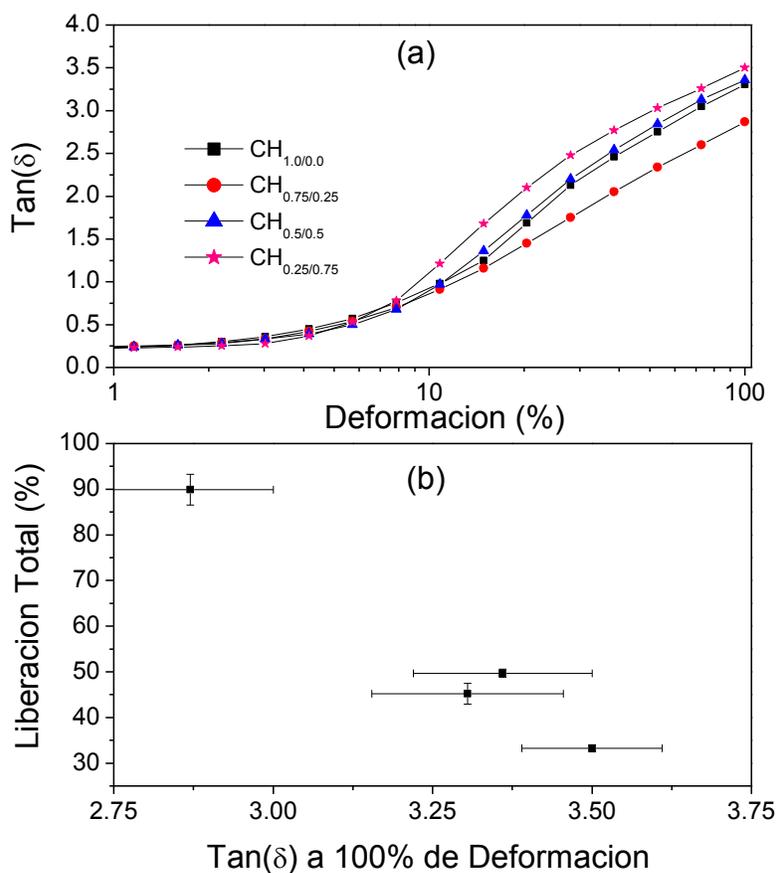


Figura. 6.11. (a) Factor de pérdida como función del % de deformación de las hidrogeles de alginato con almidón de tapioca y (b) relación inversa entre el % de liberación% y el factor de pérdida a deformación elevada.

6.11.- Elección de formulación de CH_{AC/AT} acorde a las características de liberación deseadas

Cabe mencionar que éste sistema de encapsulación no es del todo apto para ser utilizado bajo condiciones húmedas; ya que para su almacenamiento y conservación, podrían requerir condiciones especiales de humedad, temperatura y presión osmótica, esto representa un inconveniente para posibles aplicaciones donde el consumo fuera a largo plazo; pero sin descartar que pudiese ser factible en ciertos casos, en donde el consumo fuese inmediato. En contraste, al considerar la posibilidad de un escalamiento industrial, para facilitar su manipulación y almacenamiento, es conveniente que las CH_{AC/AT} estén deshidratadas, potencializando así su aplicación en productos nutraceuticos y/o farmacéuticos, que funcionen como sistemas de liberación controlada de sustancias activas. Se eligieron las capsulas cuya formulación fue 50/50, ya que éstas tuvieron mayor % EE, mayor % de inhibición y una liberación sostenida en condiciones neutras; comparadas con la formulación 75/25, que bajo condiciones ácidas, liberó mucho (72.61 %) y en contraste, la 25/75, que liberó bajas cantidades (~24.95 %). Es importante resaltar que para las cápsulas deshidratadas, aunque incrementó su dureza, con respecto a las capsulas húmedas, de 5.78 ± 0.46 a 10.9 N; su tamaño disminuyó de 1.94 ± 0.07 a 1.02 ± 0.33 mm, lo que hace más fácil su consumo. Para este caso, se propuso un alimento, en el que fuera posible incorporar las cápsulas secas justo antes de ser consumido.

6.12. Propuesta de desarrollo de un alimento funcional lácteo que incorpore las CH_{50/50}

Dado que los estudios que se realizaron fueron hechos con capsulas integras, se diseñó la forma para que los consumidores las ingirieran de la misma manera. A partir de ello, se hicieron pruebas preliminares con productos comerciales: (1) yogures aflanados: Lala (natural y fresa) y Yoplait (natural con granola), (2) yogures bebibles: Yoplait (natural), Danone (natural) y Activia (nuez, plátano con cereales) y (3) licuados de yogurt: Lala (nuez con cereales y el de fresa con cereales) y Nestle (nuez con cereales y el de fresa con cereales). Cabe mencionar que ninguno de estos productos, por sí solos, fue del todo aceptado. Lo que se observó en cada caso, es que al agregar las cápsulas en el yogurt natural aflanado, ocurrió que, debido a la gran consistencia del yogurt, las cápsulas se lograron incorporar muy bien, lo cual favoreció para que en una buena parte de cápsulas fuera ingeridas sin que éstas fueran percibidas, sin embargo, lo negativo fue que al comerse con cuchara, de manera inmediata se induce el reflejo de mordida y esto no fue muy positivo. De manera antagónica, para los yogures bebibles, la consistencia fue tan líquida que las cápsulas se precipitaban y gran cantidad se quedaba en el recipiente. El licuado de yogurt marca Lala, fue el que de alguna manera, evitaba ambos

inconvenientes; sin embargo, para favorecer nuestro objetivo, fue necesario aumentar la consistencia de éste producto, así que se añadió una fracción de yogurt natural y con ello se logró mantener las capsulas suspendidas al momento de ser ingeridas. El hecho de que en su formulación original contenían pequeñas partículas de cereales, favoreció para que las capsulas se mimetizaran en el sistema. En cuanto al sabor, es necesario mencionar que las capsulas por sí solas, tenían una nota salada dada por el CaCl_2 y quizá, casi imperceptible, una nota amarga dada por el ácido clorogénico. A partir de ello, se decidió utilizar los dos sabores presentes en el mercado, licuado de yogurt de fresa (LYF) y nuez (LYN), para observar si alguno de ellos sería capaz de enmascarar estas notas y si generaba algún efecto sobre la decisión del consumidor.

6.13.- Estabilidad de las $\text{CH}_{AC/AT}$ en refrigeración

Suponiendo que las $\text{CH}_{50/50}$ acompañan al producto lácteo a lo largo de su estancia en el anaquel, fue necesario caracterizar la estabilidad de éstas bajo las mismas condiciones, es decir, por 35 días a 4 °C, con cierre hermético y en ausencia de la luz. Los parámetros monitoreados fueron: cantidad de antioxidante, dureza, humedad e hinchabilidad. En la Tabla 6.5, se muestra que conforme pasa el tiempo, alrededor de los 15 días, la cantidad de ACG es relativamente estable y a los 35 días, se da una degradación de ACG de sólo un 12.9 %. También se observa que el resto de parámetros monitoreado en las cápsulas secas, sufrió ligeros cambios entre los 15 y 21 días; ya que la dureza disminuyó en un 25 % y la humedad aumentó un 33%. (0.5 unidades); asimismo, se incrementó la capacidad de hinchazón en contacto con el agua (26.89 %). Lo anterior, nos permite suponer que la estructura de las cápsulas pudiera estar sufriendo modificaciones, quizá su estructura reticular se relajó con el paso del tiempo. De acuerdo a lo anterior, se concluye que la estabilidad de las cápsulas fue adecuada para un cumplir con el consumo habitual de un producto lácteo, que es alrededor de un mes.

Tabla 6.5. Estabilidad de las cápsulas durante su almacenamiento bajo refrigeración.

Tiempo (días)	mg ACG /g cápsulas	Dureza N	Humedad %	Hinchazón %
0	0.62±0.03 ^a	10.9 ±0.5 ^a	1.5±0.2 ^a	151.1±2.3 ^a
7	0.60±0.02 ^a	10.5±1.0 ^{ab}	1.9±0.1 ^b	151.46±4.2 ^a
15	0.58±0.01 ^a	9.85±0.4 ^b	2±0.3 ^{ab}	153.54±1.4 ^a
21	0.56±0.03 ^{ab}	9.54±0.2 ^b	1.9±0.4 ^{ab}	157.28±3.7 ^a
28	0.55±0.02 ^{ab}	8.81±0.4 ^c	2±0.1 ^b	163.17±1.3 ^b
35	0.53±0.01 ^{ab}	8.13±0.6 ^c	2±0.1 ^b	164.89±2.1 ^b

Los resultados fueron obtenidos a partir de tres corridas experimentales. Superíndice con letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas.

6.14.-Prueba de aceptación en consumidores

Al aplicar la prueba de nivel de aceptación a 79 consumidores, se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 6.6, en la que se muestran los promedios de las muestras LYF y LYN. Para comparación la aceptación de las muestras evaluadas, se realizó la prueba t-student de datos apareados (Taksima, Limpawattana y Klapradit, 2015). Se observó que tanto para los atributos sensoriales, como el agrado general y la intención de compra, en todos estos casos, las respuestas fueron calificadas positivamente por los consumidores (Tablas 6.7, 6.8 y 6.9). El análisis de datos indicó, que no existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre muestras, en los atributos de sabor y textura, así como en el agrado general; mientras que por otro lado, los consumidores percibieron diferencias en la apariencia y en la intención de compra (Tabla 6.6). Para corroborar las diferencias, debido a que los datos pudieran no cumplir del todo los supuestos de normalidad, se aplicó la prueba de Wilcoxon, en la que se contrastaron las medianas de sus distribuciones; se observó un mejor ajuste en los datos y básicamente coincidió con los resultados antes mencionados con ($P \leq 0.05$).

Tabla 6.6. Valores medios de atributos, agrado general e intención de compra de los licuados de yogurt.

Muestras	Atributos sensoriales			Agrado general	Intención de compra
	Apariencia	Sabor	Textura		
LYF	5.20±1.08 ^a	5.52±1.20 ^a	4.80±1.35 ^a	4.41±0.9 ^a	3.10±0.61 ^a
LYN	4.90±1.29 ^b	5.59±1.36 ^a	4.90±1.38 ^a	4.61±0.81 ^a	3.30±0.76 ^b

LYF: licuado de yogurt fresa y LYN: licuado de yogurt nuez.

Letras diferentes de los superíndices, indican diferencias estadísticas significativas

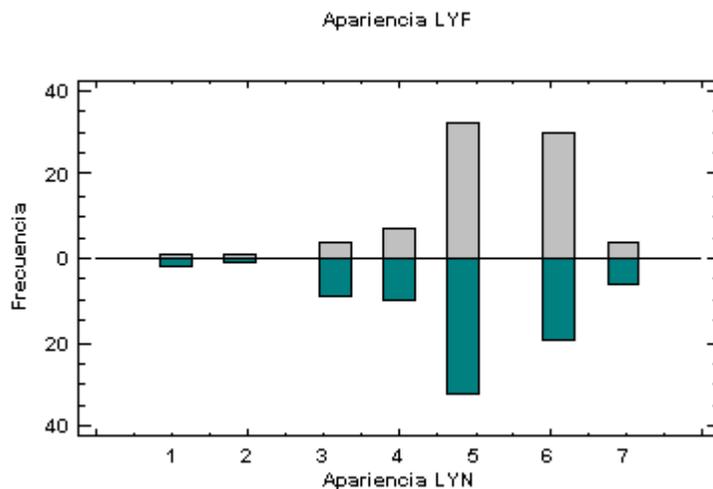
Posteriormente, con base a las respuestas emitidas por los consumidores, se hizo un análisis de frecuencias obteniéndose los histogramas correspondientes de nivel de agrado, agrado general e intención de compra, Figuras 6.12, 6.13 y 6.14, respectivamente, así como las frecuencias acumuladas (Tablas 6.7, 6.8 y 6.9 en ese mismo orden).

Para el primer caso, en el atributo de “apariciencia”, la respuesta más frecuente tanto para LYF y LYN, fue “me gusta moderadamente” con 40.51%, mientras que en “textura” fue de 30.38% para fresa y 36.71% para nuez; no obstante, ambos yogures también fueron calificados con “me gusta mucho”, con valores de 37.97% y 24.05%, respectivamente. Para el atributo del “sabor”, predominó la valoración de “me gusta mucho”, con 45.57 % en fresa y 44.30 % en nuez. (Tabla 6.7 y Figura 6.12 a y 6.12 b)

Tabla 6.7. Evaluación de atributos sensoriales. Valores parciales y valores acumulados.

