

## Tesis de Maestría

# Encapsulación de licopeno empleando polielectrolitos. Influencia del secado y congelado sobre su estabilidad

Aguirre Calvo, Tatiana Rocío

2013-12-09

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Aguirre Calvo, Tatiana Rocío. (2013-12-09). Encapsulación de licopeno empleando polielectrolitos. Influencia del secado y congelado sobre su estabilidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Aguirre Calvo, Tatiana Rocío. "Encapsulación de licopeno empleando polielectrolitos. Influencia del secado y congelado sobre su estabilidad". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-12-09.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Maestría en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de  
Alimentos

**“Encapsulación de licopeno empleando polielectrolitos.  
Influencia del secado y congelado sobre su estabilidad.”**

Tesis presentada para optar al título de Magíster de la Universidad de Buenos Aires en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos

Autora: Lic. Tatiana Rocío Aguirre Calvo

Director de tesis: Dr. Patricio Román Santagapita

Lugar de trabajo: Departamento de Industrias y Departamento de Química Orgánica. FCEN. UBA.

Buenos Aires, 2013

## RESUMEN

### **“ENCAPSULACIÓN DE LICOPENO EMPLEANDO POLIELECTROLITOS. INFLUENCIA DEL SECADO Y CONGELADO SOBRE SU ESTABILIDAD.”**

El objetivo del presente trabajo de tesis fue estudiar la estabilidad de un extracto de licopeno obtenido de una fuente natural no convencional como el pomelo rosado a partir de su encapsulación en cápsulas de polielectrolitos sometidas a procesos de congelación y deshidratación. Se emplearon distintos polielectrolitos como alginato, pectina, quitosano con la adición de varias gomas y azúcares como trehalosa y  $\beta$ -ciclodextrina para estudiar la influencia de la composición de las cápsulas sobre las propiedades fisicoquímicas y sobre la estabilidad del licopeno encapsulado, buscando establecer vínculos de estructura/función relacionados a la estabilidad. Se evaluó el efecto de distintos métodos de congelado y secado, y se analizó el contenido y la estabilidad del licopeno en función de los distintos tratamientos, tanto en sistemas húmedos como en deshidratados, así como los efectos de la composición en la liberación. Los resultados obtenidos muestran que la mejor matriz para realizar la extracción de licopeno fue pulpa de pomelo liofilizada, con el uso de aceite de oliva como agente extractor. Las cápsulas de alginato conteniendo trehalosa con  $\beta$ -ciclodextrina, goma guar, arábica o espina corona mantuvieron un alto contenido de licopeno luego de la congelación y deshidratación, independientemente de los métodos empleados. Los resultados de esta tesis pueden contribuir a la selección de excipientes para la formulación de cápsulas de polielectrolitos conteniendo no sólo licopeno sino biomoléculas lábiles en general, y pueden ser utilizados como punto de partida en varias aplicaciones tecnológicas.

#### PALABRAS CLAVES.

Licopeno, estabilidad; encapsulación; cápsulas de polielectrolitos; congelación; deshidratación; biopolímeros;  $\beta$ -ciclodextrina; trehalosa; hidrocoloides; movilidad molecular; interacciones moleculares.

## **ABSTRACT**

### **“LYCOPENE ENCAPSULATION USING POLYELECTROLYTES. INFLUENCE OF DRYING AND FREEZING ON ITS STABILITY.”**

The objective of this thesis was to study the stability of a lycopene extract obtained from an unconventional-natural source as pink grapefruit through its encapsulation in polyelectrolyte beads which were subjected to freezing and to drying. Different polyelectrolytes as alginate, pectin, chitosan with the addition of gums, and sugars as trehalose and  $\beta$ -cyclodextrin were used to study the influence of the composition on the physicochemical properties and stability of the lycopene beads, in order to establish structure/function relationships related to stability. The effect of different methods of freezing and drying was evaluated and the concentration and lycopene stability depending of treatments was analyzed, in both wet and dried systems. In addition, the effects of the composition on the release were analyzed. The results show that the best matrix to extract lycopene was liophilized pulp from pink grapefruit, using olive oil as extracting agent. Alginate beads containing trehalose with  $\beta$ -cyclodextrin, guar, arabic or *espina corona* gums retained a high lycopene content after freezing and drying, regardless of the methods used. The results of this thesis can contribute to the selection of excipients to formulate polyelectrolyte beads containing not only lycopene, but also labile biomolecules being a starting point for technological applications.

#### **KEYWORDS.**

Lycopene, stability, encapsulation, polyelectrolyte beads, freezing, drying, biopolymers,  $\beta$ -cyclodextrin, trehalose, hydrocolloids, molecular mobility, molecular interactions.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Doctor Patricio Román Santagapita mi más sincero agradecimiento por todo el apoyo y confianza a lo largo de toda la realización de esta tesis, por transmitirme sus conocimientos y por guiarme de forma precisa a través de este proceso, su constante ayuda y conocimientos en cada situación me han aportado mucho tanto en académica como personalmente. Muchas Gracias.*

*Al grupo de investigación de la Doctora Pilar Buera por permitirme desarrollar este proyecto.*

*A Universidad de Buenos Aires por la oportunidad de realizar mis estudios y esta investigación.*

*A mis padres Lucila y Walter, mi hermano Daniel y mi tía Elena y Sofía, mi familia por su constante apoyo y oraciones, que siempre están conmigo y me impulsan en mis sueños.*

*A mis amigas y compañeras de estudio Laura, Angélica, Mónica, Alejandra y Sandra por su apoyo en todo momento, por los días, tardes, noches y madrugadas estudiando y algunas veces, solo algunas pasando el tiempo juntas.*

*A todos docentes e investigadores con los que compartí en el laboratorio de Industrias y Orgánica en especial a Verónica, Marcela y Mario.*

*A mis amigas que a pesar de cientos de kilómetros de distancia siempre están incondicionalmente, Ana Carolina, Carol y Hellen.*

*A Dios quien nunca se aleja de mí, quien guía mi Destino,  
haciendo que cada mañana me levante con una sonrisa  
y a pesar de las tribulaciones  
tenga siempre su presencia junto a mí  
y con ella la seguridad de  
Una Promesa Eterna.*

*Lucila, Walter, Daniel & Elena.*

*A Promise of a Lifetime.*

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>8</b>
<b>1.1. LICOPENO.</b>	<b>9</b>
1.1.1. IDENTIFICACIÓN DEL LICOPENO.	12
<b>1.2. POMELO ROSADO.</b>	<b>13</b>
<b>1.3. ENCAPSULACIÓN.</b>	<b>15</b>
<b>1.4. ALGINATO DE SODIO.</b>	<b>17</b>
<b>1.5. CONFINAMIENTO EN CÁPSULAS DE POLIELECTROLITOS.</b>	<b>19</b>
<b>1.6. AZÚCARES.</b>	<b>22</b>
1.6.1. TREHALOSA.	22
1.6.2. $\beta$ -CICLODEXTRINA.	24
1.6.3. HIDROCOLOIDES.	25
1.6.3.a. Pectina.	26
1.6.3.b. Quitosano.	28
1.6.3.c. Goma Guar.	30
1.6.3.d. Goma Arabiga.	31
1.6.3.e. Goma Vinal.	33
1.6.3.f. Goma Espina Corona.	34
<b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
<b>3.1. MATERIALES.</b>	<b>41</b>
3.1.1. PREPARACIÓN DE LA FRUTA.	41
3.1.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO.	42
3.1.3. ELECCIÓN DE LOS AGENTES ENCAPSULANTES.	43
3.1.4. PREPARACIÓN DE LAS CÁPSULAS.	45
3.1.5. TRATAMIENTOS.	47
3.1.5.a. Congelación de cápsulas.	47
3.1.5.a.i. Ciclos de congelado.	47
3.1.5.a.ii. Tratamiento continuo.	48
3.1.5.b. Deshidratación de cápsulas.	48
<b>3.2. MÉTODOS.</b>	<b>48</b>
3.2.1. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO.	48
3.2.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR). MEDICIONES POR REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (ATR).	50
3.2.3. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE BAJO CAMPO ( <i>LF-NMR</i> ).	51
3.2.3.a. Tiempos de relajación espín-espín ( $T_2$ ).	52
3.2.3.b. Coeficientes de difusión.	53
3.2.3.c. Curvas isotérmicas a -20 °C, -30 °C y -70 °C.	54
3.2.3.c.i. Modelado de curvas isotérmicas.	55
3.2.4. ANÁLISIS DE IMÁGENES MEDIANTE EL PROGRAMA LIBRE IMAGEJ.	55
3.2.5. CONTENIDO DE AGUA.	57
3.2.5.a. Método gravimétrico.	57
3.2.5.b. Método de Karl Fischer.	57

3.2.5.c. Determinación de contenido de agua a partir de mediciones espectrales en infrarrojo cercano (NIR). .....	58
3.2.5.c.i. Análisis multivariado: regresión lineal y predicción. ....	59
3.2.6. ACTIVIDAD DE AGUA. ....	60
3.2.7. pH. ....	61
3.2.8. LIBERACIÓN DE LICOPENO PRESENTE EN LAS CÁPSULAS HÚMEDAS. ....	61
3.2.9. TRATAMIENTO DE DATOS. ....	62
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1. ESTABILIDAD DE EXTRACTO DE LICOPENO. ....</b>	<b>64</b>
<b>4.2. ESTABILIDAD DEL LICOPENO EN CÁPSULAS DE POLIELECTROLITOS CONTENIENDO AZÚCARES Y BIOPOLÍMEROS. ....</b>	<b>70</b>
<b>4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÁPSULAS HÚMEDAS. ....</b>	<b>73</b>
<b>4.4. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LAS CÁPSULAS Y LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y ESTABILIDAD DE LICOPENO. ....</b>	<b>95</b>
4.4.1. CONGELACIÓN DE CÁPSULAS DE LICOPENO. ....	95
4.4.2. DESHIDRACIÓN DE CÁPSULAS DE LICOPENO. ....	110
<b>4.5. ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE LICOPENO ENCAPSULADO. ..</b>	<b>121</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>128</b>
<b>6. ANEXO .....</b>	<b>134</b>
<b>6.1. ESTUDIO DE CONTENIDO DE AGUA POR NIR. ....</b>	<b>135</b>
6.1.1. CÁPSULAS DESHIDRATADAS .....	135
6.1.2. CÁPSULAS HÚMEDAS .....	137
<b>7. BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>141</b>

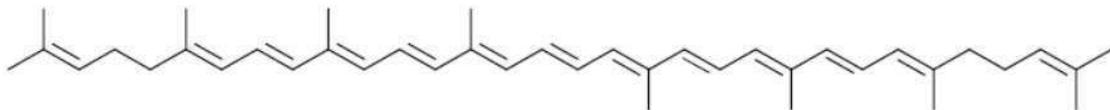
# **1. INTRODUCCIÓN.**

La encapsulación es un proceso en el cual ciertas sustancias lábiles provenientes de fuentes alimenticias se incluyen en una matriz o sistema de protección con el propósito de estabilizar, controlar su liberación y protegerlas de procesos deteriorativos como la oxidación, evaporación, degradación o desnaturalización térmica (Palzer y col., 2009). En esta introducción se presentarán los conceptos principales sobre: i) la biomolécula a ser encapsulada, **el licopeno**; ii) la fuente a partir de la cual se obtuvo, **el pomelo rosado**; iii) el proceso de encapsulación como tal, particularmente en **cápsulas de alginato-Ca (II)**; iv) los **agentes protectores** de biomoléculas utilizados en la presente tesis como el disacárido trehalosa y varios biopolímeros, y sus principales características que pueden tener impacto en la conservación y liberación controlada de licopeno proveniente de pomelo rosado.

### **1.1. LICOPENO.**

El licopeno ( $\psi,\psi$ -caroteno,  $C_{40}H_{56}$ ) es un pigmento natural liposoluble que se encuentra en ciertas plantas y microorganismos, cuyas funciones principales consisten en ser un accesorio de captación de luz de otros pigmentos (como clorofila) y como agentes protectores que inactivan las especies reactivas de oxígeno y por lo tanto previenen o retrasan el daño oxidativo, debido a su capacidad antioxidante (Singh y col., 2008). El licopeno es uno de los 600 carotenoides que se encuentran en la naturaleza proporcionando principalmente un color que va desde el rojo al amarillo; éste puede ser extraído de una matriz natural como tomate, sandía, albaricoque, papaya, maracayá, guayaba, pomelo rosado, zanahoria, pimiento, caqui, pera de bálsamo y un gran número de frutos rojos (por ejemplo, arándanos rojos) y oliva de otoño (Roldan-Gutiérrez y col., 2007).

Estructuralmente es un biocompuesto octaprenoide de estructura sencilla con cadena alifática de 40 átomos de carbono, derivado biosintéticamente en plantas a partir de dos unidades de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (Alquezar García, 2007), posee 13 enlaces dobles (de hecho es el caroteno más insaturado) y la mayoría de ellos están conjugados, como se muestra en la Figura 1.1.



*Figura 1.1. Estructura química del licopeno (6E,8E,10Z,12Z,14E,16E,18E,20Z,22Z,24E,26E)-2,6,10,14,19,23,27,31-octamethyldotriaconta-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridecaene).*

El licopeno es el pigmento encontrado en mayor concentración en algunos tipos de frutos como el tomate, dando su característico color rojo, y sus beneficios en la salud han sido ampliamente estudiados (Shi y col., 2002, Rao y col., 2004). La importancia del análisis y conservación del licopeno fue estudiada por diversos autores que muestran sus beneficios principalmente basados en sus propiedades funcionales y su aporte directo con la salud (Singh y col., 2008, Stahl y col., 1996, Gerster, 1997). Los resultados de estudios epidemiológicos y experimentales demuestran que el licopeno podría generar protección contra enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Giovannucci, 2005; Omoni y col., 2005), posee efectos antiproliferativos contra cultivos de células cancerígenas, y comparado con alfa y beta caroteno es más efectivo para la inhibición del crecimiento celular en tumores (Stahl y col., 1996, Gerster 1997, Kun y col., 2006; Levy y col., 1995).

Al ser un compuesto de alto valor funcional, el generar estrategias, metodologías y técnicas que permitan conservar sus propiedades es de gran importancia, así como

también la posibilidad de desarrollar un producto que lo incorpore proporcionaría oportunidades de transferencia tecnológica. El licopeno está permitido como colorante alimentario estableciendo criterios específicos de pureza, de acuerdo con la directiva 2011/3/UE. Además, de acuerdo al Codex Alimentario Argentino, en el Capítulo III (Asignación de Aditivos y sus Concentraciones máximas para la categoría de alimentos y preparaciones culinarias industriales) se estipula la concentración máxima de licopeno como 0,0005 g/100g alimento. Actualmente se vende como preparaciones a base de aceite (de maíz) con un 10 al 30 % de licopeno, por lo que su utilización se ve restringida sólo a ciertos productos alimentarios. Además, es posible hallar al licopeno comercialmente como suplemento alimentario; existen varias compañías que lo producen en EE.UU. (Newton-Everett Biotech), (producto comercial que se obtiene un concentrado de materia prima, para luego ser adicionado) (LYCOMLETE®) y Reino Unido (BIOVEA). En todos los casos la extracción se realiza a partir de tomate y el producto se comercializa como antioxidante en cápsulas blandas que en muchos casos contienen excipientes como aceite de soja/maíz, gelatina, glicerina y cera de abejas.

Por otro lado, se sabe que los carotenoides son susceptibles a la degradación por luz, oxígeno, calor y ácidos (Soon-Mi Shim y col., 2002). Asimismo, la separación, identificación y seguimiento en diferentes tipos de sistemas de los carotenoides han sido establecidos, permitiendo el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de los mismos (Rivera y col., 2012, Lavecchia y col., 2008, Lime y col., 1957). El blanqueamiento de pulpa de tomate durante el almacenamiento a -7 y -18°C se atribuyó a la degradación de los carotenoides debido a reacciones catalizadas por enzimas de oxidación, además de a los efectos asociados con la congelación (tales como la concentración de solutos, aumento de la fuerza iónica, cambios en el pH, la solubilidad del oxígeno, la actividad

de agua y la viscosidad) (Calligaris y col., 2002). Por otro lado, se encontró un evidente efecto de la temperatura de almacenamiento (aún sub-cero) sobre la pérdida de color, obteniendo una disminución del licopeno por análisis de cromatogramas de HPLC, que mostraron pérdidas de 48 y 26% en tomates liofilizados almacenados a -20 y -30 °C por 12 meses (Lisiewska y col., 2000, Sharma y col., 1996).

### 1.1.1. IDENTIFICACIÓN DEL LICOPENO.

El comportamiento cromatográfico y el espectro de absorción UV/visible proporcionan una forma adecuada de identificar licopeno para su estudio. A partir de su espectro UV/Vis es posible obtener características propias del cromóforo tanto respecto a las longitudes de onda de absorción máxima ( $\lambda_{\max}$ ) como al mismo tiempo permite identificar la forma del espectro (estructura fina espectral). El licopeno presenta 13 insaturaciones (11 dobles enlaces conjugados), absorbe a longitudes de onda largas en comparación a otros carotenoides ( $\lambda_{\max}$  a 444, 470, 502 nm) (Figura 1.2.). Para dar una idea de la estructura fina del espectro, se utiliza la notación científica III/II %, que es una relación de las absorbancias a dos  $\lambda_{\max}$  (Figura 1.2.). Esta notación tiene en cuenta la relación de la altura del pico de absorción de mayor absorbancia, designado III, y el pico de absorción de mayor  $\lambda$ , designado II, teniendo el mínimo entre los dos picos como la línea de base, multiplicado por 100 (Britton, 1995).

Diferentes autores reportaron diversos valores para la relación III/II%, pero existe consenso en que un índice alrededor de 60-62 % corresponde a licopeno *all-trans* (Britton, 1995). Por lo tanto, isomerizaciones de los dobles enlaces (trans a cis) provocarán cambios en la estructura fina del espectro del licopeno, afectando especialmente el pico de mayor  $\lambda$  (Britton, 1995).

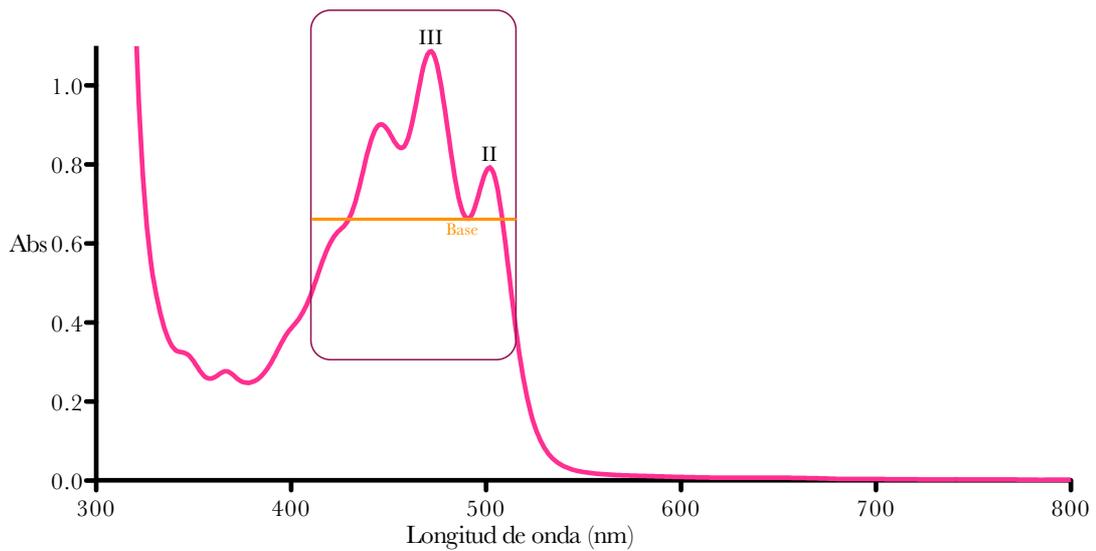


Figura 1.2. Espectro de absorbanca UV/Visible de pulpa de pomelo liofilizada. Los picos característicos para identificación de la estructura fina del licopeno se señalan: II (472nm), III (503 nm) y la base entre el pico III y II.