	Escala	LYF (%)			LYN (%)		
		APARIENCIA	SABOR	TEXTURA	APARIENCIA	SABOR	TEXTURA
Evaluación Negativa	me disgusta extremadamente	1.27	1.27	1.27	2.53	1.27	1.27
	me disgusta mucho	1.27	2.53	2.53	1.27	5.06	6.33
	me disgusta moderadamente	5.06	3.80	16.46	11.39	3.80	11.39
	Suma de fracciones	7.59	7.59	20.25	15.19	10.13	18.99
Evaluación Neutra	Ni me gusta, ni me disgusta	8.86	3.80	16.46	12.66	2.53	7.59
Evaluación Positiva	me gusta moderadamente	40.51	27.85	30.38	40.51	20.25	36.71
	me gusta mucho	37.97	45.57	24.05	24.05	44.30	29.11
	me gusta extremadamente	5.06	15.19	8.86	7.59	22.78	7.59
	Suma de fracciones	83.54	88.61	63.29	72.15	87.34	73.42

a



b

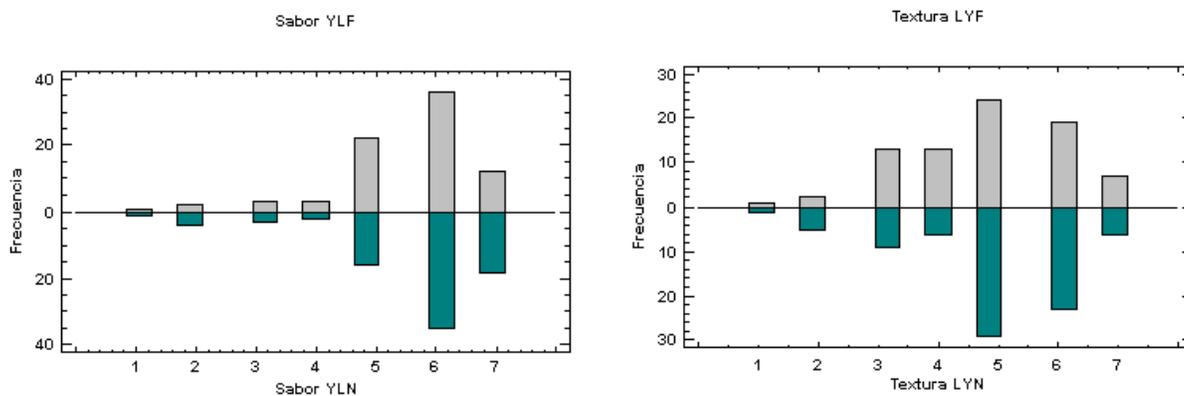


Figura 6.12.-Prueba de nivel de agrado. Para todos los casos, por arriba del eje horizontal: Licuado de yogurt de fresa (LYF) y por abajo del éste, licuado de yogurt de nuez (LYN). Atributos: (a) Apariencia, (b) en la boca: sabor y textura. Se usó escala de 7 puntos; donde (1) corresponde a “me disgusta extremadamente”, pasando por (4) “Ni me gusta, ni me disgusta” y hasta (7) “Me gusta extremadamente”.

En cuanto el agrado general (Tabla 6.8, Figura 6.13), las mayor frecuencia para LYF fue de “me gusta moderadamente”, con un 53.16%, seguido de un 26.58 % para “me gusta mucho”; mientras que para LYN, el 45.57 % eligió “me gustó mucho”, seguida de un 32.91% de “me gusta moderadamente”.

Tabla 6.8. Agrado general. Valores parciales y valores acumulados.

		LYF (%)	LYN (%)
Escala		Agrado general	
Evaluación negativa	me disgusta extremadamente	0.00	0.00
	me disgusta mucho	3.80	1.27
	me disgusta moderadamente	3.80	7.59
Suma de fracciones		7.59	8.86
Evaluación positiva	me gusta moderadamente	53.16	32.91
	me gusta mucho	26.58	45.57
	me gusta extremadamente	12.66	12.66
Suma de fracciones		92.41	91.14

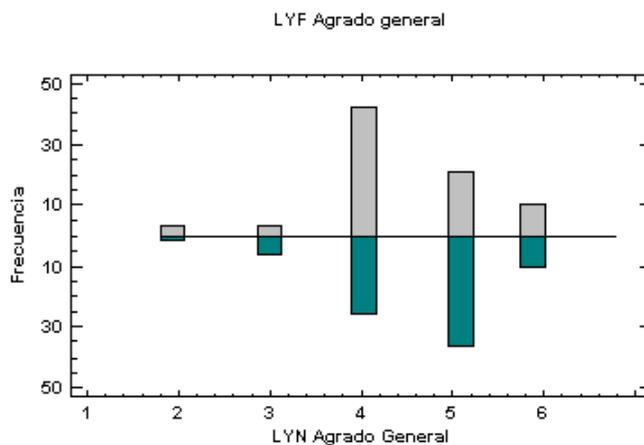


Figura 6.13.- Agrado general. Arriba del eje horizontal: Licuado de yogurt de fresa (LYF) y por abajo del éste, licuado de yogurt de nuez (LYN). Se usó escala de 6 puntos; que va desde (1), que corresponde a “me disgusta extremadamente”, hasta (6) que corresponde a “Me gusta extremadamente.”

Respecto a la intención de compra, se observó que la opción “Posiblemente si lo compraría”, mostró para LYF un 62.03 % y un 24.05 % con un “Definitivamente sí lo compraría”. Mientras que para LYN se observa que ambas opciones son positivas y equiparables con 45.57 % y 44.30 % respectivamente (Tabla 6.9). Lo anterior, sugiere que el grupo de consumidores encuestados mostraron apertura a la innovación presentada, siempre y cuando no esté por debajo de sus estándares habituales, es decir, aunque no recibió las calificaciones positivas en todos los casos, aún así una alta proporción de ellos estarían dispuestos a comprarlo.

Tabla 6.9. Intención de compra. Valores parciales y valores acumulados.

Evaluación	Escala	LYF	LYN
		Intención de compra	Intención de compra
Evaluación Negativa	Nunca lo compraría	0.00	3.80
	Suma de fracciones	0.00	3.80
Evaluación Positiva	Esporádicamente lo compraría	13.92	6.33
	Posiblemente lo compraría	62.03	45.57
	Definitivamente si lo compraría	24.05	44.30
	Suma de fracciones	100.00	96.20

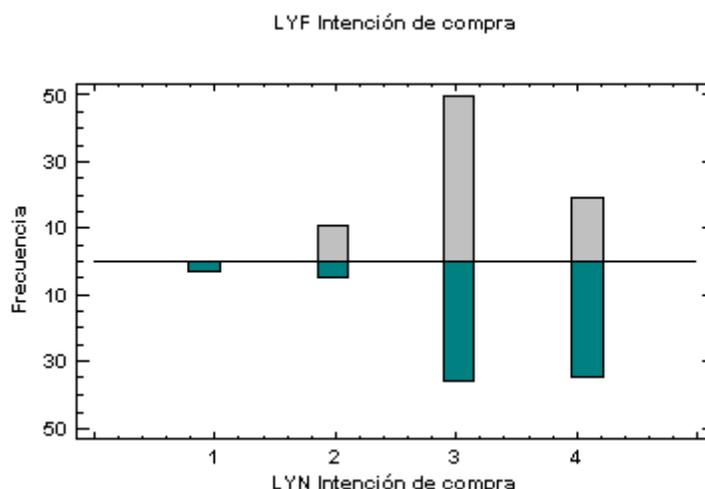


Figura 6.14.- Intención de compra. Arriba del eje horizontal: Licuado de yogurt de fresa (LYF) y por abajo del éste, licuado de yogurt de nuez (LYN). Se usó escala de 4 puntos; donde (1) corresponde a “nunca lo compraría”, (2) “esporádicamente lo compraría”, (3). “posiblemente sí lo compraría” y (4). Definitivamente sí lo compraría”.

En términos generales, el producto funcional propuesto obtuvo evaluaciones positivas al acumular las frecuencias por categorías de agrado y desgrado en la aceptación global (Tabla 6.8), siendo 92.41% para LYF y 91.14 % para LYN, ponderado por un 53.16% la opción “me gusta moderadamente” y 26.58% de “me gusta mucho” para LYF; mientras que para LYN con un 45.57 % de “me gusta mucho” y 32.91 % de “me gusta moderadamente. Esto a pesar de que la variable textura se vió negativamente afectada con una frecuencia acumulada de un 20 % para LYF y un 19 % para LYN (Tabla 6.7) en respuestas de desagrado, la intención de compra fué positiva para ambos yogures, considerando sus frecuencias acumuladas que fueron $x > 94$ % (Tabla 6.9).

Adicionalmente se les preguntó si les pareció adecuada la forma en la que se les presentaron las muestras, es decir, licuado de yogurt y las cápsulas por separadas, para posteriormente mezclarlas y beberlas; ante esto, la respuesta mayoritaria fue un “sí”, con un 99%. Esta información es relevante, ya que permite definir una posible presentación en el mercado, la cual se sugiere que sea en una presentación de 240 g de licuado de yogur con cereales, con estuche independiente conteniendo 3.05 g de perlas, que represen un 1.3 % de fibra adicional y que contienen 6.35 mg de ACG.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES

Se determinó la relación en peso alginato de sodio-cloruro de calcio ($R_{AS:CaCl_2}$), la cual fue de 1 g/ 6.4 g, con ello, se logró las condiciones adecuadas para la obtención de las cápsulas de hidrogel AS-almidón de tapioca modificado (AT), con características texturales relativamente resistentes a esfuerzos mecánicos. A partir de ello, se evaluaron los efectos de la $R_{AS/AT}$ sobre las propiedades fisicoquímicas (esfericidad, textura, microestructura, eficiencia de encapsulamiento, actividad antioxidante, estabilidad y viscoelasticidad) de las $CH_{AC/AT}$ que encapsularon ACG. Se observó que en la elaboración de cápsulas de alginato de calcio, al incorporar diferentes fracciones de almidón de tapioca, con forme se incrementó la cantidad de este biopolímero de relleno, aumentó la eficiencia de encapsulamiento del ácido clorogénico, se logró gran esfericidad (0.05 – 0.06) y un tamaño alrededor de 1.94 ± 0.07 mm estando húmedas y de 1.02 ± 0.33 mm al estar secas. Las imágenes de Microscopia Electrónica de Barrido, mostraron los diferentes efectos que tienen los gránulos de almidón, tanto en la superficie, como en el interior de la matriz de alginato de calcio, pasando de una superficie tersa y corrugada a un aspecto “cacarizo” y lleno de cráteres. En el interior, se observó que la matriz, aunque es homogénea, no es del todo compacta, ya que se mostró una serie de fisuras, posiblemente interconectadas a manera de cavernas, las cuales disminuían con forme se incrementó la fracción de almidón, pero con un mayor número de grietas alrededor de los gránulos de almidón. Lo anterior, se relacionó, tanto con la eficiencia de encapsulamiento, con la estabilidad del ácido clorogénico (ACG) y su actividad antioxidante, la interacción de este compuesto activo con la matriz que lo encapsulo y sus propiedades mecánicas. Esto a su vez mostró que las distintas relaciones en peso de las distintas formulaciones de alginato de calcio-almidón de tapioca modulaban la liberación del ACG bajo condiciones gastrointestinales simuladas, lográndose una caracterización de su cinética, todo ello en función de sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. Finalmente, con el objeto de evaluar el potencial de la incorporación de las cápsulas de hidrogel de alginato de calcio (AS) / almidón de tapioca (AT), ($CH_{AC/AT}$), a un licuado de yogurt con cereales (como un derivado lácteo modelo) para obtener un alimento nutracéutico, se eligió a las capsulas cuya formulación fue 50/50, ya que ésta tuvo mayor % EE (~98.76 %), mayor % de inhibición (~77.61%) y una liberación sostenida de ACG bajo condiciones gastrointestinales, liberando alrededor de ~49.72 %, que al ser comparada con la formulación 75/25 bajo las mismas condiciones, liberó drásticamente una gran cantidad (~89.89 %), en contraste con las cápsulas con una relación 25/75, que liberaron ACG sólo ~ 33.27 % de manera muy lenta, todas ellas, al término de 4 horas. En términos generales, al realizar la evaluación sensorial del producto lácteo al que se les incorporó las cápsulas, justo antes de su consumo, en el cual se obtuvo

una aceptación global, con valoraciones positivas en apariencia, sabor y textura en boca, de 91 - 92 %, de los cuales, un 53.16 % correspondió a la opción “me gusta moderadamente” para el licuado de yogurt de fresa (LYF) y con una mejor valoración para licuado de yogurt de nuez (LYN) que fue de 45.57 % de “me gusta mucho”. A pesar de que la variable textura afectó negativamente (19-20) % en ambos casos, la intención de compra, fue positiva para ambos yogures, ($x > 94$ %)

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

- Anal, A. K., y Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240-251.
- Avendaño-Romero, G., López-Malo, A., y Paola, E. 2013. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7 (1), 87-96.
- Ayarza, L. 2014. Los alginatos: 20000 usos de las algas submarinas. *Revista de química PUCP*, 28 (1) 19 – 23.
- Barba, A. A., d'Amore, M., Chirico, S., Lamberti, G. y Titomanlio, G. 2009. A general code to predict the drug release kinetics from different shaped matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36 (2-3), 359-368.
- Badui-Dergal, S. 2006. *Química de los alimentos*, 4a. edición. Pearson education. México, Pp. 286.
- Bierhalz, A. C. K., da Silva, M. A., y Kieckbusch, T. G. 2012. Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 110 (1), 18-25.
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., y Cesàro, A. 2010. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122 (2), 416-423.
- Bourne, M. C. 2002. *Textura y viscosidad en en alimentos: Conceptos y medidas*. (2ª. Edición). Nueva York. Academic Press.
- Chan, E.S., Wong, S. L., Lee, P. P., Lee, J. S., Ti, T. B., Zhang, Z., Poncelet, D., Ravindra, P., Phan, S-H. y Yi m, Z-H. 2011. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83, 225-232.
- Chao, J., Wang, H., Zhao, W., Zhang, M. y Zhang, L. 2012. Investigation of the inclusion behavior of chlorogenic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 277-282.
- Chen, L.Y y Subirade M. 2006. Alginate – whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*, 27, 4646–54.
- Chung, H.J., Shin, D.H. y Lim, S.T. 2008. In vitro starch digestibility and estimated glycemic index of chemically modified corn starches. *Food Research International*, 41, 579-585.
- Clifford, M. N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates–nature, occurrence and dietary burden¹. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 362-372.
- Costa, P. y Sousa-Lobo, J. M. 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13 (2), 123-133.
- Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L. y Augustin, M. 2006. Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (3), 2280–2282.

- Dina, L. y Herrera, C. 2005. Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de cidos clorogénicos en café, *Agronomía Costarricense*, 29 (2): 99-107.
- Donati, I., Holtan, S., Mørch, Y. A., Borgogna, M., Dentini, M. y Skjåk-Braek, G. 2005. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium–alginate gels. *Biomacromolecules*, 6, 1031-1040.
- Eng-Seng., C, Sze-Ling W., Peh-Phong L., Jau-Shya L., Tey Beng T. Zhibing Z., Denis P., Pogaku R., Soon-Hock P., Zhi-Hui Y. 2010. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83. P.p. 225–232.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Nishinari, K., Funami, T. y Williams, P. A. 2008. Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*. 72, 334-341.
- Fennema, O. R. 2008, *Química de los alimentos*. 2ª ed., Editorial Acribia, España. p.1236-1253
- Eerlinger, R.C., M. Delcur. 1995. Formacion, analisis, estructura and properties of type III enzyme resistant starch. *Kournal Cereal Science*, 129-138.
- Gandía-Herrero F, Jiménez-Atiénzar M, Cabanes J, García-Carmona F y Escribano J. 2010. Stabilization of the bioactive pigment of opuntia fruits through maltodextrin encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 13; 58 (19):10646-52.
- Gonzalez-Romero R., R. y Verpoorate R. 2009. Salting-out gradients in centrifugal partition chromatography for the isolation of chlorogenic acids from green coffee beans. *Journal of chromatography*, 1216: 4245- 4251.
- Gutiérrez Maydata A. Café, antioxidantes y protección a la salud. [artículo en línea]. *MEDISAN* 2002;6(4). (consulta: 13 de julio de 2015).
- Haralampu, S.G. 2000. Resistant starch - a review of the phisical prperties and biological impact of RS3. *Carbohydrate Polymers*, 41 (3):255-292.
- Heidebach, T., Först, P. y Kulozik, U. 2009. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23, 1670–1677.
- Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T., y Münzel, T. 2001. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 104 (22), 2673-2678.
- Hylla, S., Gstner, A., Dusel, G. 1998. Effects of resistant satarch n the colon in healthy volunteers: posible implicacion for cancer prevention. *America Journal of Clinical Nutrition*. 67: 136-142.
- Hoffman, A.S. 2012. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 18–23.
- Hosseini, S. M., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., German, J. B., Mortazavian, A. M., Mohammadi, A., Khosravi-Darani, K., Shojaee-Aliabadi, S. y Khaksar, R. 2014. Preparation and

- characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. *Carbohydrate Polymers*, 103, 573-580.
- Ji, L., Jiang, P., Lu, B., Sheng, Y., Wang, X., y Wang, Z. 2013. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24 (11), 1911-1919.
- Joshi, G.V., Patel, H.A., Kevadiya, B.D. y Bajaj, H.C. 2009 Montmorillonite intercalated with vitamin B1 as drug carrier. *Applied Clay Science*, 45, 248-253.
- Kevadiya, B.D., Joshi, G.V. y Bajaj, H.C. 2010. Layered bionanocomposites as carrier for procainamide. *International Journal of Pharmaceutics*, 388, 280-286.
- Kizil, R., Irudayaraj, J. y Seetharaman, K. 2002. Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3912-3918.
- Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15 (1), 25-35.
- Kumari A, Yadav SK, Pakade YB, Kumar V, Singh B, Chaudhary A y Yadav SC. 2010 Nanoencapsulation and characterization of Albiziachinensis isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011.1; 82 (1):224-32.
- Laranjinha, J., Vieira, O., Almeida, L., y Modeira, V. 1996. Inhibition of metmyoglobin/H₂O₂-dependent low density lipoprotein lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acids. *Biochemical pharmacology*, 51 (4), 395-402.
- Llabot, J. M., Manzo, R. H. y Allemandi, D. A. 2004. Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 276 (1), 59-66.
- Lykkesfeldt, J., y Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 173 (3), 502-511.
- López-Córdoba, A., Deladino, L. y Martino, M. 2013. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohydrate Polymers*, 95, 315-323.
- López-Córdoba, A., Deladino, L. y Martino, M. 2014. Release of yerba mate antioxidants from corn starch–alginate capsules as affected by structure. *Carbohydrate Polymers*, 99, 150-157.
- Martin, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A. y Morales, M. E. 2013. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT-Food Science and Technology*, 53, 480-486.
- Mi, F.-L., Sung, H.-W. y Shyu, S.-S. 2002. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers*, 48, 61-72.

- Mimmo, T., Marzadori, C., Montecchio, D. y Gessa, C. 2005. Characterisation of Ca and Alepectate gels by thermal analysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 340, 2510-2519.
- Mitra, P.D.S. 2010. A preliminary study on the in vitro antioxidant activity of the stems of *O. vulgaris*. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology Research*, 1 (2), 268-272.
- Muthukumarasamy, P., Allan, P. W. y Holley, A. R. 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*, 71, 20-24.
- Olav Smidsrød y Gudmund Skjåk-Braek. 1991. Alginate as immobilization matriz for cells. *Trends in Biotechnology - Journal..* 8, 71 – 77.
- Pal, D., Banerjee, S. y Ghosh, A. K. 2012. Dietary-induced cancer prevention: An expanding research arena of emerging diet related to healthcare system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 3 (1), 16.
- Pimentel-González, D.J., Campos-Montiel, R.G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R. y Vernon-Carter, E.J. 2009. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 42, 292-297.
- Pothakamury, U. R., y Barbosa-Canovas, G. V. 1995. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 6 (12), 397e406.
- Qiu., Y y Park, P. 2012. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64. Pp 49–60.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J. y Veiga, F. 2006. Design of insulin-loaded alginate nanoparticles: influence of the calcium ion on polymer gel matrix properties. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 12 (1), 47-52.
- Rincon Bonilla, M. y Bhatia, S. K. 2013. Diffusion in Pore Networks: Effective Self-Diffusivity and the Concept of Tortuosity. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117 (7), 3343-3357.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. y Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, González-Laredo RF, Harte F, Medina-Torres L, Ochoa-Martínez LA y Soto-García M. 2010. Effect of high-pressure homogenization on the physical and antioxidant properties of *Quercus resinosa* infusions encapsulated by spray-drying. *Journal of Food Science*, 75 (5): N57-61.
- Rodrigues., Lobo, A. Lemus Silva G. 2003. Almidón resistente sus propiedades físico - químicas. *Brazilian Journal of Nutrition*. 16 (2) 113-123.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J. y Vernon-Carter, E.J. 2010. Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43, 111-117.

- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M. y Iseki, K. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403, 136-138.
- Shibata, H., Sakamoto, Y., Oka, M., y Kono, Y. 1999. Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63 (7), 1295-1 297.
- Shin, H. S., Satsu, H., Bae, M. J., Zhao, Z., Ogiwara, H., Totsuka, M. y Shimizu, M. 2015. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chemistry*, 168, 167-175.
- Shiraishi, S., Imai, T. y Otagiri M. 1993. Controlled-release preparation of indomethacin using calcium alginate gel. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 6 (11):1164-1168.
- Smidsrod, O., y Skjak-Braek, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71-78.
- Smidsrød, O. y Skjåk-Braek, G. 1991. *Trends in Biotechnology*, 8, 71-78.
- Sujka, M. y Jamroz, J. 2007. Starch granule porosity and its changes by means of amylolysis. *International Agrophysics*, 21 (1), 107.
- Tako, M., Tamaki, Y., Teruya, T. y Takeda, Y. 2014. The Principles of Starch Gelatinization and Retrogradation. *Food and Nutrition Sciences*, 5 (3), 280-291.
- Taksima, T., Limpawattana, M., y Klapradit, W. 2015. Astaxantina encapsulated in beads using atomizer an application in yogurt as evaluated by consumer sensory profile. *LWT – Food Science and Technology*. 62, 431-437.
- Viveros-Valdez, E. 2009. Aislamiento dirigido a la identificación de compuestos antirradicales y/o quimiopreventivos de hedeoma drummondii y spirulina maximai. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Wang, S. y Copeland, L. 2012. New insights into loss of swelling power and pasting profiles of acid hydrolyzed starch granules. *Starch-Stärke*, 64 (7), 538-544.
- Williams, P. D., Sadar, L. N., y Lo, M. Y. 2009. Texture stability of hydrogel complex containing curdlan gum over multiple freeze–thaw cycles. *Journal of food processing and preservation*, 33 (1), 126-139.
- Wu, Z., He, Y., Chen, L., Han, Y. y Li, C. 2014. Characterization of *Raoultella planticola* Rs-2 microcapsule prepared with a blend of alginate and starch and its release behavior. *Carbohydrate Polymers*, 110, 259-267.
- Zheng L, Susan S. Percival, Suzanna Bonard and LiweiGu. 2010. Fabrication of nanoparticles using partially purified pomegranate ellagitannins and gelatin and their apoptotic effects. *MNF-Journal*. 16, 234-255.

Zohar-Perez, C., Chet, I. y Nussinovitch, A. 2004. Irregular textural features of dried alginate–filler beads. *Food Hydrocolloids*, 18, 249-258.

CAPÍTULO 9

ANEXOS

Anexo 1. Evaluación sensorial.

RUEBA DE ACEPTABILIDAD: LICUADO DE YOGUR ADICIONADO CON ANTIOXIDANTES ENCAPSULADOS

Página 1: “Bienvenidos a esta sesión de evaluación sensorial”

Página 2: Contexto

Antes de iniciar su prueba es importante que lea la siguiente información.

Una dieta rica en ANTIOXIDANTES de origen vegetal (polifenoles) puede mejorar la salud y reducir la incidencia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, tales como: enfermedades en arterias, enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas.

Las pequeñas cápsulas que adicionarás al licuado de yogurt, están elaboradas con componentes que sirven como fibra dietética y contienen una pequeña cantidad de este tipo de antioxidantes, los cuáles le liberarán poco a poco en tu estómago e intestino

ESTE PRODUCTO NO ES UN MEDICAMENTO

Página 3:

“Frente a usted tiene dos muestras diferentes, para evaluarlas, hágalo de una en una, comenzando por el código que te da el programa y pruébela de la siguiente forma:”

1.- Abra CUIDADOSAMENTE ambos envases, tanto el que contiene licuado de yogurt, como el que contiene las pequeñas cápsulas con antioxidantes.

2.- Vierta las cápsulas en el yogurt, cierre bien éste envase, agite vigorosamente hasta incorporar las pequeñas cápsulas en el licuado de yogurt.

3.- Califique el atributo de “apariciencia visual”, dando click en la escala según su percepción.

|Apariciencia: (Ver escala adelante)

Página 4;

Abra la tapa e ingiera el contenido de un solo trago.

Califique los atributos “Sabor” y “Textura en boca”, dando un click en el cuadro de la escala que representa tu opinión

Sabor (Ver escala adelante)

Textura (Ver escala adelante)

Página 5:

Califique el nivel de agrado general de la muestra;

Agrado general (Ver escala adelante)

¿Estarías dispuesto a comprar este producto?

Intención de compra (Ver escala adelante)

Página 6:

Antes de continuar con la siguiente muestra, tome agua y enjuague su boca;

(Conteo cronómetro 20 segundos)

Repetición de preguntas (páginas 3,4 y 5)para la siguiente muestra

Página 10:

¿Te parece adecuada la manera en la que se presentaron las muestras? Si /NO

Página 11: Ha concluido la prueba. Gracias por tu apoyo.

**PRUEBA DE ACEPTABILIDAD: LICUADO DE YOGUR ADICIONADO CON ANTIOXIDANTES
ENCAPSULADOS**

Para cada producto, califique con una "X" según su percepción.		ATRIBUTOS					
		Apariencia visual		Sabor		Textura en boca	
Código de muestra		_____	_____	_____	_____	_____	_____
Escala	7.Me gusta extremadamente						
	6.Me gusta mucho						
	5.Me gusta moderadamente						
	4.Ni me gusta, ni me disgusta						
	3.Me disgusta moderadamente						
	2.Me disgusta mucho						
	1.Me disgusta extremadamente						

A continuación indique el **NIVEL DE AGRADO GENERAL** de cada muestra. Marque con una X la categoría de la escala, que mejor represente su juicio.

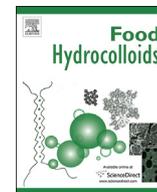
		AGRADO GENERAL	
Código de muestra		_____	_____
Escala	6.Me gusta extremadamente		
	5.Me gusta mucho		
	4.Me gusta moderadamente		
	3.Me disgusta moderadamente		
	2.Me disgusta mucho		
	1.Me disgusta extremadamente		

Finalmente.
 ¿Estaría dispuesto a comprar este producto?