## 1.2. POMELO ROSADO.

En la presente tesis de investigación se extrajo el licopeno a partir de una fuente no convencional como es el pomelo rosado (*Citrus paradisi*) el cual es un híbrido que surgió entre el naranjo dulce y un *Pummelo citrus*. La producción de pomelo a nivel mundial fue alrededor de 3,8 millones de toneladas (2012), siendo Estados Unidos el productor líder con más de 2,3 millones de toneladas y el 45% destinado al consumo en fresco, seguido por países como Argentina, Cuba, Chipre, Israel, México, Mozambique y Sudáfrica (Fundacion Eroski, 2012).

Según los datos disponibles, Argentina es el mayor productor del hemisferio sur, con una producción de 200 mil toneladas (2000). Sus ventas externas se componen predominantemente de pomelo rosado y rojo, originarios en su mayor parte de la provincia de Salta y Jujuy. Los pomelos florecen durante la primavera y sus frutos maduran según las variedades entre los meses de otoño e invierno, por lo que su mejor

época de consumo es entre los meses de octubre y marzo (Ministerio de Economía y Finanzas Públicas, Presidencia de la Republica Argentina, 2004).

El pomelo rosado es una especie subtropical, y su calidad está asociada a una alta integral térmica. En general, la temperatura se considera el factor ambiental más importante en la incidencia sobre el color del fruto tanto externo como interno. Necesita temperaturas cálidas durante el verano para la correcta maduración de los frutos, mientras que la forma del fruto depende de la humedad relativa (Infoagro Systems, S.L, 2013).

Algunos datos sobre la composición general del pomelo: el peso fresco de un pomelo maduro es alrededor de 35 a 50 % de jugo, y éste jugo consiste en alrededor 88 a 93 % de agua, un 8 a 13 % de material soluble y una pequeña cantidad de sólidos insolubles. Azúcares (sacarosa y reductores) y ácidos (principalmente cítrico) constituyen el 85 al 90 % de sólidos solubles, conteniendo además vitaminas, sales minerales, aminoácidos, proteínas, grasa, pectinas y compuestos glicosídicos (Sinclair, 1950).

Existen muchos estudios que demuestran que es posible encontrar un alto contenido de licopeno en alimentos como el tomate, sandía, pomelo rosado, entre otros (Singh y col., 2008, Rusell y col., 2004, Wayne y col., 2002, Mi Shim y col., 2002, Lee y col., 2001, Nguyen y col., 1999, Nguyen y col., 1998, Khan y col., 1952), como se especifica en la Tabla 1.1. Gracias a esta revisión y teniendo en cuenta que Argentina es uno de los productores de pomelo rosado, se decidió emplear esta fruta como material para extraer el licopeno.

Tabla 1.1. Contenido de licopeno en frutos (frescos) característicos.

Nombre científico	Alimento	mg/100g	Referencia
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate	0,88-7,74	Clinton, 1998; Nguyen, 1999.
<i>Citrillus lantanus</i>	Sandia	2,30-7,20	USDA (1998)
<i>Prunus armeniaca</i>	Albaricoque	0,005	USDA (1998)
<i>Citrus paradisi</i>	Pomelo Rosado	3,36	USDA (1998)

### 1.3. ENCAPSULACIÓN.

La encapsulación empleando biopolímeros es una técnica útil en la protección de biocompuestos de interés alimentario. Esta técnica se ve apoyada en diversos estudios, como por ejemplo los reológicos, con el fin de seleccionar aquellos biopolímeros que presenten mejores propiedades de gelificación. Además, se debe tener en cuenta la aplicación final deseada con el objeto de asegurar la biodisponibilidad de los compuestos, su funcionalidad e incluso su fácil incorporación en los alimentos sin la alteración de sus propiedades sensoriales (Pal y col., 2009).

Existen resultados preliminares acerca de la utilización de la encapsulación como estrategia de conservación de biomoléculas relevantes para la industria alimentaria y farmacéutica (Lingyun y col., 2009; Lakkis, 2008; Shu y col., 2006). Se han desarrollado varias técnicas para la elaboración de materiales encapsulados, como por ejemplo la coacervación (Maji y col., 2007; Nakagawa y col., 2004); co-cristalización (Astolfi y col., 2005; Quillet y col., 2001); secado por atomización (*spray drying*) (Watanabe y col., 2002; Deis, 1997; Rosenberg y col., 1990); atomización por enfriamiento/congelación (Gouin, 2004; Schrooyen, y col., 2001; Augustin y col., 2001,); extrusión (Qi y col., 1999; Blake, 1994; Reineccius, 1991); y la formación de complejos de inclusión (Schneiderman y col., 2000; Szejtli, 1998; Muñoz-Botella y col., 1995).

Un factor importante a la hora encapsular es la liberación controlada del

biocompuesto. No existen muchos casos reportados sobre liberación de licopeno encapsulado. Zhai y col., 2013 analizaron datos de liberación de biocompuestos como polifenoles del té, licopeno y romero encapsulados por secado por aspersión en matrices de maltodextrina, empleando tres tipos de ecuaciones para los mecanismos de liberación: ecuaciones de orden cero, de primer orden y la ecuación de liberación de Higuchi, éste último desarrollado a partir de las soluciones de la ecuación de difusión de Fick (Zhai y col., 2013). Los autores hallaron que el modelo cinético más adecuado para liberación *in vitro* fue el modelo de orden cero, obteniendo un ajuste de  $R = 0,9828$  (Zhai y col., 2013).

En la presente tesis se utilizaron las cápsulas de alginato de sodio como método de encapsulación debido a que es un método simple, económico, versátil y escalable para la fabricación de sistemas encapsulados.

En cuanto a posibles aplicaciones de microcápsulas en alimentos, además de aquellas relacionadas con la nutrición, practicidad de empleo, estabilidad y distribución de ingredientes, es importante señalar que la nueva tendencia con la denominada gastronomía molecular, hace de especial interés este campo de investigación. Esta tecnología permite conjugar tanto un cambio en la textura de los alimentos debido al agregado de las microcápsulas (que pueden variar entre 1  $\mu\text{m}$  a 3 cm de diámetro) como también mejorar la estabilidad y suministro de biomoléculas de interés (como vitaminas (Madziva y col., 2006), aceites esenciales (Drush y Mannino, 2009), enzimas (Santagapita y col., 2011), micronutrientes (Han y col., 2008), antioxidantes (Deladino y col., 2008) y prebióticos (Vidhyalakshmi y col., 2009; Kailasapathy, 2006), entre otros.

#### 1.4. ALGINATO DE SODIO.

El alginato es un biopolímero natural derivado de algas marinas pardas del género *Phaeophyceae*, siendo la fuente principal de alginato comercial el alga gigante *Macrocystis pyrifera* (Smidsrod, 1997). El ácido algínico es segregado de manera natural como un exopolisacárido bajo condiciones de cultivo aerobias utilizando como sustrato sacarosa. Mediante el proceso de purificación y posterior tratamiento es posible obtener sales de este ácido mejor conocidas como alginato de sodio (Gombotz y Wee, 1998). Estructuralmente, el alginato de sodio es un hidrato de carbono, siendo un heteropolímero de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) unidos por uniones  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) como se muestra en la Figura 1.3. A lo largo de la cadena presenta zonas de poli-M y poli-G, conectadas por secciones M y G alternantes (Figura 1.3). Esta relación, al igual que la relación M/G es distinta para las diversas fuentes y determina las propiedades en solución de diversos alginatos. En la industria farmacéutica y alimentaria se utiliza como agente espesante, gelificante y estabilizante coloidal debido su capacidad de retener agua, además de sus propiedades viscosantes y estabilizante de emulsiones (Santagapita y col., 2012; Vidhyalakshmi y col., 2009)

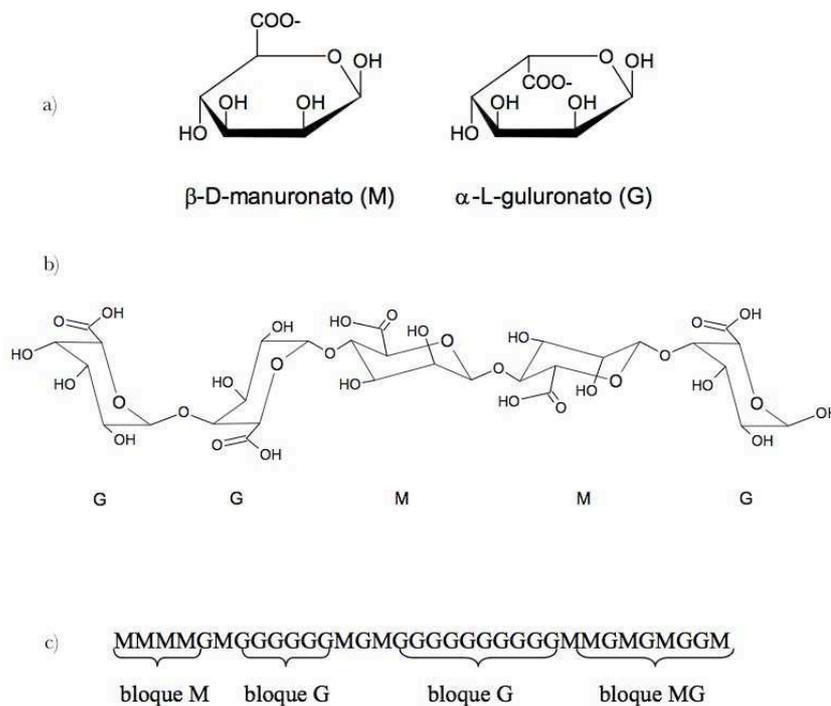


Figura 1.3. Estructura del alginato de sodio. a) monómeros: residuos manuronato y guluronato; b) posibles combinaciones entre los residuos en conformación silla; c) distribuciones de bloques posibles. Adaptado de Draget y col., 2005.

Las propiedades del alginato son muy dependientes del largo y predominio de cada uno de estos bloques (M o G) en la molécula. Las soluciones de los alginatos son muy viscosas, con propiedades que dependen principalmente de la relación M/G, del peso molecular y la temperatura, y es solo ligeramente influenciada por cambios de pH en el intervalo 4-10. En el intervalo de pH 5-10 sus soluciones son estables por largos periodos de tiempo a temperatura ambiente. La solubilidad del alginato en agua depende principalmente del pH del solvente, ya que éste determinará la carga de los residuos ácidos. Determinaciones potenciométricas (Haug y col., 1964) revelaron que las constante de disociación para los residuos M y G fueron 3,38 y 3,65, respectivamente; por lo tanto, el  $pK_a$  del alginato no difiere demasiado de estos valores. Los alginatos gelifican a temperatura ambiente en presencia de pequeñas cantidades de iones calcio u otros cationes (bario y estroncio) por gelificación ionotrópica (Braccini y col., 2001),

siempre que sus residuos estén cargados negativamente. Mediante cambios en el tipo y en la concentración de alginato e iones es posible controlar el gel obtenido, de modo tal de obtener geles blandos, elásticos, duros o rígidos. Además, la rigidez de la cadena aumenta en el orden  $MG < MM < GG$  (Saenz y col., 2009; Madziva y col 2006; Kailasapathy y col., 2006).

### **1.5. CONFINAMIENTO EN CÁPSULAS DE POLIELECTROLITOS.**

Teniendo en cuenta las propiedades de los polielectrolitos, su estructura química y características reológicas se eligen con el fin de generar una matriz protectora sobre el biocompuesto de interés, utilizando además sus características emulsificantes. La técnica de encapsulación con emulsión se ha definido como el proceso de dispersión de un líquido en otro líquido inmiscible donde la fase dispersa consta de la matriz que incluye el componente a ser encapsulado. La adición de un tensioactivo mejora la formación y estabilidad de la emulsión, así como la distribución de tamaño de las gotas (de Vos y col., 2010; Poncele, 2001). En este sentido, la preparación de microcápsulas por emulsificación puede llevarse a cabo empleando el mecanismo de gelificación externa o interna. Para el primer caso, la gelificación externa en emulsión consta en la dispersión de una mezcla solución de alginato- componente en una fase continua no acuosa, seguido de la adición de una fuente de calcio que al difundirse a la fase dispersa inicie la gelificación permitiendo la encapsulación, y a su vez, la desestabilización de la emulsión para la separación de las cápsulas formadas. Por otro lado, la técnica en emulsión por gelificación interna se fundamenta en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble o parcialmente soluble en cuyo caso se adiciona un agente secuestrante, contenido en una solución de alginato-componente el cual es dispersado en una fase

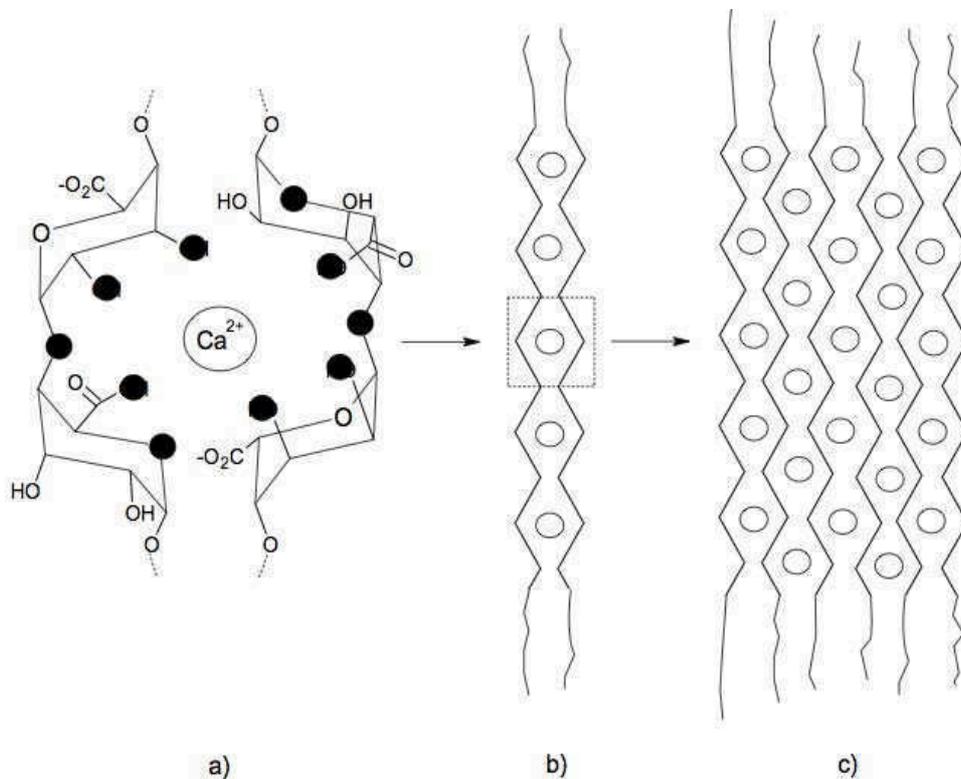
continua no acuosa generando una emulsión agua en aceite (W/O) (Chan y col., 2006; Gouin, 2004).

Como se comentó previamente, el alginato de sodio es capaz de producir geles con cationes divalentes. El catión divalente más apropiado para fines alimenticios es el calcio, debido a su baja toxicidad (Nussinovitch, 1997). El alginato tiene la característica particular de ser soluble en frío y su gelificación se produce en frío, a diferencia de la mayoría de los polisacáridos gelificantes, lo que significa que el ajuste de los geles de alginato tiene tendencia a ser independiente de la temperatura. Sin embargo, las propiedades del gel final se pueden alterar si la gelificación se lleva a cabo a diferentes temperaturas (Smidsrod y col., 1997).

La introducción de cloruro de calcio en una solución de alginato de sodio puede generar un gel. Típicamente, la solución de alginato de sodio acuosa se goteó en una solución de iones de calcio (Draget y col., 2006). Los iones de calcio inducen un efecto cooperativo entre bloques G para formar una red 3D que se conoce como el modo de "caja de huevo" (Rousseau y col., 2004) (Figura 1.4). Las cadenas del biopolímero se disponen en forma paralela y simétrica, formando cavidades cargadas negativamente (debido a que las cadenas poli-galacturónicas presentan uniones glicosídicas axial-axial) en donde encaja el catión. La Figura 1.4 detalla la coordinación del  $\text{Ca}^{2+}$  con los residuos de las cadenas (Figura 1.4a), la asociación de las mismas (Figura 1.4b) y la formación de la estructura caja de huevo y gelificación (Figura 1.4c).

Una de las ventajas de este sistema para su aplicación en sistemas de liberación controlada es que se puede inducir fácilmente la ruptura del gel mediante la inmersión de las cápsulas en una solución de citrato de sodio que actúa secuestrando los cationes

calcio que forman la estructura (Figura 1.4).



*Figura 1.4. Representación esquemática de la estructura formada durante la gelación del alginato con los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . a) coordinación del ion  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la cavidad creada por las cadenas de bloques guluronato (G); b) dímero con la estructura "caja de huevo"; c) asociación lateral de más cadenas y gelificación. Los puntos negros representan los átomos de oxígeno posiblemente involucrados en la coordinación con los iones  $\text{Ca}^{2+}$  (representado por los puntos blancos). Adaptado de Fang y col., 2007.*

Se ha reportado que los iones calcio son más efectivos que los cationes como el magnesio, manganeso, aluminio, iones férricos y ferrosos, en unificar cadenas de alginato juntas por interacciones iónicas seguidas de enlaces de hidrógeno entre cadenas (Gannadios, 1997). Recubrimientos de alginato más fuertes se obtuvieron a partir de cloruro de calcio en lugar de gluconato de calcio, nitrato, y propionato (Gannadios, 1997).

El estudio de las cápsulas de polielectrolitos puede ser planteado tanto desde el punto de vista básico, analizando las moléculas a ser utilizadas y sus propiedades, como desde el punto de vista tecnológico, debido a la multiplicidad de aplicaciones en áreas médico/farmacéuticas como así también recientemente en la industria de alimentos. Entre las vías alternativas de administración de biocompuestos y agentes encapsulados, la forma oral es una de las preferidas, pero en el caso particular de muchos compuestos lábiles, el pH ácido del estómago sumado a la actividad proteolítica del tracto intestinal, ocasionan una muy baja disponibilidad de las mismas (Zhou y col., 1991). El uso de microencapsulados en alimentos permite que los ingredientes alimenticios puedan ser cuidadosamente adaptables a una liberación controlada a través de la elección de las variables de encapsulación, es decir, mediante la relación de ingredientes y polímeros con el método de encapsulación utilizado (Kirby y col., 1992).