		INTENCIÓN DE COMPRA	
Código de muestra		_____	_____
Escala	4.Definitivamente sí lo compraría		
	3.Posiblemente sí lo compraría		
	2.Esporádicamente lo compraría		
	1.Nunca lo compraría		

ANEXO 2

Artículo publicado



Effect of the weight ratio of alginate-modified tapioca starch on the physicochemical properties and release kinetics of chlorogenic acid containing beads

G. Lozano-Vazquez^a, C. Lobato-Calleros^b, H. Escalona-Buendia^a, G. Chavez^c,
J. Alvarez-Ramirez^{c,*}, E.J. Vernon-Carter^c

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa, D.F. 09340, Mexico

^b Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco 56230, Mexico

^c Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa, D.F. 09340, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2014

Received in revised form

27 November 2014

Accepted 23 February 2015

Available online 13 March 2015

Keywords:

Tapioca starch-filled hydrogel beads

Crosslinked alginate

Chlorogenic acid

Controlled release

Viscoelasticity

ABSTRACT

Sodium alginate (SA)-modified tapioca starch (TS) solutions ($R_{SA/TS}$) in different weight ratios (1/0, 0.75/0.25, 0.5/0.5 and 0.25/0.75), added with chlorogenic acid (CGA), were dripped into $CaCl_2$ solution for obtaining calcium alginate (CA) hydrogel beads filled with TS containing chlorogenic acid ($HB_{CA/TS}$). The beads size, morphology, encapsulation efficiency, textural and viscoelastic properties, CGA release in simulated gastrointestinal conditions, and the molecular interactions between beads components using DSC and FTIR were evaluated. The sphericity of the $HB_{CA/TS}$ filled with TS was lower than that made with only calcium alginate, but the diameter was larger. CGA release from the beads was due to a complex interplay between matrix porosity and tortuosity. Highest release % of CGA occurred for $HB_{0.75/0.25}$ which showed the lowest $Tan \delta$ -strain %, hardness and cohesiveness values. The diffusion-relaxation model involving two mechanisms described better the CGA release experimental data.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The roles of antioxidants on human health have been widely recognized by numerous researches, and there has been an increasing interest by the food industry and a growing trend in consumer preferences for natural antioxidants over synthetic compounds for food applications (Fu et al., 2011; Xi & Shouqin, 2007). However, natural antioxidants are easily oxidized and sensitive to heat and light, which limit their application in the food industry (Chao, Wang, Zhao, Zhang, & Zhang, 2012). Thus, the development of carriers systems for these compounds that may help to protect them against deleterious environmental factors and to incorporate them into more complex food systems in an efficient manner is a current topic of study.

Microencapsulation is a reliable technique that has been in use for many decades for protecting bioactive compounds from degrading under the influence of environmental factors. This

technique relies on surrounding the bioactive compounds with a semi-permeable biopolymeric matrix, avoiding or retarding their coming into contact with the deleterious environmental factors. An ongoing research topic is how to improve the physicochemical, functional, and release properties characteristics of these biopolymeric matrices, and to make them more cost efficient.

The most widely used encapsulating material is alginate, a natural anionic polyelectrolyte extracted from various species of algae, and composed by (1-4)-linked β -D-mannuronate (M) and α -L-guluronate units (G), which are present in the linear macromolecule in homopolymeric blocks of each monomer, together with blocks of alternating sequence (Donati et al., 2005). Alginate has several features that make it a suitable choice material for encapsulation such as low cost, simple use, biodegradability, biocompatibility, capability to undergo chain-chain association and forming three dimensional gels in the presence of divalent cations (e.g., Ca^{2+}) (Fang et al., 2008). However, alginate gels are susceptible to disintegrate in the presence of excess monovalent ions, Ca^{2+} -chelating agents, and harsh chemical environments (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990). They also present high permeability, due to their porous and hydrophilic structure which causes

* Corresponding author. Tel./fax: +52 55 58044650.

E-mail address: jjar@xanum.uam.mx (J. Alvarez-Ramirez).

rapid release of entrapped materials (Chan et al., 2011; Hosseini et al., 2014; López-Córdoba, Deladino, & Martino, 2013; Martin, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales, 2013), which may be considered a drawback in some applications. Some authors have reported that alginates can form matrices with improved structural and functional properties by the addition of other polymers as fillers (Chan et al., 2011; López-Córdoba, Deladino, & Martino, 2014; Wu, He, Chen, Han, & Li, 2014). Hosseini et al. (2014) informed that the presence of resistant starch in alginate microcapsules resulted in higher nisin encapsulation efficiency and loading capacity, while López-Córdoba et al. (2013) found that the incorporation of starch granules improves the release characteristics of alginate-based capsules.

There are very few researches about the combination of alginate with chemically modified starch. It is interesting to note that chemically modified starches exhibit reduced digestibility, so they qualify as resistant starches, and may have an important role in human health (Chung, Shin, & Lim, 2008). No reports are available characterizing the effect of the alginate-chemically modified starch weight ratio on the structural, mechanical, loading, and release properties of microcapsules containing bioactives. This knowledge is relevant considering that the most important mechanisms that regulate the release rate of bioactive compounds (diffusion, swelling, biodegradation/erosion and osmotic pressure) will depend on the composition of the biolymeric matrix and the surrounding fluid (Barba, d'Amore, Chirico, Lamberti, & Titomanlio, 2009; Pothakamury & Barbosa-Cánovas, 1995).

Chlorogenic acid (CGA, 5-caffeoylquinic acid) is a widely used bioactive in functional foods due to its antioxidant activity and scavenging of reactive oxygen species capacity (Pal, Banerjee, & Ghosh, 2012; Pal & Mitra, 2010; Sato et al., 2011), and for preventing diverse health conditions (Shin et al., 2015). CGA is easily oxidized and sensitive to heat and light (Chao et al., 2012), and for this reason was chosen as the bioactive to be encapsulated in this work.

The objectives of this work were to: (a) encapsulate chlorogenic acid (CGA) in modified tapioca starch-filled calcium alginate hydrogel beads ($HB_{CA/TS}$); (b) evaluate the size, textural, microstructural, and viscoelastic properties of the beads; (c) determine the CGA entrapment efficiency, antioxidant activity, and release kinetics under simulated gastrointestinal conditions; and (c) evaluate the starch-alginate-CGA interactions on the beads.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Sodium alginate (SA; FD 175, 60.5% guluronic acid content) was purchased from CP Kelco (Lille Skensved, Denmark). A hydroxypropyl distarch phosphate from tapioca starch (TS; INS number 1442; $D_{4,3} = 13.26 \mu\text{m}$) was obtained from Ingredion Mexico (Guadalajara, State of Jalisco, Mexico). Chlorogenic acid (CGA, molecular weight = 354.31 Da), porcine bile extract (B8631), and DPPH (2, 2-di (4tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) free radical were purchased from Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Other reagents used were of analytical grade. All water used was double distilled and deionized (DDW).

2.2. Preparation of hydrogel beads using different weight ratio of sodium alginate/ Ca^{+2}

When SA is contacted with Ca^{+2} in solution, cross-linking between the carboxylate anions of the alginate guluronate units and the calcium ions occurs, resulting in the formation of a gel (Reis, Neufeld, Ribeiro, & Veiga, 2006). Thus, the weight ratio between

SA/ Ca^{+2} ($R_{SA/CaCl_2}$) is crucial in influencing the gel properties. The total milliequivalents (meq) of carboxylate groups of SA was determined by potentiometric titration: 40 mL of an aqueous solution containing 2 g of SA per 100 mL⁻¹ DDW (pH 6.7) was titrated with hydrochloric acid (0.1 N) to the pKa value (pH 3.5) (Mi, Sung, & Shyu, 2002). A 60 s time lag elapsed between two aliquots (0.1 mL) to allow the reaction to reach equilibrium. The solution pH was continuously monitored with a pH meter (Hanna Instruments, model HI 98240, Smithfield, RI, USA) at 25 °C. The meq of HCl necessary to reach pKa were doubled in order to calculate the total meq carboxylate groups present in SA (1.86 meq per g⁻¹). This means that 1 g of SA required 0.128 g of CaCl_2 (0.046 g Ca^{+2}). From these results six hydrogel calcium alginate beads variations (HB_{CA}) were prepared using different $R_{SA/CaCl_2}$ as follows: 1/0.128, 1/0.256, 1/1.28, 1/2.56, 1/6.4, and 1/12.8. In this way, the amount of CaCl_2 added to each SA solution was 0.256, 0.512, 2.56, 5.12, 12.8 and 25.6 g per 100 mL. The beads were coded as $HB_{0.128}$, $HB_{0.256}$, $HB_{1.28}$, $HB_{2.56}$, $HB_{6.4}$, and $HB_{12.8}$, after the amount of CaCl_2 in $R_{SA/CaCl_2}$. HB_{CA} were prepared by the extrusion technique (Sandoval-Castilla, Lobato-Calleros, García-Galindo, Alvarez-Ramírez, & Vernon-Carter, 2010) with slight modifications. Solutions of SA (2 g per 100 mL) were prepared, stored for 24 h at 4 °C for allowing full hydration, and degassed by ultrasound. The beads were formed by dripping 20 mL of SA solution into 160 mL of different CaCl_2 solutions containing the weight concentrations required for achieving each $R_{SA/CaCl_2}$ mentioned above with the help of a 0.8 mm (30½ G) needle (Muthukumarasamy, Allan, & Holley, 2006). The HB_{CA} were maintained in the gelling bath to harden for 30 min at room temperature (20 ± 2 °C), harvested by filtration through a plastic mesh of 0.19 mm, and washed with DDW thrice. The $R_{SA/CaCl_2}$ which produced the HB_{CA} with best sphericity and textural properties was used for preparing the calcium alginate-modified starch hydrogel beads containing CGA ($HB_{CA/TS}$).

2.3. Preparation of the calcium alginate-modified starch hydrogel beads

Four $HB_{CA/TS}$ variations were prepared from 100 mL of solutions containing 2 g of SA and different amounts of TS: 0.0, 0.67, 2.0 and 6.0 g to achieve weight ratios ($R_{SA/TS}$) of 1/0, 0.75/0.25, 0.5/0.5 and 0.25/0.75, respectively. The $HB_{CA/TS}$ beads were coded as $HB_{1/0}$, $HB_{0.75/0.25}$, $HB_{0.5/0.5}$, and $HB_{0.25/0.75}$. The solutions were stored for 24 h at 4 °C for allowing full hydration, degassed by ultrasound, and added with 40 mg of CGA. The $HB_{CA/TS}$ were formed by dripping the SA/TS solutions into a CaCl_2 solution at the $R_{SA/CaCl_2}$ that resulted in the best beads (Subsection 2.2). The $HB_{CA/TS}$ were maintained in the gelling bath for hardening for 30 min. Subsequently, the $HB_{CA/TS}$ were filtered, washed with buffer solution (acetic-acetate, pH 5.5). Samples of fresh made beads were used for determining the diameter, sphericity and textural characteristics. Surplus beads were dried in a vacuum (304 mm Hg) convection oven (Shellab model 1410 vacuum oven, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA) at 45 °C until reaching constant weight and a water activity of about 0.35. The dried beads were placed into a desiccator containing a saturated solution of MgCl_2 at room temperature until required for their characterization. The water activity in the desiccator at this temperature was about 0.32. The dried beads were used for the rest of the experiments.

2.4. Morphology, diameter and sphericity of beads

HB_{CA} and $HB_{CA/TS}$ were observed in an Olympus BX45 phase contrast microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Japan). Micrographs, at a magnification of 4×, were taken to thirty beads randomly selected with a digital camera MoticCam 2500 (Motic

China Group Co. Ltd., Ningbo, Zhejiang, China). The diameter of each microcapsule variation was measured using the Motic Images Plus version 2.0 software (Motic China Group Co. Ltd., Ningbo, Zhejiang, China). The sphericity factor (SF) was calculated with the following equation (López-Córdoba et al., 2013):

$$SF = \frac{d_{\max} - d_{\min}}{d_{\max} + d_{\min}}$$

where d_{\max} is the largest diameter and d_{\min} is the smallest diameter perpendicular to d_{\max} . The sphericity factor varies from 0 for a perfect sphere to approaching unity for an elongated object.

2.5. Textural properties of the beads

The primary textural properties of hardness, cohesiveness, and springiness (Bourne, 2002) of HB_{CA} and HB_{CA/TS} were determined using a Stable Micro Systems Texturometer model TA-XT2i (Texture Technologies Corp., White Plains, NY, USA) equipped with a 5 kg load cell. In order to guarantee good test reproducibility due to the particulate nature of the beads, a cylindrical steel probe with a large contact area (35 mm in diameter) was used. Each measurement was carried out at room temperature (20 ± 2 °C) on 30 g of each HB_{CA} and HB_{CA/TS} placed on a fixed bottom glass plate under the probe. The automatic detection of the contact by the probe with the beads was carried out with a contact force of 0.005 N (Sandoval-Castilla et al., 2010). The samples were compressed 30%, using two compression cycles at a constant crosshead velocity of 1.0 mm s⁻¹ in all cases. The textural properties values were obtained using the equipment's Texture Expert Software for Windows Version 3.2.

2.6. Microstructure

Microstructure of the dried HB_{CA/TS} was observed by Scanning Electronic Microscopy (SEM). Samples were coated with a thin layer of gold in a Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japan). A high vacuum JEOL Scanning Electron Microscope JMS-6360LY (Jeol Ltd., Akishima, Japan), at 30 kV, was used to view each sample at different magnifications.

2.7. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC studies were carried out on dried HB_{CA} and HB_{CA/TS}, with and without CGA, and on SA and CGA powders, using a Q1000 equipment (TA, New Castle, DE, USA) previously calibrated with an indium standard. Samples (3.0 mg) were weighed into aluminum pans, added 6.0 μL of DDW, and sealed. The pans were allowed to equilibrate for 16 h at room temperature before being loaded into the DSC chamber. The samples were heated from 20 to 300 °C at a heating rate of 5 °C min⁻¹. An empty pan was used as the reference. All measurements were done by triplicate.

2.8. ATR-FTIR spectroscopy

The interaction between SA, TS and the CGA was evaluated by ATR-FTIR. To this end, FTIR spectra were obtained for SA, TS and CGS on one hand, and on the other, for dried HB_{CA} and HB_{CA/TS}, with and without CGA. The FTIR spectra were obtained using a Spectrum 100 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) equipped with a crystal diamond universal ATR sampling accessory. The mirror velocity was 0.3 cm s⁻¹. Before each measurement, the ATR crystal was carefully cleaned with ethanol. During the measurement, the sample was in contact with the universal diamond ATR top-plate. A spectrum of the empty cell was used as background. The spectrum of water was

subtracted in all the cases in order to remove the distorting effect of water in the region 1200–900 cm⁻¹. For each sample, the spectrum represented an average of four scans with 4 cm⁻¹ resolution. Spectra were baseline-corrected at 1200–900 cm⁻¹ by drawing a straight line.

2.9. CGA antioxidant activity and encapsulation efficiency

Antioxidant activity of encapsulated CGA was determined using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) as a free radical, according to the method proposed by López-Córdoba et al. (2014) with minor modifications. A known weight of HB_{CA/TS} (~2.5 g) was disintegrated by suspending in 16 mL of sodium citrate solution (7.5%, w/v) and stirred at 37 °C and 180 rpm until complete dissolution (Hosseini et al., 2014). An aliquot of 250 μL of supernatant was removed and mixed with 3.5 mL of DPPH ethanol solution (23 mg DPPH L⁻¹). Absorbance was determined at 517 nm until the reaction reached a plateau. Antioxidant activity was expressed as the inhibition percentage (% I) of the free radical DPPH, calculated with the following equation:

$$\%I = \frac{Abs_b - Abs_s}{Abs_b} \times 100$$

where Abs_b and Abs_s are the absorbance of control reaction (without the sample) and of the sample, respectively. A standard curve of CGA concentration (0.0125–0.4 mg mL⁻¹) versus absorbance values was obtained using DPPH as described above, and used for estimating the amount of encapsulated CGA. The encapsulation efficiency (EE) was calculated using the following equation:

$$EE(\%) = \frac{\text{encapsulated CGA}(\text{mg})}{\text{initial CGA}(\text{mg})} \times 100$$

2.10. Swelling

Samples of dried beads (20 g) and 300 mL of water were placed in flasks and put in a shaker at 37 °C and 180 rpm. Swollen beads were sampled every 10 min, the excess water was removed from the surface with Whatman Grade 1 filter paper and the wet weight was determined immediately. The swelling process was monitored up to 180 min. The beads swelling ratio (%Sw) was estimated by means of the relationship

$$\%Sw = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100$$

where W_t and W_0 are the weight of the swollen beads at time t and the weight of the dried beads, respectively.

2.11. Encapsulation stability

The task of the encapsulation system is to protect the CGA against adverse (light or oxygen) environmental conditions. In this regard, the stability of CGA in the HB_{CA/TS} variations was evaluated by placing the beads in Petri dishes covered with transparent cellophane paper and exposed to daily light at room temperature (~18 °C) and relative humidity (66%). Following the method described in Subsection 2.9, the antioxidant activity of CGA contained in the HB_{CA/TS} was quantified after 28 days, and the stability of CGA was determined as the ratio of the antioxidant activity after 28 days of storage time ($t = 672$ h) relative to that encountered immediately after manufacture ($t = 3$ h).

2.12. Release rates of encapsulated CGA under simulated gastrointestinal conditions

The CGA release was determined by sequentially exposing HB_{CA/TS} to simulated gastric juice and bile salts conditions. HB_{CA/TS} samples (~5 g) were placed in glass beakers containing 8.8 mL of simulated gastric solution (pH 2.3) with 0.1 N HCl (Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato-Calleros, Pedroza-Islas, & Vernon-Carter, 2009), incubated at 37 °C for 2 h in a Precision Scientific 360 orbital shaker bath (Cole Parmer, Chicago, IL, USA). Aliquots of 250 µL of the supernatant were taken at 0, 1, 3, 5, 15, 30, 60, 90, and 120 min.

After exposure to simulated gastric juice, the HB_{CA/TS} were recovered by filtration, washed with DDW and deposited in glass beakers tubes containing 8.8 mL of a solution (0.3 g 100 mL⁻¹, pH 6.8) of porcine bile extract. The SFHB_{CA/TS}-bile salt blends were incubated at 37 °C for 2 h in the Precision Scientific 360 orbital shaker bath (Sandoval-Castilla et al., 2010). Aliquots of 250 µL were taken from the supernatant at 0, 3, 5, 15, 30, 60, 90, and 120 min. The released CGA was determined using the procedure indicated in Section 2.9.

2.13. Viscoelastic properties

The dynamic viscoelastic properties were determined on calcium alginate-tapioca starch cylindrical hydrogels (height 5 mm; diameter 50 mm). The calcium alginate hydrogels were formed by placing 24 mL of solution of SA (2 g per 100 mL) + the required quantity of TS in order to achieve weight ratios (R_{SA/TS}) of 1/0, 0.75/0.25, 0.5/0.5 into Petri dishes (diameter: 9.5 × height: 1.3 cm). Afterward 6 mL of a CaCl₂ solution at the same concentration used for forming the HB_{CA/TS} (Section 2.3) were dripped upon the SA/TS solutions, which were left to rest at room temperature for 12 h for hydrogel formation. For the sake of simplicity we shall continue to refer to these hydrogels as HB_{CA/TS} variations. Measurements were carried out using a Physica MCR 301 rheometer (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Germany), with a parallel plate geometry, in which the rotating plate was 50 mm in diameter, and machined with thin long fins to minimize sample slippage (PP50-2). The distance between the plates was set at 5 mm. The cylindrical hydrogel samples were loaded, and allowed to relax for 5 min after loading for structure recovery. Amplitude sweeps were carried out at 5 °C to characterize the viscoelastic linear region of the gels by applying a strain sweep ranging from 0.01% to 100% at 1 Hz. Temperature maintenance was achieved with Physica TEK 150P temperature control and measuring system. The loss modulus, $\tan(\delta) = G''/G'$, was obtained from the equipment software (RheoPlus/32 V2.62) in all cases. Analysis was performed on 24 h aged hydrogels.

2.14. Data analysis

Analyses were performed in triplicate from three independent experiments using a randomized experimental design, subjecting the experimental data to Simple Classification Variance Analysis. Whenever it was adequate Tukey's test was applied. Significance was established at $p \leq 0.05$. Data analysis was done using Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA).

3. Results

3.1. Effect of the weight ratio of sodium alginate/Ca²⁺ in bead textural properties

According to titration results, HB_{0.128}, corresponded to the minimal amount of CaCl₂ that was required for neutralizing the

carboxyl-site covalent bonds; namely, 0.128 g of CaCl₂ (0.046 g Ca²⁺) per gram of SA. Excess of CaCl₂ induced inter-molecular ionic bounds formed by calcium ions between polymeric chains during crosslinking of SA molecules. It has been suggested that the crosslinking with the G residues of G-blocks forms an egg-box structure, which controls the effective crosslinking strength and the mechanical properties of alginate gels (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990). Table 1 presents the textural properties of the HB_{CA} as function of calcium content. Addition of calcium between 0.128 and 1.28 g of CaCl₂ per gram of SA produced significantly smaller diameter of the beads induced by shrinkage due to strong crosslinking between SA molecules, and higher sphericity. However further increases in CaCl₂ concentration did not had a significant effect on beads diameter or sphericity. On the other hand, the hardness, cohesiveness and springiness tended to increase as the calcium content was increased. In particular, increased cohesiveness and springiness are important for bead stability under handling (e.g., extrusion). HB_{6.4} and HB_{12.8} exhibited the highest textural characteristic values, which were non-significantly different. Thus, a R_{SA/CaCl2} ratio of 1/6.4 was chosen for the formulation of the HB_{CA/TS} variations. This suggests that the addition of about 50–100 fold-times the minimum CaCl₂ required for intra molecular bonding could lead to the formation of intermolecular bonds between alginate molecules, resulting in enhanced textural properties.

3.2. Textural properties of calcium alginate-modified tapioca starch beads

Table 2 presents the geometrical and textural characteristics of the HB_{CA/TS} variations. The beads filled with TS had significant larger diameter and lower sphericity than HB_{1/0}, but were non-significantly different among themselves. HB_{0.5/0.5} and HB_{0.25/0.75} showed significant lower moisture content and enhanced textural characteristics, but HB_{0.75/0.25} showed non-significantly different moisture content and significantly lower hardness and cohesiveness than the bead without added TS (HB_{1/0}). These results suggest that an appropriate balance between SA and TS is required for the development of a more closely packed structural arrangement, where TS acts as texturizer filler, providing higher viscoelastic properties to the hydrogel beads.

3.3. Microstructure of HB_{CA/TS}

Fig. 1 presents SEM images of the HB_{CA/TS} variations corresponding, from top to bottom, to HB_{1.0/0.0}, HB_{0.75/0.25}, HB_{0.5/0.5} and HB_{0.25/0.75}. The left panel corresponds to 70× magnification of the complete beads, while the right panel to 500× magnification reveals the microstructural features of their surface. The HB_{1.0/0.0} containing only alginate showed a spherical-like geometry with some subsidence, which might be reflecting the presence of inner holes. The surface was rather smooth, but also showed surface

Table 1

Effect of the weight ratio of sodium alginate/Ca²⁺ on geometrical and textural properties of the calcium alginate beads (HB_{CA}).

Bead code	Diameter (mm)	Sphericity factor	Hardness (N)	Cohesiveness (ratio)	Springiness (ratio)
HB _{12.8}	1.74 ± 0.09 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	5.13 ± 0.10 ^e	0.67 ± 0.04 ^d	0.95 ± 0.05 ^c
HB _{6.4}	1.78 ± 0.08 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	5.05 ± 0.10 ^e	0.65 ± 0.02 ^d	0.93 ± 0.03 ^c
HB _{2.56}	1.74 ± 0.04 ^a	0.03 ± 0.02 ^a	3.33 ± 0.04 ^d	0.63 ± 0.03 ^c	0.87 ± .01 ^d
HB _{1.28}	2.02 ± 0.12 ^b	0.04 ± 0.01 ^a	2.34 ± 0.08 ^c	0.62 ± 0.02 ^c	0.57 ± .01 ^c
HB _{0.256}	2.95 ± 0.19 ^c	0.07 ± 0.02 ^{ab}	1.97 ± 0.13 ^b	0.51 ± 0.03 ^b	0.51 ± 0.02 ^b
HB _{0.128}	3.72 ± 0.20 ^d	0.09 ± 0.01 ^b	0.76 ± 0.02 ^a	0.47 ± 0.02 ^a	0.46 ± 0.02 ^a

The results were obtained from triplicate experimental runs. Superscripts with different letters indicate statistical significant differences.

Table 2
Geometrical and textural properties of calcium alginate-tapioca starch filled beads (HB_{CA/TS}).

Bead code	Diameter (mm)	Sphericity factor	Moisture (%)	Hardness (N)	Cohesiveness (ratio)	Springiness (ratio)
HB _{1,0}	1.74 ± 0.09 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	89.23 ± 0.59 ^c	5.29 ± 0.07 ^b	0.67 ± 0.01 ^b	0.95 ± 0.01 ^a
HB _{0.75/0.25}	1.93 ± 0.11 ^b	0.05 ± 0.00 ^b	88.88 ± 0.17 ^c	5.01 ± 0.14 ^a	0.54 ± 0.02 ^a	0.98 ± 0.02 ^{ba}
HB _{0.5/0.5}	1.94 ± 0.07 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	87.18 ± 0.9 ^b	5.78 ± 0.46 ^b	0.65 ± 0.01 ^b	1.00 ± 0.02 ^b
HB _{0.25/0.75}	1.99 ± 0.02 ^b	0.06 ± 0.01 ^b	81.97 ± 0.51 ^a	9.41 ± 0.02 ^c	0.72 ± 0.01 ^c	1.00 ± 0.03 ^b

The results were obtained from triplicate experimental runs. Superscripts with different letters indicate statistical significant differences.

fissures (Fig. 1a and b). Addition of TS into the alginate matrix induced important changes in bead microstructure. The starch granules acted as fillers of the alginate matrix, and in Fig. 1c–h, it is clearly discernible that many TS granules were embedded into the bead surface, retaining their shape, and were characterized by exhibiting a central void. As TS fraction in the beads increased, an increasingly tortuous, rough, bumpy surface emerged (Fig. 1c–h). Interestingly, surface cracks (fissures) running along the valleys separating the embedded starch granules, led to a sort of connected-caverns porous structure (Chan et al., 2011; Zohar-Perez, Chet, & Nussinovitch, 2004). Surface subsidence was less apparent as the starch fraction was increased. This suggests that the starch granules acted as structural support for modulating bead shrinking and surface fracture after drying.