A continuación se describirá la estructura, características, usos y aporte de los azúcares y biopolímeros utilizados en la presente tesis, considerando que entre los excipientes empleados para la preparación de los sistemas de encapsulación se utilizaron azúcares (trehalosa o  $\beta$ -ciclodextrina), un biopolímero catiónico (quitosano), un biopolímero aniónico (pectina) o biopolímeros neutros (gomas guar, arábica, de vinal y espina corona).

## **1.6. AZÚCARES.**

### **1.6.1. TREHALOSA.**

Es un disacárido no reductor ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1,1)- $\alpha$ -D-glucopiranosido) formado por dos moléculas de glucosa unidas por sus carbonos anoméricos (Paiva y col., 1996), como se muestra en la Figura 1.5. Se encuentra presente en una amplia gama de

organismos llevando a cabo funciones como azúcar de reserva y como protector ante el estrés abiótico (Elbein y col., 2003). Posee amplias aplicaciones biotecnológicas ya que protege proteínas y membranas biológicas, lo cual permite que pueda ser usada como preservador de alimentos, enzimas, vacunas, células, tejidos y órganos (Santagapita y col., 2008, Chiraldi y col., 2002; Cerrutti y col., 2000; Lodato y col., 1999; Storey y col., 1998, Crowe y col., 1996; Uritani y col., 1995; Crowe y col., 1984).

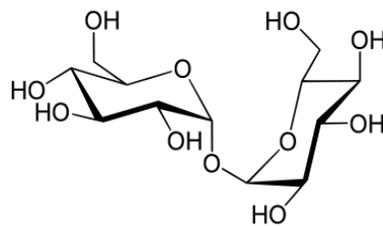


Figura 1.5. Estructura química de la trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1,1)- $\alpha$ -D-glucopiranosido).

Se han postulado dos teorías respecto al mecanismo molecular por el cual los azúcares participan en la protección de biomoléculas, estabilizando estos sistemas frente a tratamientos de deshidratación. Hay dos teorías: una la cual explica que siendo poliols, los azúcares pueden formar múltiples puentes de hidrógeno externos que reemplazarían a las moléculas de agua estructural esenciales que se encuentran unidas por puentes de hidrógeno a las biomoléculas, y de esta manera mantener su estructura molecular cuando se deshidratan o congelan (Carpentery col., 1988; Carpenter y col., 1987). La segunda teoría postula que luego del proceso de secado los azúcares forman una fase continua amorfa, en la cual la movilidad molecular y las reacciones degradativas son cinéticamente insignificantes (Levine y col., 1992; Green y col., 1989; Burke, 1985).

### 1.6.2. $\beta$ -CICLODEXTRINA.

Las ciclodextrinas (CDs) son una familia de oligosacáridos cíclicos compuestos por glucopiranosas unidas entre sí mediante uniones  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Las tres CDs más comunes son aquellas formadas por 6, 7 u 8 unidades de glucosa, llamadas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, respectivamente. La Figura 1.6 muestra el esquema general de la  $\beta$ -ciclodextrina.

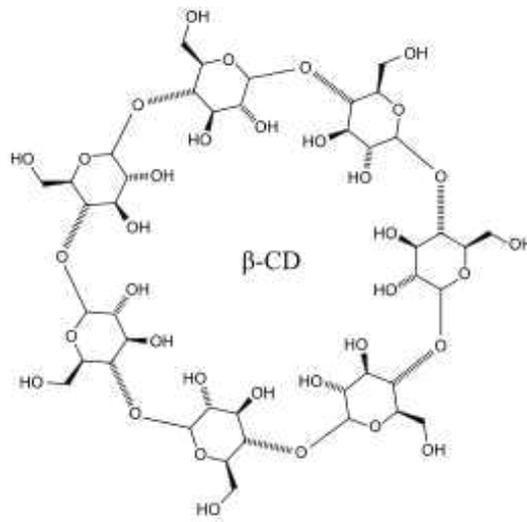


Figura 1.6. Esquema (vista superior) de la estructura de la  $\beta$ -ciclodextrina ( $C_{42}H_{70}O_{35}$ ).

Su principal característica es que presentan una cavidad central hidrofóbica y una superficie externa hidrofílica (Szejtli, 1998). Dicha cavidad les da una importancia tecnológica debido a su capacidad de formación de complejos de inclusión, modificando/alterando significativamente las propiedades de los materiales que están complejados debido a las interacciones supramoleculares que se forman entre el anfitrión (la CD) y el huésped (la molécula encapsulada).

Estudios demuestran que la inclusión de  $\beta$ -ciclodextrina como una matriz de protección de sistemas vulnerables a cambios, como pueden ser aceites, generan

beneficios que son aprovechados para conservar las propiedades químicas, físicas, nutricionales y organolépticas de la sustancia de interés. Las CDs tienen la capacidad de formar complejos de inclusión con una amplia variedad de compuestos orgánicos, que entran total o parcialmente en la cavidad relativamente hidrófoba de la ciclodextrina. Kalogeropoulos y colaboradores (2008) reportaron que la encapsulación con ciclodextrinas puede modificar drásticamente las propiedades físicas, químicas y biológicas de las moléculas encapsuladas mediante el aumento de la velocidad de disolución, la permeabilidad en membranas y la biodisponibilidad de los nutraceuticos de baja solubilidad.

### **1.6.3. HIDROCOLOIDES.**

Los hidrocoloides son polímeros de alto peso molecular solubles en agua con propiedades funcionales espesantes, gelificantes o formadores de film. En forma general, son polisacáridos o proteínas obtenidos de diferentes fuentes: plantas superiores, algas marinas, animales o síntesis microbiana. Estudios demuestran que la formación de cápsulas con hidrocoloides (alginatos, gomas y pectinas) es ampliamente utilizada para desarrollar nuevas tecnologías de preservación y conservación de sustancias derivadas de fuentes alimenticias (Santagapita y col., 2011; Krasaekoopt y col., 2004; Gibbs y col., 1999).

Una goma puede ser definida en un sentido amplio como cualquier polisacárido soluble en agua, extraíble a partir de vegetales terrestres o marinos, o de microorganismos, y que posee la capacidad en solución de incrementar la viscosidad y/o de formar geles (Fenema, 2008). Entre los más utilizados, encontramos gomas obtenidas de plantas superiores como aquellas derivadas de la celulosa, los

galactomananos, almidones y sus derivados, pectinas y exudados de plantas. En este trabajo se empleó goma arábiga, que se obtiene del exudado de plantas, y tres gomas que se obtienen a partir de su extracción del endospermo de semillas, como es el caso de la goma guar y de dos gomas autóctonas (goma espina corona y goma de vinal). Algunos de los hidrocoloides mencionados son muy utilizados en la tecnología alimentaria (Roseell y col., 2001;Garti y col., 1997) en productos de uso diario como galletas, barras de cereal, mermeladas, helados, flanes, postres infantiles, entre otros.

Algunas de las características estructurales y funcionales de los hidrocoloides empleados en la presente tesis se describirán a continuación:

#### **1.6.3.a. Pectina.**

Las pectinas son biopolímeros compuestos principalmente por una cadena lineal de 25-100 unidades de  $\alpha$ -D-galacturónico unidas por uniones  $\alpha$  (1 $\rightarrow$  4) parcialmente esterificadas con un grupo metoxilo (Endress y col., 2006). Las pectinas se encuentran en las laminillas medias de las células vegetales (Walter, 1991). Un aspecto que diferencia a las pectinas entre si es su contenido de ésteres metílicos, o grado de esterificación, que disminuye al producirse la maduración de las plantas. El grado de esterificación (GE) es definido como el porcentaje de residuos de ácido D-galacturónico esterificados sobre el total de ellos. Por otro lado, la cadena principal de ácido poligalacturónico se ve interrumpida por unidades de L-ramnosa unidas a la cadena principal por uniones  $\alpha$  (1 $\rightarrow$  2), que provocan un torcimiento en la linealidad, como se muestra en la Figura 1.7. Además, a partir de los residuos de L-ramnosa surgen las cadenas laterales neutras constituidas por D-galactosa, L-arabinosa y L-fucosa, siendo esta última la unidad terminal. También puede tener unidos otros azúcares pero en

menor proporción, como D-xilosa, D-glucosa, D-manosa y D-apiosa, formando cadenas laterales de una única unidad. Se comprobó mediante técnicas de degradación química o enzimática que estos residuos no están homogéneamente distribuidos a lo largo de la cadena pectínica. Existen zonas preponderantemente lineales de poli-galacturónico y las llamadas zonas tipo pelo, donde están presentes en bloque las cadenas ricas en azúcares neutros (Endress y col., 2006).

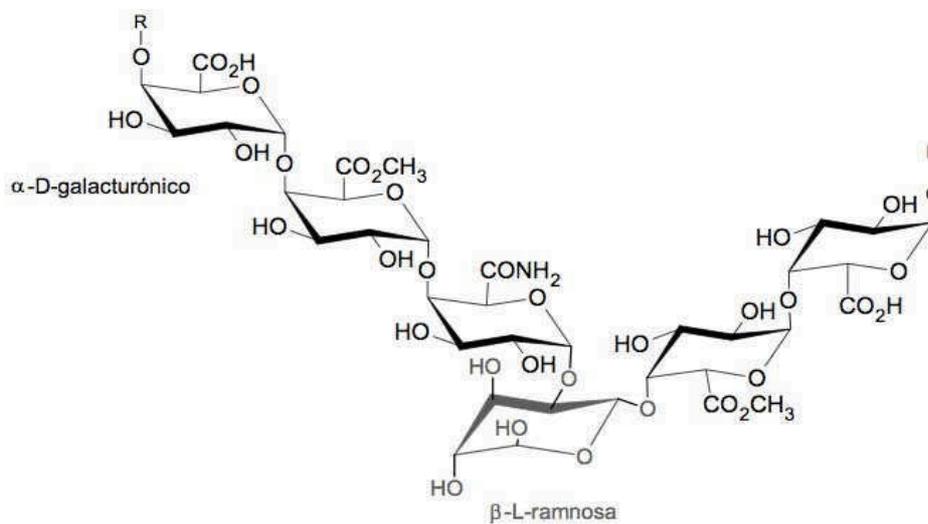


Figura 1.7. Esquema de la estructura de la pectina. En la cadena principal se muestran algunos de los residuos  $\alpha$ -D-galacturónicos parcialmente esterificados y/o aminorados. La  $\beta$ -L-ramnosa (indicada en gris) provoca un claro torcimiento en la estructura de la cadena principal. Las cadenas laterales no se muestran para simplificar el esquema. Los residuos indicados con R indican que continúa la cadena principal. Adaptado de Santagapita (2010).

Entre las características más relevantes para esta tesis se encuentra su capacidad para formar geles, que depende de su estructura y del grado de metoxilación. Las pectinas de alto metoxilo (mayor que el 50 %) requieren más de 60 % de sólidos y pH menores a 3,5 para formar geles que son irreversibles por calor. En cambio, las de bajo metoxilo (menor que el 50 %) forman geles cuando se encuentran en concentraciones de 0,5-1,5 % y requieren Ca<sup>2+</sup> para gelar, ya que actúan como polielectrolitos aniónicos, pudiendo formar geles estables en ausencia de azúcares, y además pueden

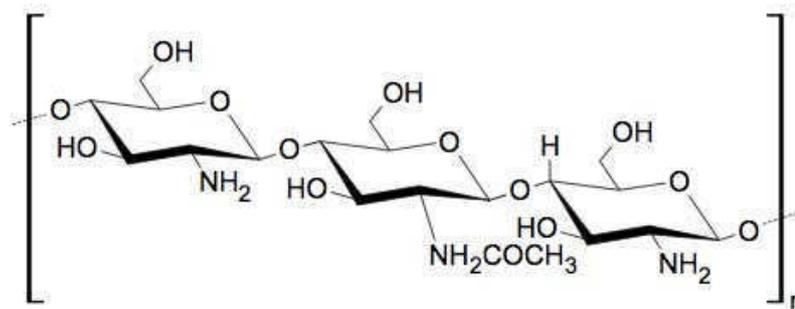
dar geles reversibles por calor entre 25- 35 % de sólidos. La amidación de los grupos metoxilos se produce al tratar las pectinas de alto metoxilo con amoníaco, para obtener pectinas de bajo metoxilo. Las pectinas de interés en este trabajo son las de bajo metoxilo, ya que permiten generar cápsulas por el mismo mecanismo de gelificación descrito para el alginato en la Figura 1.4. Durante la demetoxilación de la pectina de alto metoxilo se generan bloques de carboxilos libres, que quedan disponibles para interactuar con iones  $\text{Ca}^{2+}$  u otros cationes bivalentes (Endress y col., 2006). El grado de amidación permite regular tanto la velocidad de gelificación como la rigidez del gel. Geles de este tipo se producen en mermeladas y productos similares libres de azúcar o con baja concentración del mismo. Además, se sabe que los geles producidos por pectina de bajo metoxilo son menos sensibles a los cambios de pH que los geles de pectina normales (Novosel'skaya y col., 2000).

La masa molar de las pectinas oscila entre los 60 y 120 kDa según mediciones realizadas por GPC (Endress y col., 2006), aunque debido a la fuente de obtención y a la agregación se encuentran en bibliografía valores desde 40 hasta  $4 \cdot 10^3$  kDa. (Santagapita, 2010). Por otro lado, y en forma similar a lo descrito para alginato, el punto isoeléctrico de la pectina se encuentra alrededor de 3,5 (Kim y col., 2003).

#### **1.6.3.b. Quitosano.**

El quitosano es un polisacárido lineal cuya principal fuente industrial es el caparazón de crustáceos (camarón, langosta y cangrejo) y el exoesqueleto de los insectos, además sustituye a la celulosa en muchas especies de plantas inferiores, por ejemplo, hongos, levaduras y algas (rojas, verdes y marrones) (Izydorczyk, 2005), Se obtiene a

partir de la desacetilación de la quitina (Domard y col, 1983), y es un copolímero de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidas por uniones  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 1.8).



*Figura 1.8. Representación de la estructura química del quitosano. Se muestra un residuo de  $\beta$ -D-glucosamina aún acetilado debido que la desacetilación de la quitina no es completa. Apadtado de Santagapita (2010).*

El quitosano tiene propiedades biológicas únicas tales como: es antimicrobiano, anticolesterolémico, biocompatible y biodegradable, además de producir efectos relacionados con la permeabilidad en membranas (Qiu y col., 2001; Anthonsen y col.,1993; Wang y col., 1991; Nigmatullin y col., 1967). El grado de acetilación (G.A.) representa la proporción de unidades N-acetil-D-glucosaminas respecto al número total de unidades, y es el que permite diferenciar entre la quitina y el quitosano. En el caso de los quitosanos, el G.A. debe encontrarse por debajo del 50 %. Este valor determinará además el límite de solubilidad de este polímero en soluciones diluidas de ácido acético ( $2 < \text{pH} < 6$ ).

La erosión de las cápsulas de geles de alginato ha surgido como un problema importante ya que acelera la liberación de la sustancia encapsulada (Murata y col., 1993). Para suprimir este fenómeno, algunos autores estudiaron la incorporación de quitosano, de polímeros modificados o proteínas a la formulación (Santagapita y col., 2012; Deladino y col., 2008; Han y col., 2008; Illum, 1998; Polk y col., 1994; Murata y

col., 1993; Chandy y Sharma, 1990 y 1991). Un sistema de encapsulación ideal debe reducir la reactividad de la sustancia activa con el medio, proveer máxima estabilidad al pH, humedad y temperatura (Han y col., 2008). Debido a su estructura, el quitosano se comporta como un polielectrolito catiónico y posee su punto isoeléctrico alrededor de 6,3 (Mi y col., 1997). Por lo tanto, la reacción directa entre el alginato y el quitosano forma cápsulas con una membrana de biopolímero que posee cierta porosidad y resistencia mecánica (Deladino y col., 2008; Rha y col., 1988). El uso de cápsulas de pectina cubiertas con quitosano en estudios de liberación de albúmina demostró que su liberación es dependiente de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  empleada, del PM del quitosano y su pH, así como el pH al cual se realiza la liberación de la proteína, siendo este último el parámetro más influyente (Kim y col., 2003).

#### **1.6.3.c. Goma Guar.**

La goma guar o guarano es el polisacárido de reserva nutricional de las semillas de *Cyamopsis tetragonoloba*, una planta de la familia de las leguminosas. Es un galactomanano formado por un esqueleto básico de unidades manosa unidas  $\beta$  (1-4), con unidades de galactosa unidas en  $\alpha$  (1-6) cada 2 de ellas (Goldstein, 1973), por lo tanto posee una relación manosa/galactosa de 2:1. La molécula de goma guar es un polímero lineal con peso molecular aproximado de 220,000 daltons (Figura 1.9).

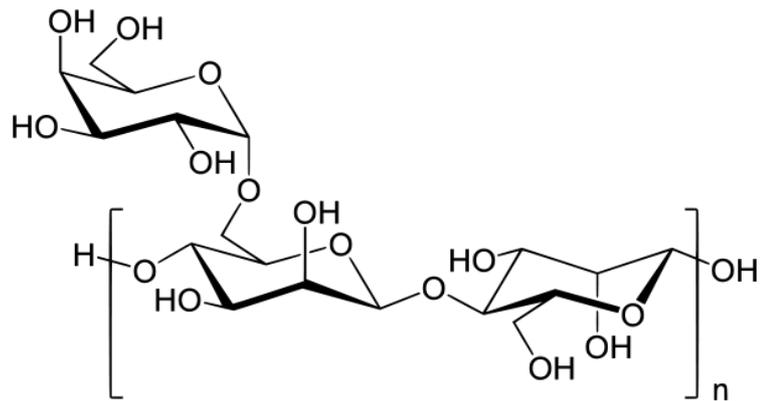


Figura 1.9. Esquema de la estructura de goma guar, que consiste en (1 → 4)-β-D-manopiranosilos con unidades de cadenas laterales de α-D-galactopiranosilos unidas (1 → 6). Adaptado de Whan, 2009.

Estudios demuestran que las uniones de polímeros en mezclas de emulsiones para formar cápsulas presentan una ventaja para el compuesto al que protegen, ya que no sólo presentan una estructura mas rígida, sino al mismo tiempo protegen al compuesto de la difusión (Ipsita y col., 2005).

#### 1.6.3.d. Goma Arabiga.

Químicamente, la goma arábica es una mezcla compleja de macromoléculas de diferente tamaño y composición (principalmente hidratos de carbono y proteínas). En la industria de los alimentos, es utilizada como un estabilizador, un espesante y/o un agente emulsionante (como por ejemplo en jarabe de bebidas, caramelos gomosos y cremas) (Verbeken y col., 2003).