Cross-section cuts of the HB_{CA/TS} variations was performed in order to explore the effects of TS addition on the internal structure by SEM analysis (Fig. 2). HB_{1,0/0,0} exhibited a high density of internal thin fissures (Fig. 2a), which were also observed on the bead surface (Fig. 1b). The internal structure was homogenous with no apparent layer effect due to crosslinking mechanisms acting from the surface to the inner regions. In HB_{0.75/0.25} TS addition changed the internal structure due to homogenous accommodation of granules in the interstitial regions (Fig. 2b). Relative small amounts of TS addition reduced the extent of the internal cracks observed in HB_{1,0/0,0} (Fig. 2a), but led to the formation of cracks around the embedded starch granules (Fig. 2b and c), probably induced by the drying process. As the amount of TS increased, the cracks along the valleys tended to disappear and to occur only around de starch granules (Fig. 2d). Although, the SEM micrographs of the bead surfaces (Fig. 1d, f and h; magnification 500 ×) showed that the embedded starch granules tended to show central crater-like voids, the cross-sectional cuts (magnification 2000×) did not show these apparent holes. Thus, the holes were not caused by the encapsulation process. Lateral (Fig. 2 e, magnification 3000×) and perpendicular (Fig. 2 f; magnification 5000×) views of the cross-section cuts show that the apparent holes visualized at lower magnifications could be the remnants of the Maltese cross in native starch granules.

3.4. Encapsulation efficiency and CGA antioxidant activity

Table 3 presents the encapsulation characteristics of the HB_{CA/TS} variations. Interestingly, the incorporation TS led to significant increases of CGA encapsulation efficiency. A possible scenario for this increase is as follows: During the alginate crosslinking process loss of CGA was caused by diffusional transport towards the CaCl₂ solution. It is apparent that bead shrinking induced by crosslinking magnified the leaking of CGA. In this way, the incorporation of starch granules reduced the antioxidant loss by reducing the effective diffusivity through the calcium alginate microstructure. Indeed, given the tight porosity of starch granules (Sujka & Jamroz, 2007), they acted as a solid barrier that obstructed the diffusion transport from the inside of the bead to the surface. In other words, entrapment efficiency increased as the tortuosity produced by TS increased up to a practically constant value. The beads antioxidant

activity, quantified in terms of inhibition percentage (% I), showed a similar behavior as that for the encapsulation efficiency, showing a linear relationship described by the following equation: % I = -22.60 + 1.014% EE. This suggests that the CGA has only a weak interaction with the bead matrix.

3.5. Swelling

In many instances, it is convenient to dry the beads and before put to use for specific applications, to reconstitute them. In line with reported results for starch-filled alginate dried capsules (López-Córdoba et al., 2013), during the first 8–12 min, the capsule swelling showed a fast increase. Afterward, the swelling showed a slow increase until achieving a steady-state value. In the case of our dried HB_{CA/TS}, the swelling ratio was dependent of the starch fraction (Table 3). In fact, the higher the starch content, the higher the swelling ratio. A possible mechanism for bead swelling is as follows. SEM micrographs presented in Fig. 2 showed that starch granules reduced large fractures, but at the expenses of an increase of cracks surrounding the embedded granules. Such microstructure induced movement and filtering of fluids through porous materials (percolation). The local osmotic pressure induced by the water percolation led to an initial bumps formation and, hence to a reduction of the transport resistance within the encapsulation matrix. The starch granules enhanced the water transport via absorption by the formation of hydrogen bonds with hydroxyl groups (Tako, Tamaki, Teruya, & Takeda, 2014). In this way, the relatively high swelling ratio observed for HB_{0.5/0.5} and HB_{0.25/0.75} reflects the highly connected-caverns porous structure (Fig. 2b–e), which allowed an easy absorption of water into the beads matrix.

3.6. Stability

The action of the environmental conditions can have a negative effect in the antioxidant activity of the CGA. The aim of the encapsulation system is to protect the CGA from the deleterious effects of light and oxygen, among other factors, under normal shelf conditions. The relative antioxidant activity after 28 days of storage relative to the initial antioxidant activity immediately after beads manufacture was as follows: HB_{1,0/0,0} (85.73 ± 0.78%), HB_{0.75/0.25} (80.52 ± 0.68%), HB_{0.5/0.5} (84.02 ± 0.87%), and HB_{0.25/0.75} (88.73 ± 0.78%). Notice that HB_{0.75/0.25}, containing a relative low amount of TS, afforded the least protection to CGA against degradation. These results seem to be closely associated to the surface and internal microstructure of the beads (Figs. 1 and 2). These results are in close agreement with the release rates of CGA under the influence of simulated gastrointestinal conditions and an in depth discussion is provided in Subsection 3.9.

3.7. Thermal analysis

Fig. 3 displays the DSC thermograms of CGA (curve A), SA (curve B), calcium alginate beads (HB_{6,4}) without and with CGA (curves C and D), and calcium alginate beads filled with TS (HB_{0.5/0.5}) without

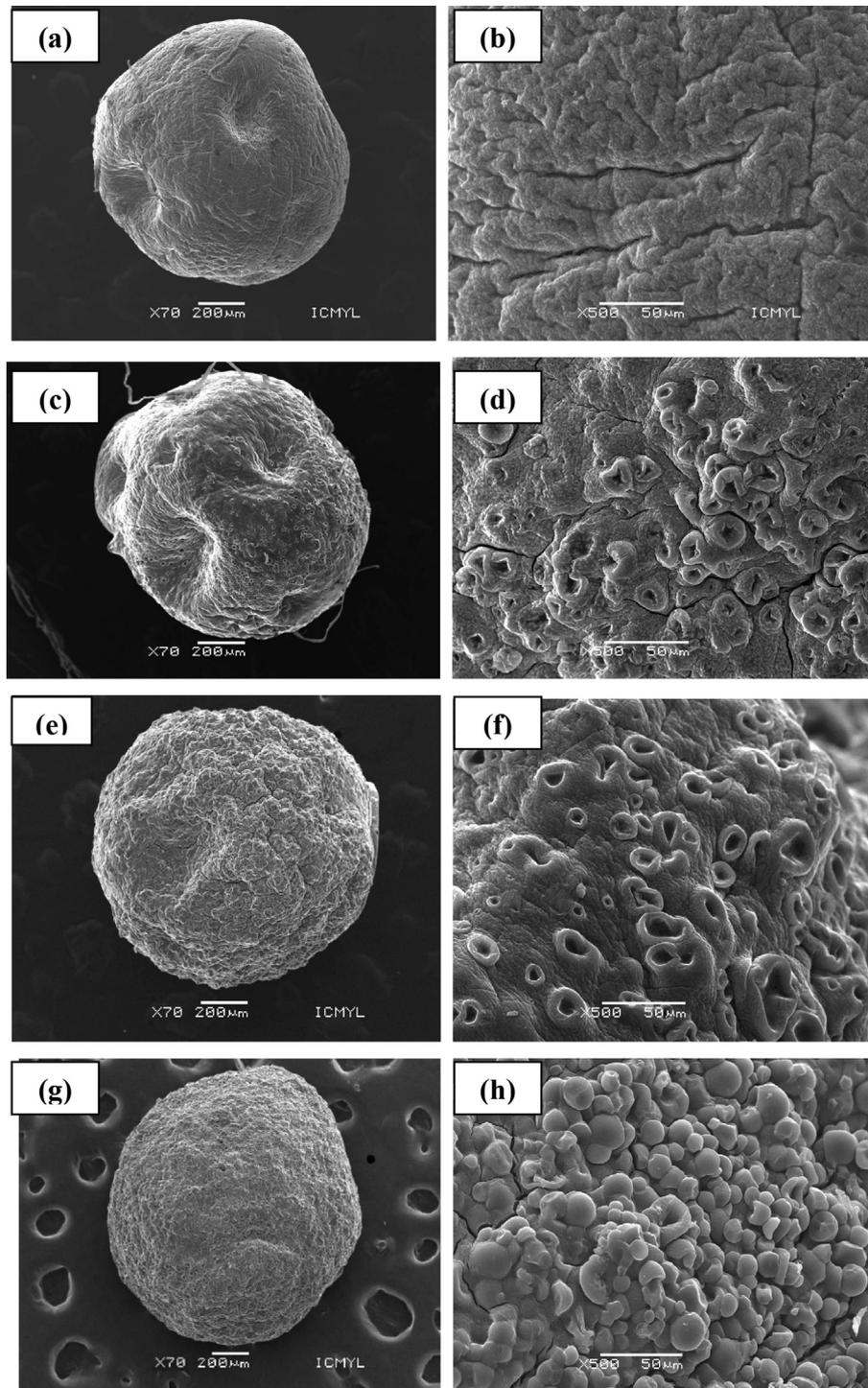


Fig. 1. SEM images of the calcium alginate filled with tapioca starch bead variations ($HB_{CA/TS}$). Left panel magnification of 70 \times ; right panel magnification of 500 \times : (a and b) $HB_{1/0}$, (c and d) $HB_{0.75/0.25}$, (e and f) $HB_{0.5/0.5}$, and (g and h) $HB_{0.25/0.75}$.

and with CGA (curves E and F). CGA showed an exothermic peak at 211 °C, indicative of the molecular structure breakdown. Similarly, the sodium alginate (curve B) displayed an exothermic peak at about 225–235 °C, which resulted from the breakdown of the biopolymer (Mimmo, Marzadori, Montecchio, & Gessa, 2005). This exothermic peak was removed after the crosslinking process with Ca^{+2} (curve C), indicative that the calcium ion stabilized the biopolymer structure via the conformation of the egg-box structure (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990). It can be observed that, after the addition of CGA (curve D) the characteristic endotherm at about

105 °C and 184 °C (corresponding to melting of the beads) did not shift appreciably, suggesting lack of any interaction between the bioactive and encapsulation matrix, whether made up by pure calcium alginate or calcium alginate filled with tapioca starch.

3.8. FTIR analysis

Fig. 4 displays the IR spectra of CGA (curve A), SA and TS (curves B), alginate beads ($HB_{6.4}$) without and with CGA (curves C and D), and starch-filled beads ($HB_{0.5/0.5}$) without and with CGA (curves E

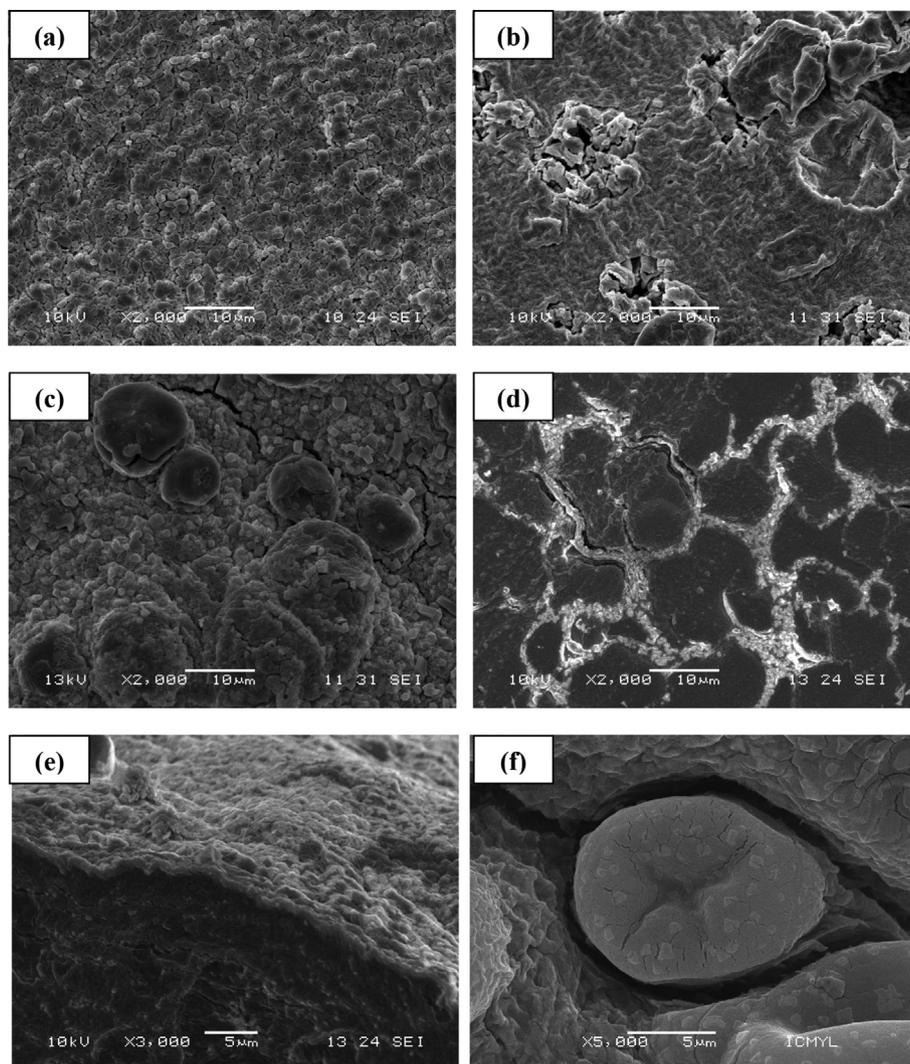


Fig. 2. SEM images of cross-section cuts of the calcium alginate filled with tapioca starch bead variations ($HB_{CA/TS}$): (a) $HB_{1/0}$, (b) $HB_{0.75/0.25}$, (c) $HB_{0.5/0.5}$, (d) $HB_{0.25/0.75}$ at magnification 2000 \times ; (e) Lateral view of $HB_{0.25/0.75}$ at magnification 3000 \times , showing the packing of the starch granules within the sodium alginate matrix; and (f) $HB_{0.25/0.75}$ at magnification 5000 \times , where the remnant of Maltese cross can be observed.