Muchas investigaciones se han realizado en los últimos años para revelar la estructura molecular de la goma y relacionarla con sus propiedades tensio-activas y reológicas excepcionales. Muchos investigadores indican que la goma arábica es un heteroglicano complejo con peso molecular de 250-1.000 kDa que consiste principalmente en tres fracciones (Figura 1.10): (1) La principal es un polisacárido

altamente ramificado ( $PM = 3 \times 10^5$ ) de poli- $\beta$ -D-galactosas unidas mediante enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) con ramificaciones de L-arabinosa y L-ramnosa, que terminan en ácido gulurónico (en la naturaleza se encuentran las sales de estos con magnesio, potasio, y calcio); (2) Una fracción menor ( $\sim 10$  % de su peso total) que es de un peso molecular más alto ( $\sim 1 \times 10^6$  g/mol) con complejo de proteína arabino-galactano en el cual las cadenas de arabinogalactano se unen covalentemente a una cadena de proteína a través de serina e hidroxiprolina. El arabinogalactano unido en el complejo contiene  $\sim 13$ % (por mol) de ácido gulurónico; (3) La fracción más pequeña ( $\sim 1$ % del total) que tiene el más alto contenido de proteína ( $\sim 50$ % en peso) es una glucoproteína que difiere en su composición aminoacídica de la del complejo indicado en 2) (Dror y col., 2006).

Esta goma se disuelve fácilmente en agua (hasta 50% p/v) para dar soluciones de baja viscosidad; esto le confiere una característica que la hace única entre las gomas alimenticias. La estructura molecular altamente ramificada y relativamente de bajo peso molecular de la cadena principal de este polímero son responsables de estas propiedades (Glicksman, M, 1983).

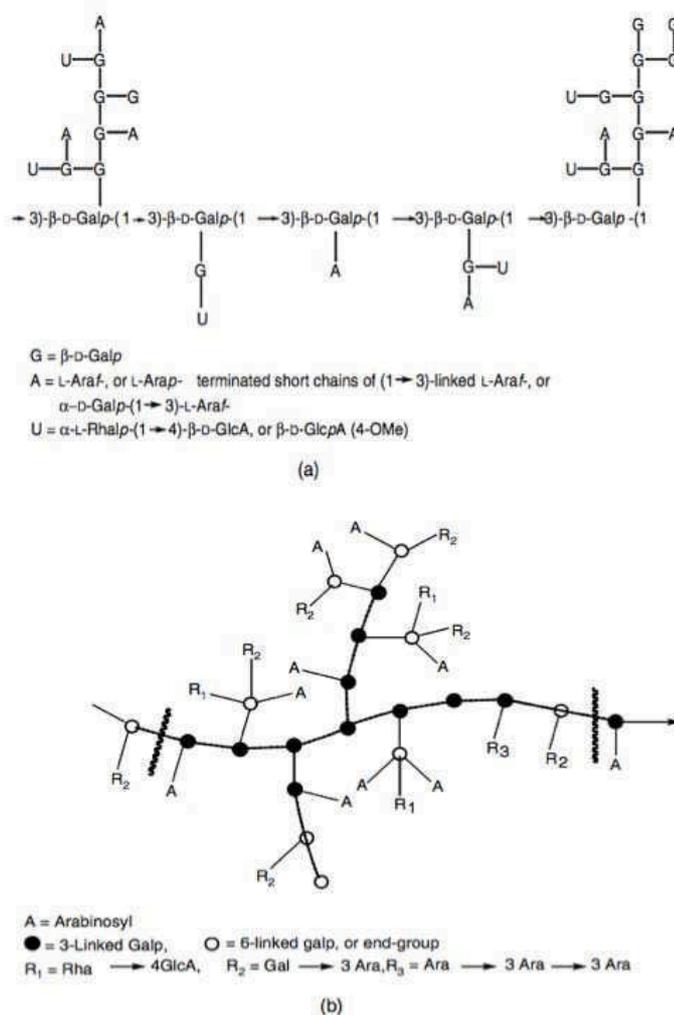


Figura 1.10. Estructura parcial propuesta para goma arábiga. La cadena principal de este polisacárido poli- $\beta$ -D-galactosas unidas mediante enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) con ramificaciones de L-arabinosa y L-ramnosa, que terminan en ácido gulurónico. Ramificaciones laterales pueden contener  $\alpha$ -L-ramnopiranososa, ácido  $\beta$ -D-glucurónico,  $\beta$ -D-galactopiranososa, y las unidades de  $\alpha$ -L-arabino-furanosilo con (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4), y (1 $\rightarrow$ 6) glucosídicos. Adaptado de Draget, 2000 e Izydorczyk, 2005.

### 1.6.3.e. Goma Vinal.

La goma de vinal es un “galactomano” obtenido a partir de semillas de *Prosopis ruscifolia*, proveniente del noreste argentino (provincias de Chaco, Formosa y partes de Salta, Santiago del Estero y Santa Fe), que se muestran en la Figura 1.11. Aunque su estructura no está definida aún, siendo que está en proceso de investigación (Busch y col., 2012), se han señalado aplicaciones de gomas provenientes de semillas del

mismo género atribuyéndole capacidad como agentes encapsulantes (Beristain y col., 2001) y algunas propiedades reológicas interesantes (Oliva, 2010), que la hacen un atractivo sustituyente de gomas de importación como la goma guar (Freyre y col., 2003). El vinal presenta además un alto contenido de antioxidantes (Cardozo y col., 2010; Bush y col., 2011), y alto contenido de ácidos grasos insaturados (Freyre y col., 2003). Análisis calorimétricos muestran similitudes en sus propiedades térmicas con la goma guar (Busch y col., 2012). También se ha utilizado otras partes de los frutos vinal en manufacturación de galletas, debido al valor nutricional de sus proteínas y al contenido de fibra dietaria (Escobar y col., 2009).



Figura 1.11. Imagen de vainas (fruto) conteniendo las semillas de *Prosopis ruscifolia*.

#### 1.6.3.f. Goma Espina Corona.

La goma espina corona es un galactomanano obtenido a partir de la trituración del endospermo de semillas de espina corona (*Gleditsia amorphoides*), que crece en Argentina, Brasil y Paraguay. Una planta típica de *Gleditsia amorphoides*, sus frutos y las espinas que le dan nombre se muestran en la Figura 1.12. Tiene una estructura de galactomanano con un 28,6% de D-galactosa y 71,4% de D-manosa formando una cadena lineal de unidades (1→4)  $\beta$ -manopiranosicas con unión en posición 6 de una

molécula de D-galactopiranosas, cada tres unidades de manosa, con una relación manosa/galactosa de 2,5 (Perduca y col., 2011). Es un biopolímero no gelificante que otorga alta viscosidad a soluciones acuosas, y es relativamente estable frente a variaciones en el pH, fuerza iónica y temperatura. La goma espina corona se dispersa e hidrata casi completamente en agua fría y completamente en agua caliente, formando dispersiones muy viscosas. Es insoluble en solventes orgánicos. El contenido de proteínas en la goma espina corona es bajo (alrededor de un 4% en la harina, que se reduce a un 2% luego de su resuspensión), así como también es bajo el contenido de fibra y grasas (menores al 1%) (Perduca y col., 2013). La composición de espina corona juega un papel importante en su comportamiento y propiedades reológicas puesto que ambas dependen del método de obtención de la goma misma (Azero y col., 2002).



*Figura 1.12. Imágenes de Gleditsia amorphoides, comúnmente conocida como espina corona, mostrando los frutos (vainas) conteniendo las semillas de las que se obtiene la goma (a) y las espinas características que le dan nombre (b).*

De acuerdo a la descripción del Código Alimentario Argentino, en su artículo 1368, inciso 73, la goma espina corona está calificada como espesante y estabilizante, definida como un "polvo blanco ligeramente amarillento, que gelifica fácilmente en agua caliente, formado por galactomananos. Se obtiene por molienda de los

endospermos (libre de germen y de cáscara o tegumento) de la semilla del árbol *Gleditsia amorphoides*". Es posible utilizarla en la industria de dulces y jaleas, industria de helados, industria de fiambres y productos cárnicos, industria farmacéutica y cosmética, industria láctea, industria de pasta y emulsiones alimenticias.

## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

Los **objetivos generales** del presente trabajo de tesis fueron:

- Estudiar la estabilidad de un extracto de licopeno obtenido de fuentes naturales no convencionales a partir de su encapsulación en cápsulas de polielectrolitos sometidas a procesos de congelación y deshidratación.
- Estudiar los efectos del método de extracción del licopeno y de la composición de las cápsulas sobre las propiedades fisicoquímicas de la matriz y sobre la estabilidad del licopeno encapsulado, buscando establecer vínculos de estructura/función relacionados a la estabilidad.

Los **objetivos específicos** fueron:

- Extraer el licopeno de fuentes naturales de fuentes no convencionales, tal como el pomelo rosado, utilizando métodos libres de solventes orgánicos.
- Establecer una matriz estable para encapsular el licopeno en cápsulas de polielectrolitos con aditivos (trehalosa y biopolímeros) que incrementen su protección y su estabilidad.
- Estudiar la influencia de los procesos de deshidratación (al vacío y liofilización) y congelación en cápsulas de licopeno. Realizar un análisis cinético de la estabilidad y concentración del licopeno encapsulado, utilizando técnicas espectrofotométricas.
- Evaluar la liberación del extracto de licopeno en medio líquido, estudiando la influencia de la composición de las cápsulas.

- Establecer relaciones estructura/función relacionadas a la estabilidad del licopeno a través del estudio de diferentes propiedades fisicoquímicas de los sistemas.

La **hipótesis de trabajo** se basa en que la utilización de cápsulas de alginato es una estrategia válida de preservación de las propiedades funcionales de biomoléculas frente a diferentes tipos de estrés (congelación, deshidratación y tratamiento térmico). Su característica de comportarse como polielectrolito ofrece la posibilidad de generar interacciones electrostáticas que permiten preparar coberturas de más de una capa con otros biopolímeros con cargas opuestas. Se sabe además que la adición de polisacáridos y azúcares a las cápsulas de polielectrolitos posee efectos positivos en la estabilización de biomoléculas, así como sobre las propiedades de liberación de éstas.

# **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. MATERIALES.

Se eligió el pomelo rosado (*Citrus paradisi*, variedad Red, proveniente de Jujuy, Argentina) como fuente rica en licopeno de producción nacional. Todas las frutas empleadas fueron obtenidas en el mercado local a partir de un mismo lote, se seleccionaron (frutos libres de marcas o daño), se almacenaron a temperatura ambiente y posteriormente fueron procesadas para su utilización.

#### 3.1.1. PREPARACIÓN DE LA FRUTA.

Como paso inicial se escogieron 5 sistemas para determinar cuál es la mejor matriz de extracción de licopeno, desde el punto de vista del contenido así como de la estabilización. Los cinco sistemas estudiados fueron:

1. Jugo de pomelo: se extrajo el jugo de 2 pomelos con un extractor (Panasonic Corporation, Newark, NJ, Estados Unidos de América).
2. Jugo de pomelo liofilizado: a partir del jugo de pomelo extraído, este fue congelado a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 24 hs para luego ser liofilizado por 48 hs.\*\*
3. Rodajas de pomelo liofilizadas: se lavaron y cortaron 2 pomelos en rodajas de 1 cm de espesor, que fueron congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 24 hs y luego liofilizadas por 48 hs.\*\*
4. Pulpa de pomelo: se procesó la pulpa de 2 pomelos lavados y pelados durante 15 min con una minipimer (modelo HR1372, Philips

Argentina, Buenos Aires, Argentina).

5. Pulpa de pomelo liofilizada: luego de obtener la pulpa de pomelo, ésta fue congelada a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 24 hs para luego ser liofilizada por 48 hs.\*\*

\*\*En todos los casos se utilizó un liofilizador modelo ALPHA 1-4 LD2 (Martin ChristGefriertrocknungsanlagen GMBH, Alemania), el cual opera a una temperatura de  $-56^{\circ}\text{C}$  y una presión de 0,04 mbar.

En estos sistemas se determinó la concentración de licopeno y se evaluó su estructura fina a través del análisis de espectros UV/Vis, de modo tal de estudiar el contenido y su estabilidad.

### **3.1.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO.**

Dado que el licopeno es un compuesto lipofílico, se utilizó esta característica como herramienta para extraerlo de su fuente alimenticia. De acuerdo a la patente ES 2 183 471 T3 (2001), un método conveniente para su extracción es el uso de un aceite comestible. En este caso, el aceite usado fue aceite extra virgen de oliva (Molino Cañuelas SACIFIA, Mendoza, Argentina) dando como resultado un extracto rico en licopeno, libre de disolventes orgánicos, que posteriormente fue encapsulado. El aceite de oliva facilita el proceso de transferencia de licopeno de una fase a la otra. En este caso, la transferencia de masa depende principalmente de la eficiencia lograda en el grado de dispersión (del licopeno en el aceite), la ruptura de la estructura celular y la solubilidad de licopeno en el lípido extractante. De acuerdo con esto el procedimiento explicado en la Tabla 3.1 especifica los pasos para obtener el extracto rico en licopeno.

Tabla 3.1. Procedimiento para extracción de licopeno adaptado de patente ES 2 183 471 T3 (2001).

Procedimiento de extracción de licopeno.	
a	Se mezcló la fuente de licopeno seleccionada (pulpa de pomelo rosado liofilizada) con el aceite de oliva en proporción 1:2 a 25 °C mediante agitación a velocidad elevada en una minipimer (5000 rpm) cuidando que no haya aumentos significativos en la temperatura, que ocasionarían una pérdida de licopeno debido a una posible isomerización o degradación del mismo (Padula y col., 1987). El procedimiento se realizó en oscuridad, cubriendo el recipiente con papel aluminio, para evitar la oxidación.
b	Se agitó por un tiempo total de 15 min para lograr un mezclado completo. Se utilizaron intervalos de agitación para evitar el aumento de temperatura, agitando durante 5 min y dejando enfriar por 1-2 min.
c	Separación de fases: se empleó un procedimiento mecánico. Con una centrifuga eppendorf 5804 (Eppendorf AG. Hamburgo, Alemania) a una velocidad de 5000 rpm por 10 min. Se separó la fase del sobrenadante en un tubo de centrifuga de 50 mL cubierto con aluminio (para mantener al licopeno fuera de contacto con la luz) y se mantuvo refrigerado a 5°C hasta su posterior utilización.

### 3.1.3. ELECCIÓN DE LOS AGENTES ENCAPSULANTES.

Se eligieron como agentes encapsulantes azúcares, biopolímeros y gomas de grado alimenticio, cuyas características se describen a continuación:

☞ Alginato de sodio, Algogel 5540. Cargill S.A. (San Isidro, Bs. As., Argentina). PM =  $1,97 \cdot 10^5$  g/mol, con relación manuronato/guluronato = 0,6.

☞ D-trehalosa dihidrato ( $\alpha$ -D-trehalosa) (T), (Hayashibara Co, Ltd., Shimoishii, Okayama, Japón/ Cargill Inc., Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos de América), PM = 378 g/mol.

☞ Pectina de bajo metoxilo (LM), Degusta Meath & Nutrition Argentina S.A. (San Isidro, Bs. As. Argentina). Grado de esterificación: entre 26 y 31 %.

Grado de amidación: entre 16 y 19 %.

☞ Goma Guar (Cordis S.A. Villa Luzuriaga, Buenos Aires, Argentina)

PM~220.000 g/mol.

☞ Goma Arábica (Biopack, Zárate, Buenos Aires, Argentina)

PM~250.000 g/mol, Pureza: 99%.

☞ Goma Vinal. Goma obtenida de semillas de *Prosopis ruscifolia* a partir de una extracción neutra, posterior precipitado en alcohol y liofilización (Busch y col., 2012).

☞ Goma Espina Corona. Idea Supply Argentina S.A. (Chaco, Argentina). Composición porcentual aproximada: humedad: 0,04 g/100 g, cenizas: 1,44 g/100 g, grasa: 0,27 g/100 g, proteína: 2,17 g/100 g, fibra cruda: 0,70 g/100 g y 85,38 g/100 g de polisacáridos (Perduca y col., 2013).

☞  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), Amaizo American Maize-Products Co. (Hammond, IN, Estados Unidos de América), PM = 1185 g/mol.

☞ Quitosano, peso molecular medio. Viscosidad: 200-800 cP, 1 %p/v en 1% de ácido acético (25 °C, Brookfield); grado de desacetilación: 75-85%. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania).

Luego de tener el extracto rico en licopeno se realizó una emulsión con los agentes encapsulantes. Los sistemas elegidos para la preparación de la emulsión inicial se muestran en la Tabla 3.2 (columna izquierda, rosa). Todas las soluciones (azúcares o biopolímeros) se dejaron en agitación constante hasta su completa disolución hasta por 12 hs. Las emulsiones fueron preparadas en un Ultra-turrax T18B (IKA®-Werke GMBH & CO.KG, Staufen, Alemania) a 15.500 rpm (velocidad 4) por un tiempo de 10 min con intervalos de 5 min y 1 min de reposo, para evitar el calentamiento de la

emulsión. La punta de dispersión utilizada fue la S18N-10G, con un diámetro de rotor 7,5 mm, obteniendo según el fabricante una finura final en las emulsiones entre 1-10  $\mu\text{m}$  (IKA, 2013). El extracto se emulsificó junto con el biopolímero correspondiente en una relación en masa 1:2. Como control, se prepararon mediante el mismo procedimiento emulsiones de las mismas características pero a partir del aceite de oliva, que no contenía el extracto rico en licopeno.

Tabla 3.2. Composición de las emulsiones preparadas a partir de las soluciones conteniendo alginato y extracto en proporción 2:1, posteriormente utilizadas como solución para la preparación de cápsulas, y medio externo utilizado para la gelación de las cápsulas. Se indica la nomenclatura empleada en la tesis para las cápsulas obtenidas.

<b>CÁPSULAS</b>						
<b>EMULSIÓN INICIAL DE GOTEO</b>			<b>MEDIO EXTERNO</b>			<b>SISTEMA</b>
<i>Solución inicial de agente encapsulante: extracto de licopeno (2:1)</i>						
Alginato 1% (p/v)	Trehalosa 20% (p/v)	Biopolímero 0,25% (p/v)	CaCl <sub>2</sub> 2,5% (p/v)	Trehalosa 20% (p/v)	Otro	
X			X			A
X	X		X	X		A-T
X	X		X	X	Quitosano (0,5% p/v)	A-TQ
X	X		X	X	$\beta$ -ciclodextrina (1,5%) (p/v)	A-TB
X	X	Pectina	X	X		AP-T
X	X	Goma Guar	X	X		AGG-T
X	X	Goma Arábica	X	X		AGA-T
X	X	Goma Vinal	X	X		AGV-T
X	X	Goma Espina corona	X	X		AEC-T

### 3.1.4. PREPARACIÓN DE LAS CÁPSULAS.

Las cápsulas fueron preparadas de acuerdo al método del goteo descrito en numerosos trabajos (Eng-Seng Chan, 2011, Santagapita y col., 2012, Santagapita y col., 2011, sólo por citar algunos) realizando algunas modificaciones. El esquema utilizado para la elaboración de las cápsulas puede verse en la Figura 3.1.

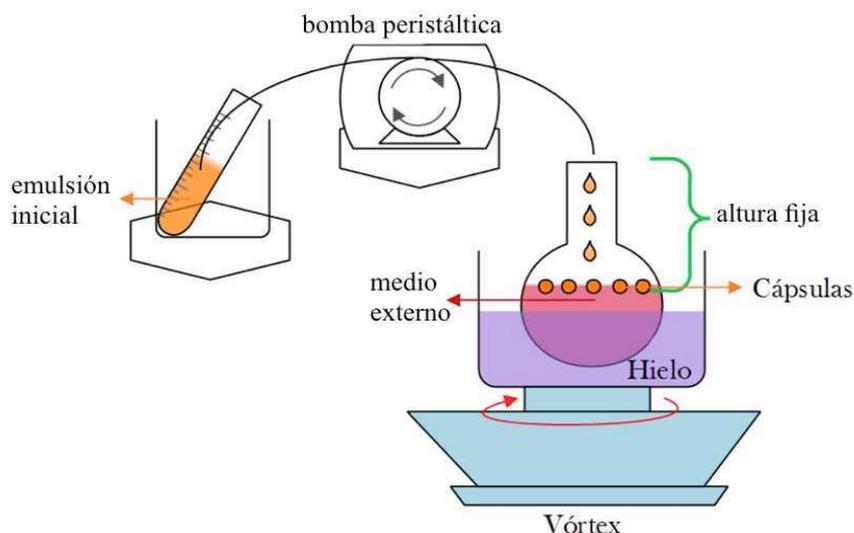


Figura 3.1. Diagrama para elaboración de cápsulas de polielectrolitos. El detalle de la composición de la emulsión inicial y el medio externo se encuentran en Tabla 3.2.

El goteo de 10 mL de la solución de la emulsión inicial (preparadas según se indicó en Tabla 3.2) se realizó mediante una bomba peristáltica modelo BT50-1J con cabezal JY10 (Boading Longer Precision Pump Co, Ltd, China), siempre con agitación constante. Se utilizó un tip estándar para pipeta de 0,1-10  $\mu\text{L}$  (0,35 mm de diámetro) conectado a una manguera de silicona de 1 mm de diámetro interno (3 mm externo) sobre 100 mL de solución externa, descrita en la Tabla 3.2 para cada uno de los tipos de cápsulas realizados. Todas las soluciones externas empleadas contenían cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 2,5 % p/v (Cicarelli S.A., Argentina). Las condiciones de generación de las cápsulas fueron las siguientes: distancia entre punta-solución: 6 cm; velocidad de generación  $9,0 \pm 0,1$  rpm; agitación en vortex a una velocidad de referencia de 2; tiempo generación: alrededor de 45 min, dejando un mínimo de 15 min a partir de la caída de la última cápsula. Se utilizó este tiempo por referencia de Deladino y coautores (2008), para asegurar la máxima dureza de las cápsulas. La velocidad de goteo (9,0 rpm) se fijó como la velocidad máxima posible en este sistema que permite que caiga una

gota sin superponerse con la siguiente (es decir, antes de generarse un flujo continuo). Una vez elaboradas las cápsulas se filtraron y se realizaron 3 lavados con agua bidestilada; una vez filtrada el agua, se secó el agua superficial con un papel de filtro, almacenándose en tubos falcón en refrigeración. La nomenclatura para los 9 sistemas de cápsulas obtenidos conteniendo licopeno se muestra en la Tabla 3.2.

Además, se realizaron controles de cada uno de los sistemas de cápsulas utilizando el extracto de aceite libre de licopeno.

Como fue mencionado en el caso de las emulsiones, también todas las soluciones utilizadas como medio externo permanecieron en agitación constante hasta su completa disolución. Para el caso particular de la solución de quitosano, además de evitar formación de grumos, mediante una lenta adición manteniendo agitación constante, se debió adicionar ácido acético 3% (primero se agregó un 1%, hasta llegar a 3% final si es necesario), dejando hasta por 12 hs para asegurar la completa solubilización del mismo.

### **3.1.5. TRATAMIENTOS.**

#### **3.1.5.a. Congelación de cápsulas.**

El congelado de cápsulas fue realizado por 2 métodos: a) ciclos de tiempo corto; b) tratamiento térmico continuo.

##### ***3.1.5.a.i. Ciclos de congelado.***

Se realizaron ciclos de congelado con nitrógeno líquido (-196°C), que consistieron en agregar el nitrógeno sobre las cápsulas previamente pesadas, por

triplicado, dejarlas por 1 min en el nitrógeno y permitir que se descongelaran por 30 min aproximadamente; este procedimiento se realizó 4 veces para cada sistema (tanto cápsulas de muestra como cápsulas control, por triplicado).

#### **3.1.5.a.ii. Tratamiento continuo.**

Cápsulas previamente pesadas por triplicado (muestras y blancos) se dejaron en un *freezer* convencional (-18°C) por un mes para determinar el efecto del congelado en la concentración y estado del licopeno.

#### **3.1.5.b. Deshidratación de cápsulas.**

La deshidratación de cápsulas fue realizada por 2 métodos: a) secado en estufa de vacío a 25 °C durante 2 días a una presión de 113,25 mbar (corresponde a 900 mbar en el vacuómetro) en estufa Fistreem Vacuum Oven (Fistreem International Ltd, Loughborough, Reino Unido); b) liofilización durante 2 días en el mismo liofilizador antes mencionado, con previo congelado a -18°C en *freezer* convencional durante 24 hs. Las cápsulas se colocaron en cajas de Petri (aproximadamente 100 cápsulas del sistema dispuestas en capa fina) para asegurar la correcta deshidratación de las mismas.

### **3.2. MÉTODOS.**

#### **3.2.1. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO.**

Se utilizó un espectrofotómetro Jasco V-630 UV-VIS (JASCO Inc., Maryland, Estados Unidos de América) para determinar la concentración de licopeno presente en cada uno de los sistemas estudiados (matrices de pomelo, extractos, emulsiones y cápsulas) así como para cada uno de los tratamientos aplicados a las cápsulas. El

esquema utilizado para la extracción del licopeno y su posterior medición se adaptó de Fish y col. (2002) y se muestra en el Esquema 3.1.



Esquema 3.1. Diagrama para determinación espectrofotométrica de licopeno. Adaptado de Fish y col., 2002.

Una vez obtenido el espectro, se corrigió la línea de base en los casos que fuera necesario (programa Spectra Manager (JASCO Inc.)), y de acuerdo con lo reportado por varios autores (Fish y col., 2002, Hyman y col., 2004) se utilizó la ley de Lambert-Beer para obtener la concentración de un cromóforo en solución. Para los cálculos de contenido de licopeno se utilizó el coeficiente de extinción molar ( $17,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Britton, 1995) y el peso molecular del licopeno (536,9 g/mol). Para las cápsulas, los valores de absorbancia obtenidos fueron corregidos por los espectros control (cápsulas sin licopeno). Los valores se expresan en contenido de licopeno por gramo de muestra en base seca.

En muchos casos, se estudió el contenido de licopeno remanente, que representa el contenido de licopeno para cada sistema (en  $\mu\text{g}$  de licopeno/ g de muestra en base seca) antes de un determinado tratamiento ( $L_0$ ) respecto al contenido de licopeno en el mismo sistema (en  $\mu\text{g}$  de licopeno/ g de muestra en base seca) para dicho tratamiento ( $L$ ) (ya sea respecto al extracto rico en licopeno o las cápsulas a tiempo cero, según se indique en la Figura), y el contenido de licopeno remanente fue expresado en porcentaje

según la relación Licopeno remanente =  $100 * (L/L_0)$ . Todas las muestras se midieron por triplicado.

### **3.2.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR). MEDICIONES POR REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (ATR).**

Se utilizó esta técnica para la determinación de la presencia de los aditivos utilizados y posibles interacciones entre estos en las cápsulas de polielectrolitos. Las mediciones fueron realizadas en un espectrómetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR (Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos de América) con cristal de ZnSe y diamante de única reflexión, con ángulo de 45°. Se utilizó este accesorio debido a que las cápsulas (2) fueron colocadas directamente en el mismo, sin necesidad de preparación de muestra previa, obteniendo una muy buena relación señal/ruido. Los espectros fueron adquiridos en el modo reflexión entre 675 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , adquiriendo 32 scans como promedio con resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Cada sistema se midió por triplicado.

El análisis espectral fue realizado usando el programa Spectrum versión 6.3.5 (Perkin Elmer, Inc.); en este caso, la región de la “huella digital” (*finger printing*), que se extiende desde los 400 hasta los 1500  $\text{cm}^{-1}$ , muestra las bandas correspondientes a cada uno de los excipientes estudiados y es aquella que se estudiará con más atención. Las muestras utilizadas corresponden a las cápsulas deshidratadas por liofilización y secado al vacío, al igual que los biopolímeros correspondientes obtenidos por liofilización (a partir de soluciones al 1% p/v) para la elaboración de cada sistema de cápsulas.

Se utilizó una punta plana para oprimir la muestra (sin control de presión), de forma tal de tener un contacto íntimo entre muestra y cristal, mejorando la relación señal/ruido obtenida. Se adquirió un espectro *background* en aire (sin muestra) previo a la medición de cada sistema.

Todos los espectros fueron procesados post adquisición del mismo modo. Dado que el cristal utilizado muestra una región de muy alta absorción (alrededor del 95% de la luz incidente) entre 1800 y 2500  $\text{cm}^{-1}$ , ésta fue substraída en todos los casos. Se corrigió la línea de base y los espectros se normalizaron entre 0 y 1 utilizando el programa Prismv5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos de América) para la presentación en las Figuras. Los números de onda de los picos se obtuvieron a partir del programa.

Para la correcta obtención del espectro de la muestra de licopeno obtenida de pulpa con hexano es crítica la formación de un film sobre el cristal de ZnSe luego de la evaporación del solvente, de forma tal de obtener un espectro reproducible y sin la contribución de las bandas del hexano.

### **3.2.3. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE BAJO**

#### **CAMPO (*LF-NMR*).**

Se utilizó la técnica de resonancia magnética nuclear de bajo campo (*LF-NMR*) resuelta en el tiempo con el objetivo de estimar, tanto en muestras húmedas como deshidratadas, la movilidad molecular de los protones (de los sólidos y del agua) de las muestras.

Para todas las determinaciones se empleó un equipo Bruker Minispec mq20 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania), con un campo magnético operando a 0,47 T a una frecuencia de resonancia de 20 MHz.

Las muestras se colocaron en tubos específicos provistos por el proveedor (Bruker Biospin GmbH) de 10 mm de diámetro externo y 20 cm de altura, con la ayuda de un sacabocado, hasta una altura de 1 cm aproximadamente, tratando que las paredes del tubo no fueran tocadas por la muestra, de forma tal que las muestras no excedan la región activa de la bobina de radiofrecuencia. Las muestras fueron equilibradas a  $25,00 \pm 0,01$  °C en un baño térmico (Haake, modelo Phoenix II C35P, Termo Electrón Corporation GmbH, Karlsruhe, Alemania). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

La movilidad de los protones y el coeficiente de difusión se evaluaron a través de diferentes ensayos que poseen secuencias de pulsos específicas. Además, se monitoreó el grado de avance de la cristalización de agua y aceite a diferentes temperaturas. Todas las secuencias empleadas se describirán a continuación.

### **3.2.3.a. Tiempos de relajación espín-espín ( $T_2$ ).**

Se evaluaron los  $T_2$  en las muestras de cápsulas húmedas y deshidratadas con y sin licopeno a través de la secuencia Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) (Carr y Purcell, 1954; Meiboom y Gill, 1958), que consiste en los siguientes pulsos:  $90^\circ_x\text{-}\tau\text{-}[180^\circ_y\text{-}\tau\text{-echo-}\tau]_n$ . Se utilizaron los siguientes parámetros para las mediciones:  $\tau = 1$  ms, scans = 4, tiempo de reciclado entre scans = 2 s; número de puntos = 600, ganancia = 81 dB; ciclado de fases. El *update* automático de los parámetros de medición (ángulos de

detección, duraciones de pulsos, etc) se realizó con una muestra representativa del grupo (cápsulas de alginato-trehalosa conteniendo licopeno, A-T). Los datos obtenidos se ajustaron mediante una función bi-exponencial, que se muestra en la ecuación 3.1, a partir de la cual se obtuvo dos valores de  $T_2$  con sus respectivas amplitudes. Las mediciones se realizaron a 25°C.

$$y = A_{21} * e^{-\frac{x}{\tau_{21}}} + A_{22} * e^{-\frac{x}{\tau_{22}}} + O \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde:  $A_{21}$  y  $A_{22}$ : amplitudes;  $\tau_{21}$  y  $\tau_{22}$ : tiempos de relajación;  $O$ : *offset*.

### 3.2.3.b. Coeficientes de difusión.

Las mediciones de los coeficientes de difusión de agua ( $D_w$ ) se determinaron utilizando la secuencia PGSE (*pulsed magnetic field gradient spin echo*, Stejskal y Tanner, 1965), que consiste en un eco de espín (Hahn, 1950) con la aplicación de dos gradientes controlados de campo magnético aplicados entre los pulsos de 90° y 180° y entre el de 180° y la adquisición. La intensidad del gradiente de campo magnético aplicado se calibró en el rango 1,4 a 2,5 T/m utilizando una solución acuosa de 1,25 g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , que está caracterizada por poseer un conocido valor de  $D_w$  ( $2,3 \cdot 10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$  a 25 °C (Holz y col., 2000)). El coeficiente de regresión obtenido fue 0,99998.

Como aproximación, se analizó un único coeficiente de difusión, que se obtiene al registrar la amplitud (A) de la señal PGSE con ( $AG(t)$ ) y sin ( $AG(0)$ ) el gradiente de campo magnético aplicado (G), como se detalla en la ecuación 3.2:

$$\ln \frac{A_{G(t)}}{A_{G(0)}} = \gamma^2 * D_{ww} * \delta^2 * \left( \Delta - \frac{1}{3} \delta \right) * G^2 \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde  $\delta$  es la duración del gradiente,  $\Delta$  es el tiempo entre los gradientes, y  $\gamma$  es la constante giromagnética del protón. Las cápsulas húmedas y deshidratadas se analizaron utilizando los siguientes parámetros: números de scans: 16; tiempo de reciclado: 2 s; ganancia: 77 dB; pulsos sin registro (*dummy shots*): 1; amplitud del campo magnético de 1,4 T/m (55% de la amplitud total),  $\tau$  (tiempo entre los pulsos de 90° y 180°) de 7,5 ms,  $\delta$  de 0,5 ms, y  $\Delta$  de 7,5 ms.

### 3.2.3.c. Curvas isotérmicas a -20 °C, -30 °C y -70 °C.

Se midieron los tiempos de relajación transversales ( $T_2$ ) mediante la secuencia de pulsos FID, que consiste en un único pulso de 90°<sub>x</sub> y posterior detección de la magnetización. Se utiliza para ello la secuencia SFC/LFC (*solid fat content/ liquid fat content*) del equipo, que permite obtener el incremento de los sólidos respecto a los líquidos, partiendo de una muestra líquida, o viceversa. Dado que esta secuencia de pulsos es muy rápida y que permite obtener información acerca de los protones que relajan más rápidamente, es decir, aquellos protones que estén en estado sólido o asociados a los sólidos, se utilizó con el fin de monitorear la cristalización de agua y aceite en las cápsulas húmedas. Se utilizaron tres temperaturas (-20, -30 y -70°C) para el análisis, de forma tal de poder predecir las fracción correspondientes a aceite y agua.

En todos los casos, las muestras fueron mantenidas a 25°C en un baño termostático (Termo Electron Corporation GmbH) y se adquirieron datos cada 10 segundos de forma tal de: i) monitorear la cristalización completa del sistema, a -70°C; ii) monitorear el 50% de cristalización, para calcular el  $t_{50}$  (a -30°C); iii) monitorear la cristalización a la temperatura de congelación de *freezer* (-20°C), de forma tal de estudiar la cristalización inicial.

Todos los análisis se realizaron en cápsulas húmedas. Se realizaron controles con cápsulas deshidratadas para monitorear la influencia del agua en los estudios isotérmicos.

### **3.2.3.c.i. Modelado de curvas isotérmicas.**

Las curvas isotérmicas obtenidas a  $-70^{\circ}\text{C}$  fueron modeladas a través de la conocida ecuación de Avrami (Avrami, 1939).

$$\alpha = 1 - \exp^{-K_c T^n} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Por otro lado, se obtuvo el valor del *plateau* en las curvas isotérmicas obtenidas a  $-30$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  a través de la aplicación de la ecuación 3.4, definida como asociación en una única fase (*one-phase association*). De esta ecuación sólo se consideró el valor del *plateau*.

$$Y = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) * (1 - \exp^{-Kx}) \quad \text{Ecuación 3.4}$$

### **3.2.4. ANÁLISIS DE IMÁGENES MEDIANTE EL PROGRAMA LIBRE IMAGE J.**

Se utilizó análisis de imagen para obtener parámetros estructurales de las cápsulas de polielectrolitos luego de tomar fotografías digitales con una cámara Canon PowerShotA70 de 3,2 Mpix (Canon Inc., Malasia) con zoom fijado en 3,0X acoplada a una lupa binocular (Unitron MS, Unitron Inc., Nueva York, Estados Unidos de América) con el aumento en 7X, y posteriormente analizar dichas fotos con el programa de licencia libre IMAGE J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Las fotografías fueron realizadas iluminando exclusivamente con luz a 45° de la muestra (siempre a la misma intensidad) y colocando las cápsulas en una bandeja de color negro para generar un mejor contraste. Las imágenes fueron adquiridas en el modo automático con la función macro activada, sin flash, con una resolución de 1600 x 1200 píxeles y en RGB.

Una vez obtenidas las fotografías, se analizaron con el programa ImageJ en el cual se obtienen el área, el perímetro, la circularidad (que se define como un valor entre 0 y 1 según cuanto se aproxime la forma a un círculo) y el diámetro de Feret (distancia máxima entre los dos puntos más distantes que pasa por el centro) para cada uno de los sistemas. Para ello, se procesaron las imágenes con la siguiente secuencia de pasos: i) se abre la imagen en el formato original RGB (corresponde a 24 bits); ii) se cambia el tipo de imagen a 8-bit (comando menú *image, type*); iii) se ajusta el valor umbral de luz (comando menú *image, adjust, threshold*), utilizando la recomendación automática (salvo raras excepciones); iv) se procede a analizar el tamaño de las partículas (comando menú *analyze, analyze particles, selecting outlines*). Con el comando *analyze, set measurements* se seleccionaron previamente a iv) que parámetros analizará el programa; una vez realizado no es necesario repetir este paso, ya que el programa deja configurados dichos parámetros. El programa además permite calibrarlo de forma tal de obtener los parámetros de interés en las unidades adecuadas (mm) y no en píxeles, para lo cual se obtuvo una fotografía de una sección de un calibre (10 mm) y mediante la secuencia de comandos *analyze, calibrate* se ajusta el trazo de una línea entre los límites del cm respecto a los píxeles y distancia teórica (10 mm) dando por consiguiente la calibración.

Se analizaron entre 60-70 cápsulas para calcular el tamaño de las mismas en los sistemas húmedos y alrededor de 40 cápsulas en el caso de los sistemas deshidratados.

### 3.2.5. CONTENIDO DE AGUA.

#### 3.2.5.a. Método gravimétrico.

Se determinó el contenido de agua de las cápsulas por diferencia de peso antes y después del secado que se realizó en estufa de vacío durante 48 hs en presencia de agentes desecantes, a 100 °C. Se comprobó que los valores de peso final obtenido fueran valores estables y no se registraron variaciones de peso más allá del tiempo seleccionado. Los valores obtenidos de contenido de agua se expresaron como porcentaje de agua en base húmeda utilizando la siguiente ecuación 3.5.

$$\%H_2O = 100 * \frac{P_i - P_f}{P_i - P_r} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

donde,  $P_i$  es el peso de la muestra antes del tratamiento;  $P_f$  es el peso de la muestra después del tratamiento;  $P_r$  es el peso del recipiente correspondiente vacío.