and F). CGA displayed bands that are characteristic of phenolic compounds. The broad band centered on 3380 cm^{-1} has been related to the stretching modes of O–H groups. The shoulder at 3218 cm^{-1} can be assigned to the hydroxyl groups involved in an intermolecular hydrogen bond. On the other hand, the peaks at about 1520 cm^{-1} can be related to the C=C vibrations of an aromatic ring while the bands at about 1270 cm^{-1} to the C–O stretching. The IR spectra of calcium alginate beads containing CGA (Curve D) showed also the C=C vibration shoulder at 1520 cm^{-1} that is absent in the IR spectra for beads without the CGA (curve C). López-Córdoba et al. (2013) commented that the spectra changes at the $1570\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$ region can be related to interaction between

the polar groups of phenolic compounds and the hydroxylic/carboxylic groups of biopolymers. The addition of starch granules within the sodium alginate matrix induced changes in the region located between 1500 and 900 cm^{-1} (Curve E). In fact, the IR response at the wavelengths of 1156 , 1080 and 1019 cm^{-1} can be related to vibrations of C–O and C–C of starch polymers glucose units. Besides, in line with recent studies, the addition of resistant starch to alginate matrix induced a decrease in the wave number COO^- response from 1654 and 1464 cm^{-1} to 1641 and 1453 cm^{-1} , respectively (Hosseini et al., 2014). The peak at about 3390 cm^{-1} was wider for the beads containing starch granules, which can be attributed to the starch–alginate interaction via the stretching of

Table 3

Encapsulation efficiency, release characteristics, and swelling of the calcium alginate–tapioca starch filled beads ($HB_{CA/TS}$).

Bead code	Encapsulation efficiency (%)	Inhibition (%)	Release (%) (2 h, pH 2.3)	Release (%) (2 h, pH 6.8)	Swelling ratio (%)
$HB_{1/0}$	81.69 ± 1.8^a	60.29 ± 1.5^a	34.46 ± 3.143^b	10.75 ± 0.889^b	107.04 ± 5.1^a
$HB_{0.75/0.25}$	84.4 ± 1.3^b	62.94 ± 0.87^b	72.61 ± 4.953^c	17.28 ± 1.6^d	117.50 ± 6.1^a
$HB_{0.5/0.5}$	98.76 ± 1.4^c	77.61 ± 0.93^d	37.36 ± 1.511^b	12.35 ± 0.65^b	156.85 ± 7.4^b
$HB_{0.25/0.75}$	96.71 ± 0.9^c	75.42 ± 0.07^c	24.95 ± 0.935^a	8.329 ± 0.176^a	163.84 ± 8.0^b

The results were obtained from triplicate experimental runs.

Superscripts with different letters indicate statistical significant differences.

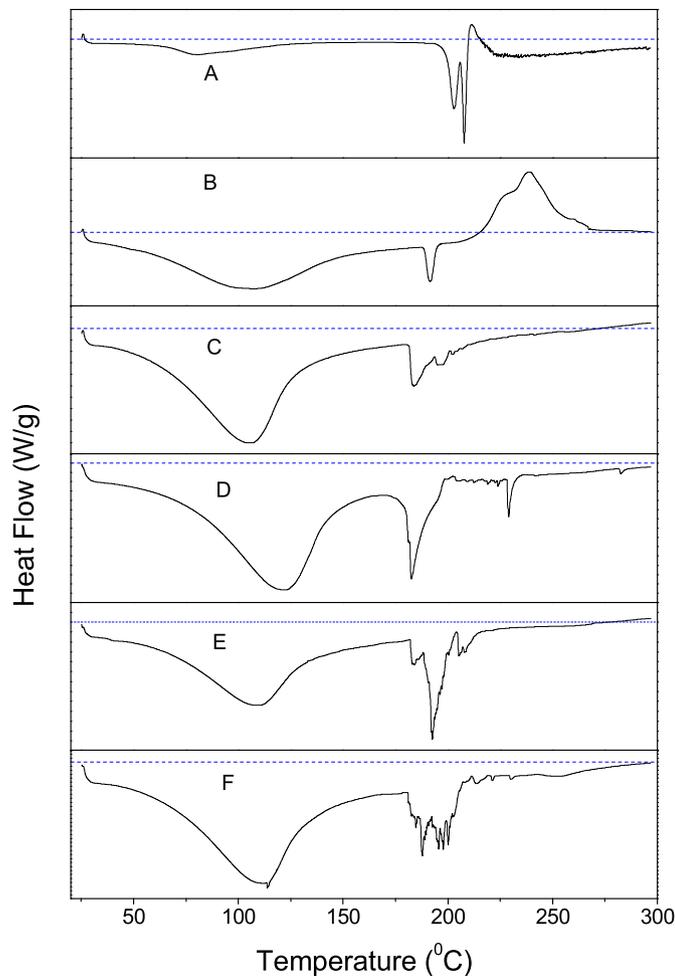


Fig. 3. DSC thermograms of CGA (curve A), sodium alginate (Curve B), calcium alginate bead ($HB_{6.4}$) without and with CGA (curves C and D), and calcium alginate starch-filled bead ($HB_{0.5/0.5}$) without and with CGA (curves E and F).

–OH groups (Kizil, Irudayaraj, & Seetharaman, 2002). Finally, it can be appreciated that the addition of CGA had only slight effects in the IR spectra pattern, which can be considered as evidence in support of the presence of CGA inside of the starch-filled beads.

3.9. Release rates in simulated digestive fluids

Fig. 5 a presents the release kinetics under simulated gastric juice (i.e., pH 2.3) conditions. In the first 5–6 min, a high release rate can be observed for all $HB_{CA/TS}$ variations. This fast release was not caused by diffusional effects, but probably by erosion and weakening of the bead matrix structure, due to polysaccharide hydrolysis induced by HCl (Wang & Copeland, 2012). A slow release process exhibiting slow dynamics followed the rapid release kinetics, probably caused by diffusional transport effects. Table 3 indicates that the highest release percentage after 2 h was shown by the $HB_{0.75/0.25}$ variation, which can be reflecting a more labile bead microstructure in the face of hydrochloric acid attack. Probably the profusion of cracks around starch granules in $HB_{0.75/0.25}$ (Fig. 2b) and $HB_{0.50/0.50}$ (Fig. 2c) was responsible for the increased release % of CGA upon water absorption and bead swelling under simulated gastrointestinal conditions, compared to that occurring in $HB_{1/0}$. In contrast, the lowest release % was displayed by $HB_{0.25/0.75}$ variation. These results suggest that while fissures promote leaking out of CGA from the bead matrix, high concentration of TS promotes a higher tortuosity in the matrix, which in turn plays an

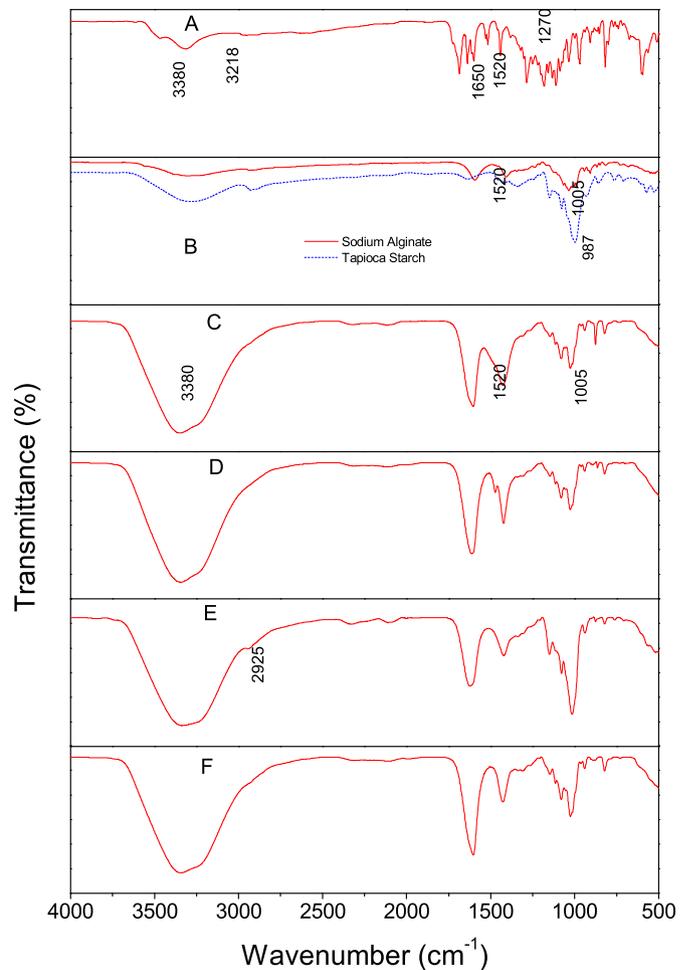


Fig. 4. IR spectra of CGA (curve A), sodium alginate and tapioca starch (curves B), calcium alginate bead ($HB_{6.4}$) without and with CGA (curves C and D), and calcium alginate starch-filled bead ($HB_{0.5/0.5}$) without and with CGA (curves E and F).

important role in delaying internal transport of CGA via physical (e.g., obstruction of diffusional transport) and electrostatic effects (Rincon Bonilla & Bhatia, 2013). This same discussion applies for explaining the antioxidant stability of CGA (Subsection 3.6). High TS concentrations obstructed the diffusion of oxygen to the interior of the beads, while at low and moderate TS concentrations, fissures permitted a relatively rapid diffusion of O_2 into the beads.

After exposition to the simulated gastric juice conditions, the beads were moved into bile salts juice (pH 6.8) conditions. Fig. 5 b displays the further release percentage occurring relative to the previous gastric conditions. Interestingly, the intestinal conditions induced release dynamics similar to that of gastric conditions. However, the initial stepping was more pronounced for the latter than for the former. It is apparent that the change from acidic conditions into more neutral conditions produced a more drastic fracture of the already cracked beads. This additional cracking could have been caused by ionic shock affecting the interaction between calcium, alginate and starch.

The release mechanism of CGA was evaluated using three empirical models (Costa & Sousa-Lobo, 2001) for the experimental data in Fig. 5. If M_t/M_∞ is the fraction released at time t , the first-order decaying model is given by

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \exp(-k_1 t) \quad (1)$$

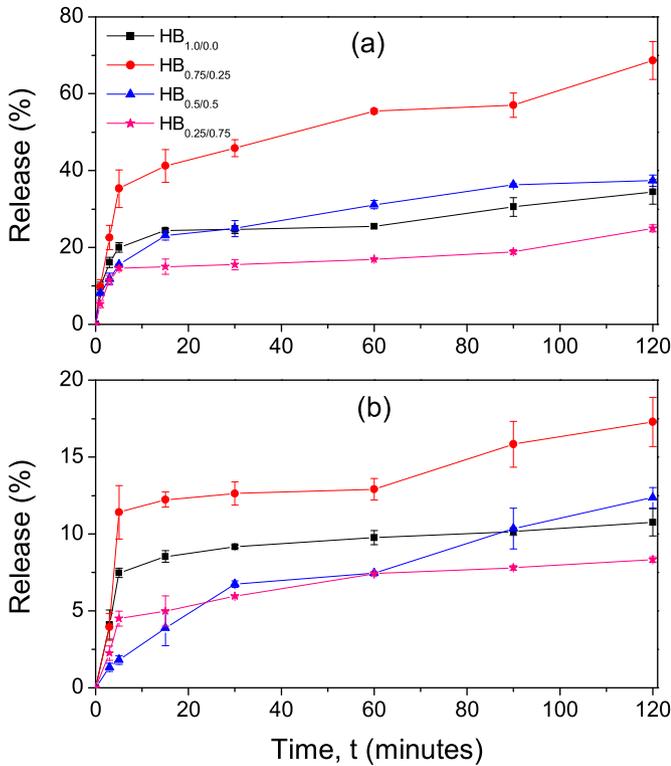


Fig. 5. Release kinetics under (a) gastric (pH 2.3) and (b) bile salts (pH 6.8) conditions.

where k_1 is the decaying rate. The power-law or Korsmeyer-Peppas model (Korsmeyer, Gurny, Doelker, Buri, & Peppas, 1983) is given by

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^{n_{KP}} \quad (2)$$

where n_{KP} is the diffusion exponent. The Korsmeyer-Peppas model provides some insights into the mechanisms involved in the release of the CGA. In fact, values of n_{KP} in the range 0.5–1.0 indicate anomalous super-diffusion kinetics, n_{KP} about 0.5 indicates Fickian diffusion controlled mechanism. Values of n_{KP} values below 0.5 reflect anomalous sub-diffusion kinetics. The diffusion-relaxation model can be written as

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_d t^m - k_r t^{2m} \quad (3)$$

where the first term represents the diffusion transport contribution and the second term represents the case-II relaxation contribution, which takes in account the combination of two release mechanisms. A standard least-square procedure was used for estimating the parameters of the models described above. Table 4 presents the

estimated parameters for simulated gastric (pH 2.3) and bile salts (pH 6.8) conditions. It was found that $n_{KP} < 0.5$ for all cases, indicating that the release kinetics was dominated by non-Fickian diffusion transport. In fact, diffusion exponent values with $n_{KP} < 0.5$ are related to sub-diffusion in complex, fractal-like matrices, with molecules moving slower than Brownian motion (Joshi, Patel, Kevadiya, & Bajaj, 2009; Kevadiya, Joshi, & Bajaj, 2010). In line with recent work (López-Córdoba et al., 2013), the best fit was obtained with the diffusion-relaxation model (Eq. (3)) for all systems under both gastric and intestinal conditions. This is not surprising at all since Eq. (3) involves two mechanisms that can provide a better description of the release kinetics. The exponent m is about 0.17–0.21, which is the range of the values reported by López-Córdoba et al. (2013) for similar starch-filled encapsulation systems. Following Costa and Sousa-Lobo (2001) and Llabot, Manzo and Allemandi (2014), Eq. (3) is related to a reduction of the attractive forces between plasticized chains within the encapsulation matrix, which promotes the mobility and migration of the bioactive compounds.