Para el cálculo de los valores de contenido de agua en base seca se reemplaza en el denominador de la ecuación 3.5 el  $P_f$  por el  $P_i$ .

#### 3.2.5.b. Método de Karl Fischer.

Se utilizó un titulador automático TIM980, TitraLab (Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francia), el cual basa su medición en una ecuación química selectiva de agua con yodo y monometil sulfito (formado en metanol) y una base orgánica como piridina (actualmente se usan otras menos tóxicas), cuyas reacciones han sido reportadas en varias fuentes (Isengard, 2010; Bruttel y Schlink, 2003).

Para determinar el contenido de agua por el método de Karl Fischer se elaboró una curva de calibración realizada con emulsiones agua: aceite de oliva de contenidos de agua entre 1 y 5 % (p/v), para evitar errores en la lectura debido al alto contenido de aceite empleado (insoluble en metanol). Las muestras de agua contenían alginato al 1% p/v como emulsificante. La curva de calibración obtenida se muestra en ecuación 3.6.

$$y = 0,6269 x - 0,0152$$
$$R^2 = 0,9798$$

*Ecuación 3.6*

Donde  $y$  es el contenido de agua (%p/v) y  $x$  el volumen (40  $\mu$ L) de emulsión agregada.

Una vez obtenida la ecuación se midieron las cápsulas deshidratadas por liofilización y secadas al vacío adicionando 3 cápsulas correctamente pesadas. Se promedian los resultados de dos mediciones y se informa el desvío estándar.

### **3.2.5.c. Determinación de contenido de agua a partir de mediciones espectrales en infrarrojo cercano (NIR).**

Se utilizó un espectrómetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR (Perkin Elmer, Inc.) acoplado a un accesorio NIRA (Perkin Elmer, Inc.) que posee un detector propio (InGaAs) y una esfera integradora (que permite una amplia colección de ángulos para obtener un muestreo representativo) para obtener espectros NIR en el rango de 4000 a 10000  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros fueron adquiridos en el modo reflectancia utilizando 32 scans como promedio con resolución de 8  $\text{cm}^{-1}$ . Todas las muestras (emulsiones y cápsulas) se colocaron en los mismos viales de vidrio, de forma tal de restar adecuadamente el

*background* realizado con *Spectralon*® (polímero fluorado de elevada reflectancia difusa, producido por Labsphere, Inc., North Sutton, NH, Estados Unidos de América). Todas las muestras se midieron apoyando los viales de vidrio sobre la ventana de zafiro, cuidando que el haz de luz estuviera contenido dentro del vial y que no se observara salida del haz por la parte superior del vial. Cada muestra se midió por triplicado.

Se realizó una curva de calibración a partir de emulsiones patrón agua:aceite de oliva en el rango 25% a 65% de agua para las cápsulas húmedas y otra curva de calibración con emulsiones en el rango 1% a 5% para las cápsulas deshidratadas. Las muestras de agua contenían alginato al 1% p/v como emulsificante. A partir de análisis multivariado se obtuvieron regresiones lineales mediante PLS (descrita en la siguiente sección) para cada uno de los rangos estudiados. Posteriormente, se obtuvieron los espectros de las cápsulas húmedas (con licopeno) y cápsulas deshidratadas por ambos métodos y se predijo el contenido de agua a partir de los modelos obtenidos mediante PLS.

Los valores predichos mediante NIR fueron comparados con los obtenidos mediante el método gravimétrico para las cápsulas húmedas y con los obtenidos por Karl-Fischer para las cápsulas deshidratadas.

### ***3.2.5.c.i. Análisis multivariado: regresión lineal y predicción.***

Los espectros obtenidos fueron analizados en el programa TheUnscumbler v 9.7 (Camo Software AS, Oslo, Noruega), en los que se colocó a las intensidades obtenidas

para cada uno de los números de onda como variables (3001 variables) en filas, siendo las columnas de la matriz las diferentes muestras procesadas.

Inicialmente, todos los espectros fueron pretratados mediante el algoritmo MSC (*multi scattering correction*), de forma tal de corregir errores en línea de base y en la adquisición, productos de diferencias en la capacidad de dispersar la luz debido a las diferentes composiciones (especialmente en emulsiones).

Posteriormente, se realizó una regresión lineal mediante PLS (*partial least squares*) de forma tal de relacionar los variables espectrales con el contenido de agua de las emulsiones. Para ello, se utilizaron entre 25 y 30 espectros de emulsiones (según el rango de contenido de agua), utilizando el 30% de las muestras para hacer la validación por *test set*.

La predicción del contenido de agua de las cápsulas se realizó mediante el comando *Prediction* a partir del modelo obtenido para las emulsiones por PLS.

Se informan los errores promedios de la calibración, de la validación y de la predicción (RMSEC, RMSEV, RMSEP, respectivamente), el  $R^2$  de la regresión lineal, y los errores de predicción para cada una de las muestras, en las unidades correspondientes (contenido de agua en base húmeda).

### **3.2.6. ACTIVIDAD DE AGUA.**

La medición de la actividad de agua ( $a_w$ ) se realizó utilizando un equipo marca Aqualab (Decagon Devices, Inc, Estados Unidos de América) que determina el punto de rocío del sistema.

Las mediciones de las cápsulas de polielectrolitos fueron realizadas utilizando un reductor del porta muestra. Para corregir los valores se realizó una curva de calibración a partir de sales patrones (Greenspan, 1977) medidas con (y) y sin reductor (x), siendo igual a:  $y = 0,958 x + 0,019$  con un  $R^2$  de 0,9995.

### **3.2.7. pH.**

Se utilizaron tiras reactivas de pH (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y/o un pHmetro (Mettler Delta 320, Mettler Toledo AG, Greifensee, Suiza), con un electrodo de superficie (Mettler Toledo AG), calibrado con soluciones tampón de pH 4 y 7. Se midieron las emulsiones y soluciones utilizadas para realizar las cápsulas de polielectrolitos en el rango de 3 a 8. Las muestras se midieron por triplicado, y se informa el valor promedio de las determinaciones junto con su desvío estándar.

### **3.2.8. LIBERACIÓN DE LICOPENO PRESENTE EN LAS CÁPSULAS HÚMEDAS.**

La liberación del licopeno de cápsulas húmedas se estudió en función del tiempo para cada una de los sistemas en presencia de una mezcla solvente adecuada para la solubilización del licopeno. Se utilizaron los mismos solventes descritos para la medición espectrofotométrica (hexano, etanol y BHT en acetona, 50:25:25, sección 3.2.a.)

Para cada uno de los tiempos de liberación estudiados, las cápsulas se pesaron por duplicado en viales de vidrio, y luego se agregó 3 mL de la mezcla solvente, conservándose en frío, oscuridad y agitación constante. A intervalos fijos (cada 5 minutos hasta 1 hora), se retiran dos viales con muestras, a los que se les agregó agua

bidestilada y se procedió a medir espectrofotométricamente el contenido de licopeno, como se describió en la sección 3.2.a.

El mismo procedimiento se realizó con las cápsulas blanco (sin licopeno), para cada uno de los sistemas y por duplicado, con el fin de descontar la posible contribución del aceite en la señal. Se verificó que la contribución de aceite a la señal era despreciable en todos los sistemas.

Los datos de contenido de licopeno en función del tiempo de liberación fueron modelados utilizando la ecuación de Peppas (1985), que se comentará en profundidad en la sección 4.5 de Resultados y Discusión, ya que el análisis de esta ecuación y de otras derivadas requiere un mayor desarrollo.

### **3.2.9. TRATAMIENTO DE DATOS.**

El modelado de los datos experimentales y regresiones presentados se realizó a través de los programas Prismv5 (GraphPad Software, Inc.), Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Estados Unidos de América), Numbers '09 (Apple Inc, Cupertino CA, Estados Unidos de América) y se utilizó el programa TheUnscramblerv9.7 (Camo Software AS) para el análisis multivariado.

## **4. RESULTADOS**

Se emplearon distintos polielectrolitos como alginato, pectina, quitosano con la adición de varias gomas y azúcares como trehalosa y  $\beta$ -ciclodextrina para desarrollar sistemas de encapsulación que permitieran estabilizar licopeno extraído de pomelo rosado frente a procesos de congelación y deshidratación. Se varió la composición del medio interno y externo de las cápsulas, se evaluó el efecto de distintos métodos de congelado y diferentes métodos de secado; además se analizó la conservación del contenido de licopeno encapsulado y su estabilidad en función de los distintos tratamientos, tanto en sistemas húmedos como en deshidratados. En esta sección se muestra la elección de la fuente de la cual se extrajo el licopeno, la estabilidad del mismo en la preparación de las cápsulas de polielectrolitos, la caracterización física de las cápsulas, y luego los estudios de estabilidad y liberación.

#### **4.1. ESTABILIDAD DE EXTRACTO DE LICOPENO.**

Con el objetivo de extraer el licopeno de fuentes naturales, se estudiaron diferentes matrices derivadas de pomelo rosado (*Citrus paradisi*) de forma tal de maximizar la concentración de licopeno obtenida durante su extracción y posterior encapsulación. Se evaluaron matrices húmedas (pulpa y jugo) y matrices deshidratadas por liofilización (pulpa, jugo y rodajas), de forma tal de variar tanto el contenido de agua, que puede entorpecer en la posterior extracción del licopeno, como la estructura a partir de la cual se realiza la extracción (tejido, células, etc.). De acuerdo a esto se realizaron estudios espectrofotométricos de las diferentes matrices, obteniendo los espectros de absorción UV/Visible (Figura 4.1) que proporcionan datos específicos para la identificación del licopeno (y carotenoides en general). Como se comentó en la

introducción (sección 1.1.1.), existen dos factores a tener en cuenta: i) la concentración de licopeno y ii) la conservación de la estructura fina espectral del licopeno.

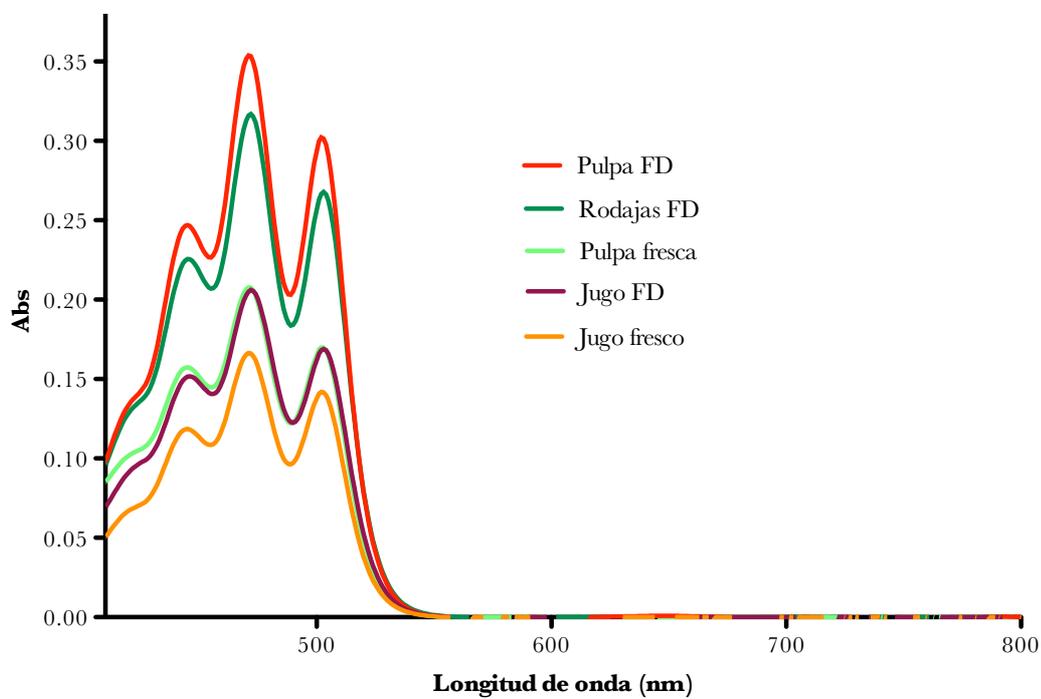


Figura 4.1. Espectros de absorción UV/Visible. FD: corresponde a muestras deshidratadas por liofilización.

Una vez obtenidos los espectros de licopeno en cada matriz, se calculó la concentración de licopeno teniendo en cuenta la absorbancia a una longitud de onda de 503 nm (Fish y col., 2002, Henríquez y col., 2005, Singh y col., 2008), debido a que ese pico está poco afectado por la contribución de otros posibles carotenoides presentes en el pomelo rosado. La concentración de licopeno expresada en de  $\mu\text{g}$  licopeno/g muestra en base seca se muestra en la Figura 4.2.

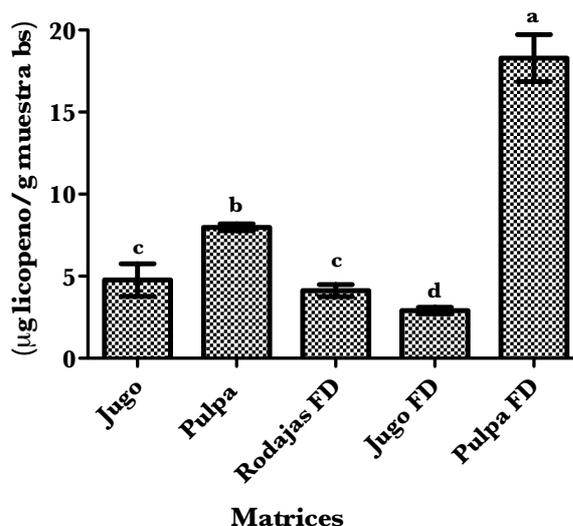


Figura 4.2 Evaluación del contenido de licopeno en diferentes matrices obtenidas a partir de pomelo rosado. Se muestran los valores promedios normalizados por peso de muestra expresado en base seca (bs) con sus desvíos estándar. Las diferentes letras sobre las columnas (a-d) indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ . FD: material liofilizado.

Este análisis permitió determinar que, entre las matrices húmedas, la pulpa es una mejor matriz de extracción de licopeno que el jugo, debido probablemente a que parte de los compuestos liposolubles quedan atrapados en las estructuras celulares presentes en los tejidos de la pulpa, y no son liberados de la misma a partir de la obtención de jugo. Por otro lado, se observó que la pulpa liofilizada es la matriz de la cual se obtiene una mayor concentración de licopeno por gramo de muestra en base seca. Estudios realizados previamente (Atasoy y col., 2012) muestran que dado que el licopeno es un compuesto orgánico altamente liposoluble, la eliminación previa del agua de la matriz permite concentrar los solutos, aumentando su disponibilidad y minimizando los volúmenes del agente extractor. La extracción a partir de rodajas liofilizadas mostró bajos valores de contenido de licopeno debido a que probablemente el proceso de extracción de licopeno desde la estructura celular que lo contiene es más complejo, ya que la estructura tisular está mucho más conservada que en el caso de la pulpa. Es probable que, para lograr contenidos similares a los obtenidos en pulpa, sea

necesario utilizar mayores tiempos de extracción, la acción de enzimas específicas o utilizar ultrasonido.

Una vez obtenidos los espectros se estudió la estructura fina, la cual permite en general analizar y diagnosticar el grado de persistencia del cromóforo en un sistema determinado. Esto es útil para comparar el espectro en cuanto a cambios en las absorbancias máximas de los picos característicos, obteniendo el valor de  $III/II$  %, que es la relación de la altura entre picos (Figura 4.1), cuyo procedimiento de identificación se explica con detalle en la sección 1.1.1. Este análisis se realizó con los espectros de cada muestra y los resultados obtenidos para las diferentes matrices se muestran en la Figura 4.3. La comparación estadística de la estructura fina de las matrices indica que tanto las rodajas liofilizadas como la pulpa liofilizada presentan valores de  $III/II$ % que se corresponden con la estructura fina conservada del licopeno, los cuales están alrededor de 60-62 % (Britton, 1992). Por lo tanto, las matrices que presentan mejores valores de índice de estructura fina son las rodajas y la pulpa liofilizada; además, teniendo en cuenta lo analizado previamente en la Figura 4.2, la que presentó mayor contenido de licopeno fue la pulpa de pomelo liofilizado. Por ende, ésta es la matriz que se utilizó para preparar el extracto rico en licopeno.

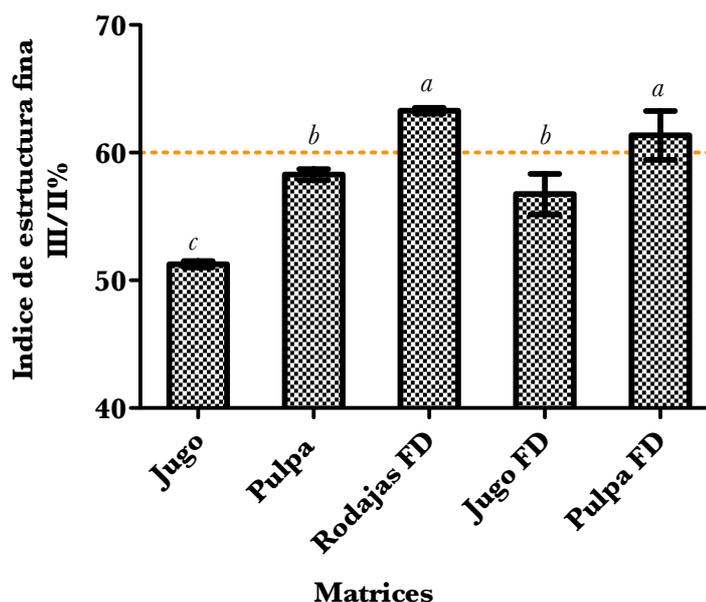


Figura 4.3. Análisis de la estructura fina espectral de matrices de pomelo rosado, para la determinación de licopeno. El índice III/II% se obtiene a partir de la relación porcentual de los valores de absorbancia del pico III (503 nm) y el pico II (472 nm). Las diferentes letras sobre las columnas (a-d) indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ .

Entonces, se utilizó aceite de oliva para obtener un extracto rico en licopeno a partir de pulpa liofilizada de pomelo rosado libre de solventes, observando que en una única extracción fue posible extraer un  $79 \pm 3\%$  del licopeno presente en la pulpa liofilizada. Posteriores extracciones mostraron una baja eficiencia, aumentando mucho el volumen de aceite empleado, y diluyendo por consiguiente el extracto. Debido a eso, se decidió trabajar con una única extracción de licopeno.

Previo al procedimiento de encapsulación, el extracto rico en licopeno (extraído con aceite de oliva) proveniente de la pulpa de pomelo rosado se emulsificó con los biopolímeros correspondientes a las formulaciones específicas para las cápsulas de alginato de sodio conteniendo azúcares (trehalosa o  $\beta$ -ciclodextrina), un biopolímero catiónico (quitosano), un biopolímero aniónico (pectina) o biopolímeros neutros (gomas guar, arábica, vinal o espina corona), según el esquema mostrado en Tabla 3.2, sección

3.1.3. de Materiales y Métodos. Todas las emulsiones se realizaron con alginato de sodio al 1%, con una relación (%v/v) alginato: extracto rico en licopeno de 2:1.