3.10. Viscoelasticity of the calcium alginate-tapioca starch hydrogels

A complex 3D network was formed by crosslinked calcium alginate molecules entangled around the TS granules, leading to a viscoelastic material. The different CA-TS hydrogels variations were subjected to relatively large oscillatory deformations. Fig. 6 a presents the loss factor, $\text{Tan}(\delta) = G'/G''$, as function of the strain %. A linear regimen was observed for strains smaller than about 3.0%. Here, the loss factor was about 0.25 (reflecting a solid-like behavior), and unimportant differences were presented by the hydrogel variations. For higher strain %, the value of $\text{Tan}(\delta)$ became >1 indicating a fluid-like behavior. In this region of relatively large deformations, the hydrogels presented differences in the loss factor magnitude. The smallest and highest loss factor was found for $\text{HB}_{0.75/0.25}$ and $\text{HB}_{0.25/0.75}$, respectively. Interestingly, the former hydrogel led to the highest CGA release %, while the latter hydrogel to the lowest CGA release %. This effect is described in Fig. 6 b where an inverse relationship between CGA release % (after gastric and intestinal conditions) and the loss factor at 100% of strain, can be noted. That is, the higher the loss factor, the lower the release % of CGA. High values of the loss factor are related to material having enhanced flow properties. A higher fluidity was associated to beads having a more flawed (cracks, fissures) microstructure.

4. Conclusions

Calcium alginate beads filled with increasing tapioca starch fractions achieved increasingly higher chlorogenic acid encapsulation efficiency, and tended to achieve lower particle size and

Table 4

First-order decaying rate (k_1), power-law exponent (n_{KP}) and diffusion-relaxation exponent (m) for CGA release kinetics under gastric and intestinal simulated conditions.

Bead code	Gastric k_1 (min^{-1})	Intestinal k_1 (min^{-1})	Gastric n_{KP}	Intestinal n_{KP}	Gastric m	Intestinal m
$\text{HB}_{1/0}$	0.26 ± 0.02^a $R_{\text{corr}}^2 = 0.93$	0.22 ± 0.01^a $R_{\text{corr}}^2 = 0.91$	0.22 ± 0.02^a $R_{\text{corr}}^2 = 0.94$	0.17 ± 0.02^a $R_{\text{corr}}^2 = 0.90$	0.18 ± 0.03^a $R_{\text{corr}}^2 = 0.98$	0.15 ± 0.03^a $R_{\text{corr}}^2 = 0.96$
$\text{HB}_{0.75/0.25}$	0.13 ± 0.02^b $R_{\text{corr}}^2 = 0.93$	0.19 ± 0.01^b $R_{\text{corr}}^2 = 0.90$	0.34 ± 0.03^b $R_{\text{corr}}^2 = 0.95$	0.44 ± 0.01^b $R_{\text{corr}}^2 = 0.91$	0.19 ± 0.05^a $R_{\text{corr}}^2 = 0.96$	0.21 ± 0.04^b $R_{\text{corr}}^2 = 0.96$
$\text{HB}_{0.5/0.5}$	0.09 ± 0.01^c $R_{\text{corr}}^2 = 0.91$	0.12 ± 0.02^c $R_{\text{corr}}^2 = 0.92$	0.32 ± 0.02^b $R_{\text{corr}}^2 = 0.93$	0.41 ± 0.02^b $R_{\text{corr}}^2 = 0.92$	0.18 ± 0.02^a $R_{\text{corr}}^2 = 0.98$	0.21 ± 0.02^b $R_{\text{corr}}^2 = 0.97$
$\text{HB}_{0.25/0.75}$	0.12 ± 0.01^b $R_{\text{corr}}^2 = 0.93$	0.09 ± 0.02^d $R_{\text{corr}}^2 = 0.93$	0.23 ± 0.03^a $R_{\text{corr}}^2 = 0.94$	0.26 ± 0.03^c $R_{\text{corr}}^2 = 0.93$	0.17 ± 0.05^a $R_{\text{corr}}^2 = 0.97$	0.17 ± 0.03^c $R_{\text{corr}}^2 = 0.96$

The results were obtained from triplicate experimental runs. Superscripts with different letters indicate statistical significant differences.

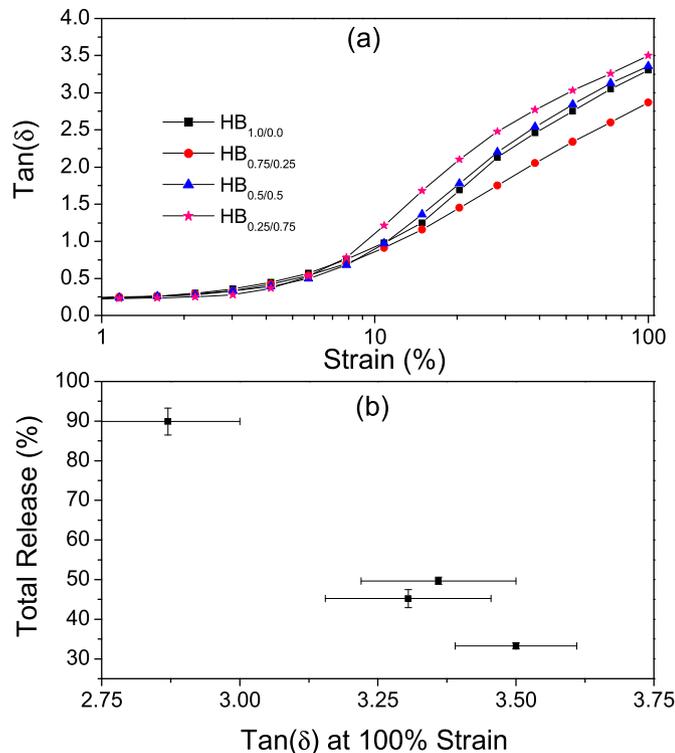


Fig. 6. (a) Calcium alginate starch-filled beads variations (HB_{CATS}) loss factor as function of the strain. (b) Inverse relationship between release % and high-deformation loss factor.

higher sphericity than their counterpart made with only calcium alginate. The microstructure, textural characteristics, viscoelastic properties, chlorogenic acid release rates and antioxidant stability were modulated by the amount of tapioca starch added to the calcium alginate beads. A complex interplay between matrix porosity and tortuosity arose in the calcium alginate beads filled with tapioca starch. When relatively high amounts of tapioca starch were added to the calcium alginate beads, the embedded starch granules produced a more tortuous matrix that exhibited increased textural and viscoelastic properties, and obstructed the entrance of oxygen into and the leaking out of chlorogenic acid from the matrix. In contrast, when relatively low amounts of tapioca starch granules were added to the calcium alginate, the resulting tortuosity was not enough to override the porosity induced by the fissures in the matrix, and faster release rates of CGA took place and antioxidant activity of CGA was diminished. It is concluded that the use of tapioca starch as filler in alginate-based encapsulation systems is a suitable cheap alternative for modulating their physicochemical properties and the release rates of bioactives.

References

Barba, A. A., d'Amore, M., Chirico, S., Lamberti, G., & Titomanlio, G. (2009). A general code to predict the drug release kinetics from different shaped matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(2–3), 359–368.

Bourne, M. C. (2002). *Food texture and viscosity: Concept and measurement* (2nd ed.). New York, NY: Academic Press.

Chan, E. S., Wong, S. L., Lee, P. P., Lee, J. S., Ti, T. B., Zhang, Z., et al. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83, 225–232.

Chao, J., Wang, H., Zhao, W., Zhang, M., & Zhang, L. (2012). Investigation of the inclusion behavior of chlorogenic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 277–282.

Chung, H. J., Shin, D. H., & Lim, S. T. (2008). In vitro starch digestibility and estimated glycemic index of chemically modified corn starches. *Food Research International*, 41, 579–585.

Costa, P., & Sousa-Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123–133.

Donati, I., Holtan, S., Mørch, Y. A., Borgogna, M., Dentini, M., & Skjåk-Braek, G. (2005). New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium–alginate gels. *Biomacromolecules*, 6, 1031–1040.

Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Nishinari, K., Funami, T., & Williams, P. A. (2008). Binding behavior of calcium to polyuronates: comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, 72, 334–341.

Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xia, E. Q., et al. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129, 345–350.

Hosseini, S. M., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., German, J. B., Mortazavian, A. M., Mohammadi, A., et al. (2014). Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. *Carbohydrate Polymers*, 103, 573–580.

Joshi, G. V., Patel, H. A., Kevadiya, B. D., & Bajaj, H. C. (2009). Montmorillonite intercalated with vitamin B1 as drug carrier. *Applied Clay Science*, 45, 248–253.

Kevadiya, B. D., Joshi, G. V., & Bajaj, H. C. (2010). Layered bionanocomposites as carrier for procainamide. *International Journal of Pharmaceutics*, 388, 280–286.

Kizil, R., Irudayaraj, J., & Seetharaman, K. (2002). Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3912–3918.

Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), 25–35.

Llabot, J. M., Manzo, R. H., & Allemandi, D. A. (2004). Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 276(1), 59–66.

López-Córdoba, A., Deladino, L., & Martino, M. (2013). Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohydrate Polymers*, 95, 315–323.

López-Córdoba, A., Deladino, L., & Martino, M. (2014). Release of yerba mate antioxidants from corn starch–alginate capsules as affected by structure. *Carbohydrate Polymers*, 99, 150–157.

Martin, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT—Food Science and Technology*, 53, 480–486.

Mi, F.-L., Sung, H.-W., & Shyu, S.-S. (2002). Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers*, 48, 61–72.

Mimmo, T., Marzadori, C., Montecchio, D., & Gessa, C. (2005). Characterisation of Ca and Alepectate gels by thermal analysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 340, 2510–2519.

Muthukumarasamy, P., Allan, P. W., & Holley, A. R. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*, 71, M20–M24.

Pal, D., Banerjee, S., & Ghosh, A. K. (2012). Dietary-induced cancer prevention: an expanding research arena of emerging diet related to healthcare system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 3(1), 16.

Pal, D., & Mitra, S. (2010). A preliminary study on the in vitro antioxidant activity of the stems of *O. vulgaris*. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(2), 268–272.

Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., & Vernon-Carter, E. J. (2009). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 42, 292–297.

Pothakamury, U. R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (1995). Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 6(12), 397–406.

Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Design of insulin-loaded alginate nanoparticles: influence of the calcium ion on polymer gel matrix properties. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 12(1), 47–52.

Rincon Bonilla, M., & Bhatia, S. K. (2013). Diffusion in pore networks: effective self-diffusivity and the concept of tortuosity. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(7), 3343–3357.

Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43, 111–117.

Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., et al. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403, 136–138.

Shin, H. S., Satsu, H., Bae, M. J., Zhao, Z., Ogiwara, H., Totsuka, M., et al. (2015). Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chemistry*, 168, 167–175.

Smidsrod, O., & Skjåk-Braek, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71–78.

Sujka, M., & Jamroz, J. (2007). Starch granule porosity and its changes by means of amylolysis. *International Agrophysics*, 21(1), 107.

Tako, M., Tamaki, Y., Teruya, T., & Takeda, Y. (2014). The principles of starch gelatinization and retrogradation. *Food and Nutrition Sciences*, 5(3), 280–291.

- Wang, S., & Copeland, L. (2012). New insights into loss of swelling power and pasting profiles of acid hydrolyzed starch granules. *Starch–Stärke*, 64(7), 538–544.
- Wu, Z., He, Y., Chen, L., Han, Y., & Li, C. (2014). Characterization of *Raoultella plan-ticola* Rs-2 microcapsule prepared with a blend of alginate and starch and its release behavior. *Carbohydrate Polymers*, 110, 259–267.
- Xi, J., & Shouqin, Z. (2007). Antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis by high hydrostatic pressure extraction. *International Journal of Food Science & Technology*, 42, 1350–1356.
- Zohar-Perez, C., Chet, I., & Nussinovitch, A. (2004). Irregular textural features of dried alginate–filler beads. *Food Hydrocolloids*, 18, 249–258.