La Figura 4.4 a y b muestran el contenido de licopeno y el índice  $\text{III/II}\%$  obtenido en las cápsulas de alginato (A) y en la emulsión previamente preparada respecto al contenido de licopeno del extracto. En la Figura 4.4a se ve claramente que el contenido de licopeno disminuyó en la emulsión respecto al extracto, pero a su vez todo el licopeno presente en la emulsión se encontró en las cápsulas preparadas. Por otro lado, el índice  $\text{III/II}\%$  relativo al extracto muestra que no hubo cambios en la estabilidad del licopeno luego de la emulsificación en ultraturrax, mientras que el índice descendió luego de la encapsulación, si bien se realizó en frío e intentando evitar la entrada de luz. Es posible que la luz que ingresaba durante la estadía del licopeno en la manguera de silicona y/o durante la generación de las cápsulas (no es posible cubrir la entrada de luz en el eje vertical (según se ve en la Figura 3.1 de Materiales y Métodos) haya provocado la modificación en el índice.

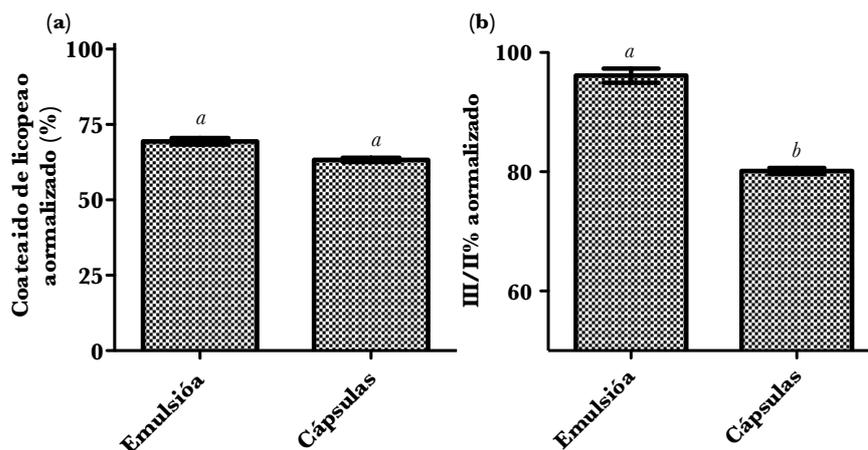


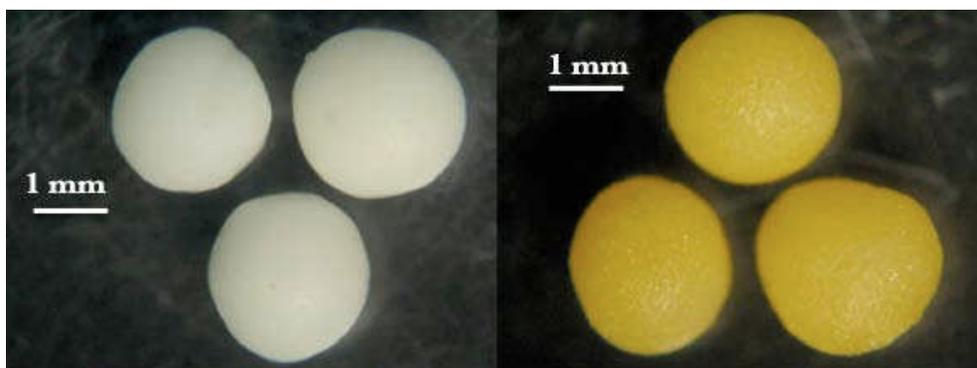
Figura 4.4. Estudio del contenido de licopeno (a) y Análisis de la estructura fina espectral (b) presente en la emulsión y las cápsulas respecto al contenido de licopeno del extracto. Las diferentes letras sobre las columnas (a-b) indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ .

#### 4.2. ESTABILIDAD DEL LICOPENO EN CÁPSULAS DE POLIELECTROLITOS CONTENIENDO AZÚCARES Y BIOPOLÍMEROS.

Partiendo de las emulsiones iniciales para la preparación de los sistemas, se prepararon las cápsulas con diferentes formulaciones a través del método de goteo, como se explica en materiales y métodos (sección 3.1.4, Figura 3.1). Un ejemplo de las cápsulas obtenidas se muestra en la Figura 4.5. Además del alginato, se utilizó el agregado de un disacárido (trehalosa) y de diversos biopolímeros (aniónico: pectina; catiónico: quitosano; neutros: gomas guar, arábica, vinal y espina corona) y  $\beta$ -ciclodextrina para modificar las propiedades estabilizantes de las cápsulas.

Una variable que es importante tener en cuenta a la hora de la preparación de las cápsulas de alginato-Ca(II) es el pH de los sistemas de encapsulación, que debe ser mayor a 3,8-4, ya que permite asegurar que el alginato posea cargas negativas para la formación de las cápsulas con el  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo sus valores de  $\text{pK}_a$  3,38 y 3,65 (Haug, 1964). Por lo tanto, se verificó que los pH de todos los sistemas empleados fuesen

superiores a este valor umbral (siendo alrededor de 5,5-6 para alginato y alginato-trehalosa, y alrededor de 4-5 para las gomas (al agregar la trehalosa todas aumentaron 0,5 unidades de pH).



*Figura 4.5. Imágenes de cápsulas del sistema conteniendo únicamente alginato (A) como biopolímero. Derecha: cápsulas A con licopeno. Izquierda: cápsulas A control (sin licopeno).*

Para evaluar el contenido de licopeno presente en las cápsulas y con el fin de asegurar la extracción completa del licopeno encapsulado, las cápsulas se sometieron a un tratamiento previo con citrato de potasio al 1 %p/v, puesto que éste actúa como agente quelante de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  que forman el gel y en consecuencia la estructura del gel se pierde y la cápsula se desintegra (Deladino y col., 2008). Cabe resaltar que para 8 de los 9 sistemas las cápsulas se desintegraron en su totalidad mientras que para el sistema A-TQ, las cápsulas permanecieron parcialmente estables, en similitud con los resultados obtenidos por Santagapita (2010), cuyas cápsulas con quitosano conteniendo enzimas se trataron con agentes secuestrantes y se observaron estructuras huecas (similares a una medusa). Gåserød y col. 1999, reportaron que la interacción alginato-quitosano forma una membrana que es la única estructura de la cápsula que se mantiene cuando se utilizan agentes secuestrantes como el citrato. Una vez que las cápsulas son desintegradas, se realizó la extracción de licopeno en oscuridad para su determinación espectrofotométrica. La Figura 4.6.a. muestra los valores de

concentración de licopeno normalizados por el contenido de licopeno presente en el extracto. Además, se presentan los valores de estructura fina espectral en la Figura 4.6.b, a través del parámetro III/II%, también normalizados en referencia al extracto.

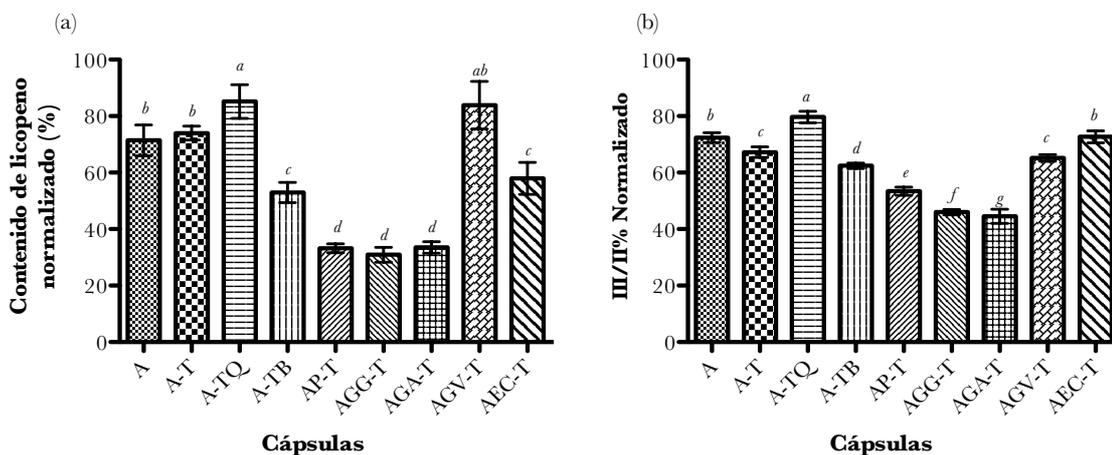


Figura 4.6. (a). Evaluación del contenido de licopeno ( $\mu\text{g}$  licopeno/g muestra bs) normalizado por el contenido de licopeno en los respectivos extractos empleados en la preparación de cápsulas de diferente formulación; (b). Análisis de la estructura fina espectral de las cápsulas de polielectrolitos. El índice III/II% se obtiene a partir de la relación porcentual de los valores de absorbancia del pico III (503 nm) y el pico II (472 nm), siendo los valores normalizados por los índices de los respectivos extractos. Se incluyen los desvíos estándar. Las letras sobre las columnas indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ . Las siglas empleadas corresponden a la nomenclatura indicada en Tabla 3.2. A = alginato; T = trehalosa; P=pectina, GG= goma guar, GA=goma arábica, GV= goma vinal, EC= goma espina corona, Q= quitosano, B= $\beta$ -ciclodextrina.

En la Figura 4.6.a se puede observar que el contenido de licopeno en las cápsulas A-TQ y AGV-T fueron mayores al 80 % y para las cápsulas A y A-T fueron cercanos al 70 %; para las cápsulas A-TB y AEC-T fueron mayores al 50 %, mientras que los sistemas de AP-T, AGG-T y AGA-T fueron aún menores ( $< 40$  %). En cuanto a la preservación de la estructura fina del extracto encapsulado (Figura 4.6.b) en general se observaron dos tipos de comportamientos: índices mayores al 60 %, en el cual está el grupo de cápsulas A-TQ, A, AEC-T, A-T y AGV-T mientras que los sistemas restantes A-TB, AP-T, AGG-T, AGA-T, presentaron una conservación menor al 60 %. Esta reducción del índice III/II% indica que posiblemente el licopeno encapsulado se

isomerizó a su forma cis (Britton, 1995). Los valores de estructura fina no dan exactamente cuenta de qué isómero es (dado que hay 13 dobles enlaces que se pueden isomerizar) pero sí da a conocer que gran parte del licopeno encapsulado se ha perdido a medida que éste se ve involucrado en diferentes tipos de procesos/tratamientos.

Estos resultados muestran que la conservación del contenido y estabilidad del licopeno depende fuertemente de la formulación empleada, observándose cápsulas de mayor y menor estabilidad respecto a las cápsulas A o A-T. Se intentará explicar estos resultados teniendo en cuenta algunas características fisicoquímicas de las cápsulas, que serán evaluadas en la siguiente sección.

#### **4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÁPSULAS HÚMEDAS.**

Las cápsulas húmedas fueron caracterizadas según su forma, tamaño, contenido y actividad de agua; se obtuvieron además los espectros obtenidos por espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (*FT-IR*) para confirmar la presencia de los diferentes aditivos empleados y estudiar interacciones entre los mismos. Asimismo, se determinaron el coeficiente de difusión y los tiempos de relajación por resonancia magnética nuclear de bajo campo (*LF-NMR*).

En la Figura 4.7 se muestran imágenes fotográficas de las cápsulas húmedas preparadas con las diferentes formulaciones, cómo se especificó en la Tabla 3.2 de la sección 3.1.3. de Materiales y Métodos. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital acoplada a una lupa.

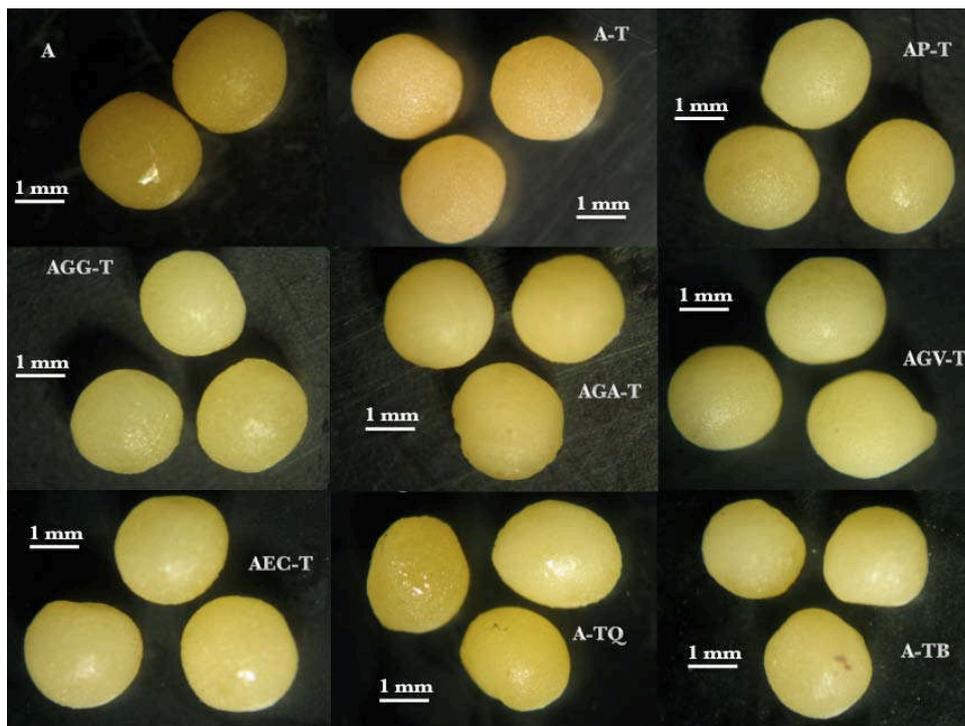


Figura 4.7. Imágenes fotográficas de cápsulas de polielectrolitos con licopeno obtenidas con una cámara digital (con aumento 3X) acoplada a una lupa binocular (aumento en 10X). A = alginato; T = trehalosa; P=pectina, GG= goma guar, GA=goma arábica, GV= goma vinal, EC= goma espina corona, Q= quitosano, B= $\beta$ -ciclodextrina.

Una vez obtenidas las imágenes de las cápsulas de todas las formulaciones, se obtuvo el tamaño y la forma de las cápsulas a partir de análisis de imágenes, procesando las imágenes con el software de licencia libre IMAGE J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Este software permite realizar calibraciones de forma tal de obtener los parámetros de interés en las unidades adecuadas (mm) y no en píxeles, como se explicó en la sección 3.2.4.a. Se estudiaron el área, el perímetro, la circularidad y el diámetro de Feret (distancia máxima entre los dos puntos más distantes pasando por el centro), y los resultados se muestran en la Figura 4.8. Los valores informados corresponden al promedio de al menos 60 cápsulas por sistema con los intervalos al 95% de confianza. Este análisis permite observar variaciones en los cuatro parámetros analizados entre los diferentes biopolímeros utilizados para la composición de las cápsulas.

La adición de cualquier agente al alginato provocó la disminución significativa del diámetro, el área y el perímetro de las cápsulas, como se muestra en la Figura 4.8 (a, b, d). Estos tres parámetros mostraron tendencias similares entre las cápsulas de los diferentes sistemas. Por otro lado, la adición de cualquier agente al alginato, a excepción del empleo de la trehalosa como único aditivo, ocasionó un aumento de la circularidad, haciendo que las cápsulas sean mucho más esféricas (Figuras 4.8c y 4.7). Las cápsulas de alginato muestran una importante desviación de la esfericidad (circularidad = 0,6), mostrando características de elipse (un eje más largo que el otro). La adición de un segundo biopolímero o de  $\beta$ -CD aumentó la circularidad de las cápsulas debido a que probablemente disminuye la tensión superficial de la gota que contiene la emulsión inicial que posteriormente entra en contacto por goteo con la solución externa, afectando la viscosidad de la emulsión. Se requerirían mediciones de viscosidad para poder confirmar la presente hipótesis.

Es interesante notar que la adición de un segundo biopolímero, de  $\beta$ -CD o de trehalosa provocó que las cápsulas sean más compactas, pero el ser más compacta no necesariamente implicó un aumento en la circularidad. Por ejemplo, las cápsulas AGV-T mostraron un menor diámetro respecto a las A-T (y ambos diámetros son menores que el de las cápsulas A), sin mostrar diferencias significativas respecto a la circularidad entre sí.

Las cápsulas con goma arábica o  $\beta$ -CD mostraron ser las de menor tamaño, independientemente del parámetro analizado (área, perímetro o diámetro). Las cápsulas que contienen espina corona mostraron el mayor valor de circularidad (0,85).

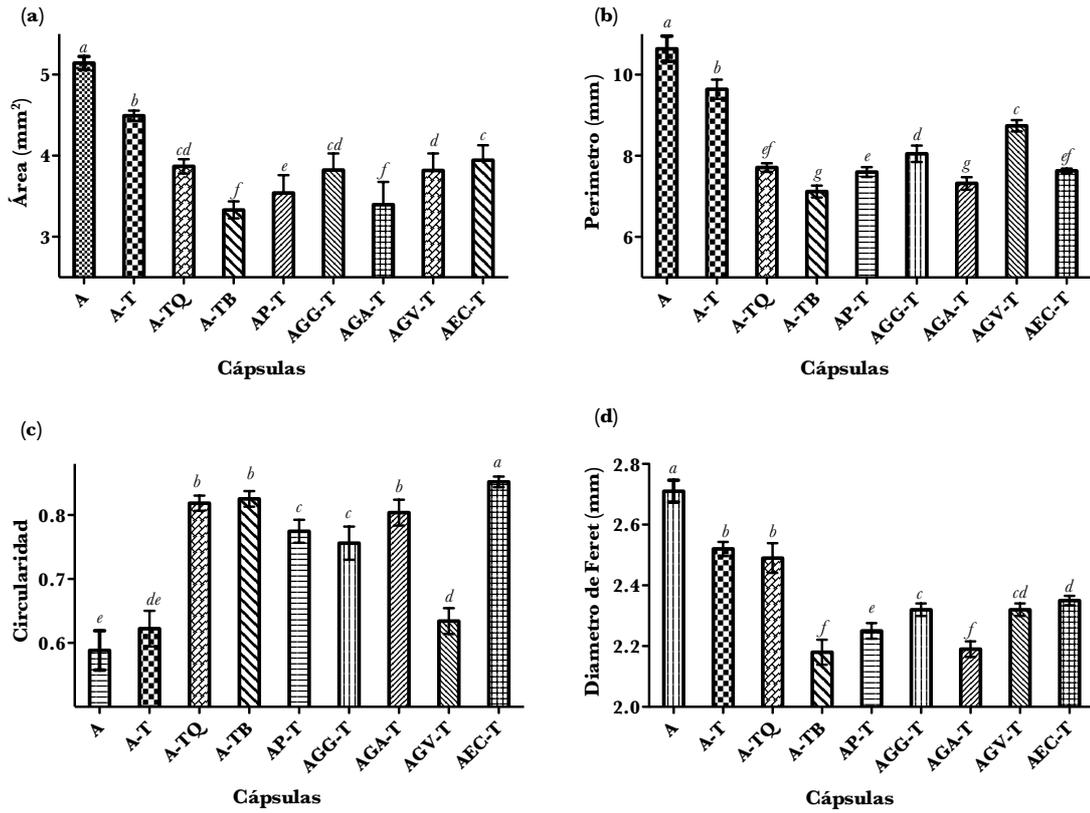


Figura 4.8. (a) Área, (b) perímetro, (c) circularidad y (d) diámetro de Feret obtenidos por análisis de imagen de las cápsulas húmedas en relación con la composición. Se indican los intervalos de confianza al 95%. Las diferentes letras sobre las columnas (a-g) indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ .

La actividad de agua ( $a_w$ ) y el contenido de agua fueron analizados en función de la composición de las cápsulas y se muestran en la Tabla 4.1 para las cápsulas húmedas.

Como era de esperar, las cápsulas húmedas mostraron valores altos de  $a_w$  entre 0.96-98, pero menores a los valores reportados por otros autores para cápsulas de alginato (alrededor de 0,99) (Santagapita y col., 2011, Deladino y col., 2008). Todas las cápsulas mostraron menores valores de  $a_w$  respecto a las cápsulas A, a excepción de las cápsulas A-TQ y AP-T. Es importante notar que en las cápsulas húmedas la adición de otros componentes solubles provocó una disminución de la  $a_w$  del sistema.

Por otro lado, no todas las cápsulas mostraron menores valores de contenido de agua respecto a las cápsulas A, ya que es probable que las cápsulas de los diferentes sistemas muestren diferencias en sus isotermas de sorción de agua. Las cápsulas con trehalosa fueron las que mostraron menor contenido de agua que el resto de los sistemas, seguidas por aquellas a las que se le incorporaron gomas (espina corona, goma vinal, goma guar).

Tabla 4.1. Contenido de agua (en base húmeda-bh-) y  $a_w$  de cápsulas de polielectrolitos. Las diferentes letras (a-d) indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ .

Cápsula	CA (% bh)	$a_w$
A	44 ± 2 (a)	0,983 ± 0,002 (a)
A-T	37 ± 1 (d)	0,975 ± 0,002 (b)
A-TQ	41 ± 2 (a,b)	0,981 ± 0,004 (a,b)
A-TB	41 ± 1 (a,b)	0,979 ± 0,002 (a,b)
AP-T	39 ± 3 (a,b,c,d)	0,981 ± 0,002 (a)
AGG-T	39 ± 1 (b,c,d)	0,967 ± 0,003 (c)
AGA-T	41,6 ± 0,6 (a)	0,958 ± 0,006 (c,d)
AGV-T	40 ± 2 (a,b,c,d)	0,960 ± 0,003 (d)
AEC-T	37,1 ± 0,6 (c,d)	0,961 ± 0,007 (c,d)

Por otro lado, se determinaron los componentes de las cápsulas caracterizándolos a través de estudios por *FT-IR* mediante el uso de un dispositivo micro-ATR (*attenuated total reflectance*) de un único haz de incidencia. La ventaja de este dispositivo es que permite utilizar la muestra sin diluciones y sin la necesidad de utilizar matrices dispersantes (como el KBr comúnmente utilizado), simplificando la preparación de las muestras y el posterior procesamiento de los datos.

La Figura 4.9 muestra los espectros normalizados obtenidos a partir de la matriz de la cual se extrae el licopeno (la pulpa liofilizada), el extracto de licopeno en aceite de

oliva, su control (aceite de oliva) y el licopeno purificado en hexano a partir de la pulpa.

El espectro de la pulpa liofilizada muestra bandas características asociadas a carbohidratos ( $1200-800\text{ cm}^{-1}$ ), que incluye las señales de los enlaces glicosídicos y los carbonos anoméricos de los distintos azúcares presentes, los estiramientos OH en la región  $3000-3600\text{ cm}^{-1}$  y los lípidos ( $1710$  y región  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ ). La banda que se observa a  $1600\text{ cm}^{-1}$  puede deberse a proteínas (si bien el nivel de las mismas es bajo, menor al 1%) o a agua (residual o producto de humidificación de la pulpa post secado).

Es posible observar las bandas típicas reportadas previamente por otros autores en el espectro del licopeno (obtenido a partir de pulpa, en fase hexanólica), como por ejemplo: las bandas principales que presenta en espectro a  $2920$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento  $\text{CH}_2$ ) (Aghel y col., 2011; De Nardo y col., 2009);  $1760-1710\text{ cm}^{-1}$  (doble banda de baja intensidad) (De Nardo y col., 2009; Baranska y col., 2006);  $1455/1446\text{ cm}^{-1}$  (De Nardo y col., 2009; Baranska y col., 2006); un doble pico en  $1377-1365\text{ cm}^{-1}$  (De Nardo y col., 2009; Baranska y col., 2006). Se observaron también bandas no asignadas pero reportadas a  $1235/1165\text{ cm}^{-1}$  (mayoritaria) y  $1090-1040\text{ cm}^{-1}$ . Se observó la banda característica reportada para el licopeno en  $960\text{ cm}^{-1}$  (que corresponde a la flexión del grupo  $\text{HC}=\text{CH}$ - fuera del plano, De Nardo y col., 2009) pero de muy baja intensidad.

Los espectros del aceite de oliva y del extracto (que es mayoritariamente aceite) comparten muchas bandas entre sí, y las pequeñas diferencias debidas al licopeno no son posibles de observar en la escala presentada en la Figura 4.9. En estos espectros se observaron las bandas características asociadas con grupos lipídicos entre  $1380-1370$  y  $1485-1430\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}$ , flexión),  $1745\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ , ésteres), y  $3010$ ,  $2920$  y  $2852\text{ cm}^{-1}$

(tramo C-H) y una banda principal en  $1160\text{ cm}^{-1}$ .

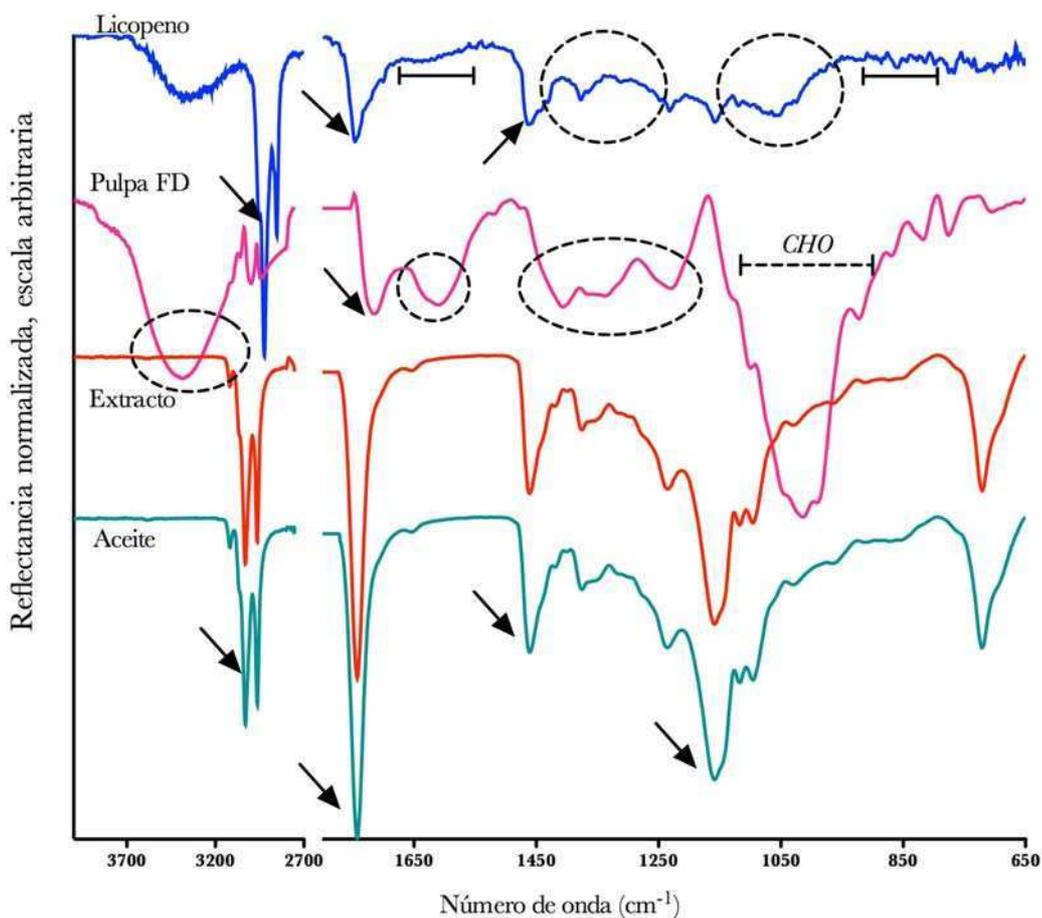


Figura 4.9. Espectros *FT-IR* de pulpa liofilizada de pomelo, aceite de oliva, extracto rico en licopeno y licopeno extraído a partir de pulpa de pomelo liofilizada con hexano. Se destacan algunas bandas: flechas: corresponden a señales provenientes de lípidos. Se destacan además círculos que hacen mención a bandas indicadas en el texto.

Es importante tener en cuenta la estructura de cada uno de los polímeros y azúcares a la hora de poder identificar las bandas obtenidas. Las Figuras 4.10 y 4.11 muestran los espectros *FT-IR* obtenidos para los distintos sistemas de cápsulas estudiados y para los controles (sistemas liofilizados de alginato, trehalosa, quitosano,  $\beta$ -CD, pectina, gomas: guar, arábiga, vinal y espina corona). Este análisis se realizó sólo sobre las muestras liofilizadas, dado que la alta absorción de los picos de agua modifica fuertemente el espectro, enmascarando bandas mucho más débiles (figura no mostrada).

De todos modos es esperable que si se observa una interacción en las cápsulas secadas por liofilización, también se encuentre en las cápsulas secadas por otros métodos, así como en las cápsulas húmedas.

Debido a que los espectros de los distintos sistemas presentan múltiples picos de absorción, se compararon inicialmente los espectros del alginato con el de las cápsulas de alginato (A). Luego se analizó el efecto de la adición de trehalosa en las cápsulas A-T (presente en el resto de los sistemas), para luego estudiar las interacciones en las cápsulas cubiertas con quitosano (A-TQ), y aquellas que contienen  $\beta$ -ciclodextrina (A-TB), Figura 4.10. Además, en la Figura 4.11 se analizaron el resto de las cápsulas que contienen pectina o las gomas, así como los controles que se utilizaron para la elaboración de las cápsulas. En las Figuras 4.10 y 4.11 se resaltan los picos más importantes que permitieron analizar las interacciones o el efecto de las mezclas de compuestos en los diferentes sistemas.

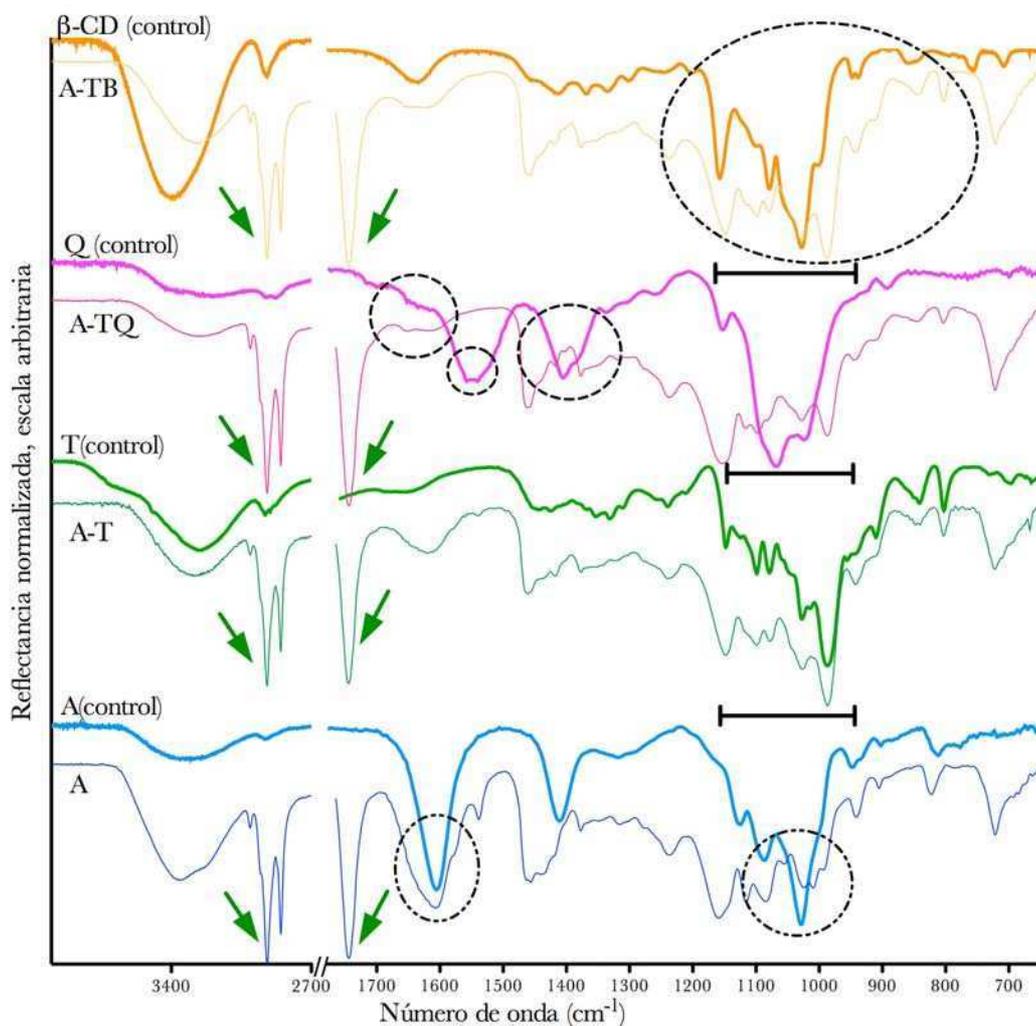


Figura 4.10. Espectros FT-IR de las diferentes cápsulas con sus respectivos controles (biopolímeros o azúcares liofilizados). Se destacan algunas bandas: flechas: corresponden a señales provenientes de lípidos. Se destacan además círculos que hacen mención a bandas indicadas en el texto.

Es necesario considerar que los biopolímeros empleados son relativamente similares entre sí (son hidrocoloides y poseen mayoritariamente unidades de azúcares, a excepción de la goma arábiga que posee un alto nivel de proteínas, y las gomas de vinal y espina corona, con niveles bajos de proteínas), por lo que sus espectros comparten algunas bandas, y se diferencian por otras, que se detallan a continuación. La región 1500-900  $\text{cm}^{-1}$  del espectro infrarrojo no se encuentra perturbada por la presencia de agua y es muy rica en cuanto a información estructural, dado que las señales derivan de

muchos de los grupos funcionales característicos de sacáridos (Kačuráková y Mathlouthi, 1996).

Las bandas características del alginato provienen de sus grupos carboxílicos, que dan señales a 1595 y 1405  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes al estiramiento simétrico y antisimétrico de los mismos, respectivamente, y se observan también en el espectro de las cápsulas A (Sankalia y col., 2005; Sarmiento y col., 2006). En el resto de las cápsulas (Figs. 4.10 y 4.11) dichas señales se ven muy disminuidas en intensidad y con forma más aplanada, debido a la dilución con trehalosa. La banda a 1033  $\text{cm}^{-1}$  también es característica del alginato debido al estiramiento CO (Kačuráková y Mathlouthi, 1996; Sarmiento y col., 2006). Los espectros de las muestras de alginato presentan un pico entre 970-920  $\text{cm}^{-1}$  que solapa al pico del licopeno por lo que se dificulta el seguimiento del licopeno por ATR-IR. Las capsulas de alginato presentan bandas entre 1490-1380  $\text{cm}^{-1}$  producto tanto de la contribución del alginato como del aceite; las cápsulas de alginato presentaron un corrimiento en la banda de 1033  $\text{cm}^{-1}$ , generando tres picos característicos 1024, 1007 y 992  $\text{cm}^{-1}$ .

En todas las cápsulas (Figuras 4.10 y 4.11) se observan claramente las bandas correspondientes al aceite de oliva, confirmando la correcta incorporación de la emulsión en las cápsulas.

Los espectros de las cápsulas que contienen trehalosa (todos menos A) fueron muy influidos por el espectro del azúcar, que presenta sus bandas principales entre 983  $\text{cm}^{-1}$  y 1148  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes al enlace glicosídico (Kačuráková y Mathlouthi, 1996). La banda principal a 983  $\text{cm}^{-1}$  se distingue claramente en todos los sistemas que contienen trehalosa (Figuras 4.10 y 4.11).

El espectro del quitosano muestra un pico de absorción marcado a  $1550\text{ cm}^{-1}$  debido a la protonación del grupo amino, otro a  $1635\text{ cm}^{-1}$  debido al enlace amida (que se observa como un hombro del primero) y la deformación de los grupos  $\text{CH}_2$  que ocurre a  $1405\text{ cm}^{-1}$  (Smitha y col., 2005; Sarmiento y col., 2006). La evidencia de la interacción entre alginato y quitosano se puede observar en las cápsulas A-TQ en el corrimiento y ensanchamiento de estas bandas de  $1641$  a  $1610\text{ cm}^{-1}$  y de  $1405$  a  $1420\text{ cm}^{-1}$ , aunque ésta última se superpone debido a la contribución de la banda del aceite. En el espectro de las cápsulas A-TQ, el pico correspondiente a la amida I del quitosano ( $1635\text{ cm}^{-1}$ ), luego de la complejación con el alginato se une en un único pico con la señal del  $\text{COO}^-$ , mientras que la señal a  $1550\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al grupo amino pierde intensidad. Estos cambios fueron observados previamente por varios autores (Santagapita, 2010; Smitha y col., 2005; Sarmiento y col., 2006; Deladino y col., 2008). Los cambios observados en las bandas de transmisión de los grupos amino, carboxilo y amida pueden atribuirse a la interacción electrostática entre los grupos  $\text{COO}^-$  del alginato y el amino del quitosano en las cápsulas formadas (Ribeiro y col., 2005; Smitha y col., 2005; Sarmiento y col., 2006; Deladino y col., 2008).

Si bien la presencia de  $\beta$ -CD no se distingue claramente en los espectros, debido a que sus picos se superponen con los del alginato o los de trehalosa (Wang y col., 2009), se muestran bandas intensificadas entre  $1200$ - $800\text{ cm}^{-1}$  (Figura 4.10).

En la Figura 4.11 también se muestran los espectros de las cápsulas AP-T y su control; debido a que la pectina y el alginato presentan grupos carboxílicos y uniones  $\alpha$  ( $1 \rightarrow 4$ ) en su estructura, comparten muchas de las bandas. Las señales características de la pectina son:  $1741$  (vibración  $\text{C}=\text{O}$  del  $\text{COOH}$ ),  $1605$  (vibración simétrica  $\text{COO}^-$ ),

1410  $\text{cm}^{-1}$  (vibración antisimétrica  $\text{COO}^-$ ) y 1011  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento  $\text{C=O}$ ) (Yao y col., 1997; Gnanasambandam y Proctor, 2000; Sinitsya y col., 2000; Kim y col., 2003). A diferencia de lo observado con el quitosano, en los sistemas con pectina (AP-T) no hubo desplazamientos de bandas debido a que al estar ambos cargados negativamente no forman un complejo. Sin embargo, las cápsulas AP-T muestran bandas más intensas a 1415 y 1330  $\text{cm}^{-1}$  (que es bastante pequeña en la escala presentada) que las cápsulas A-T, posiblemente debido a la contribución de la pectina.

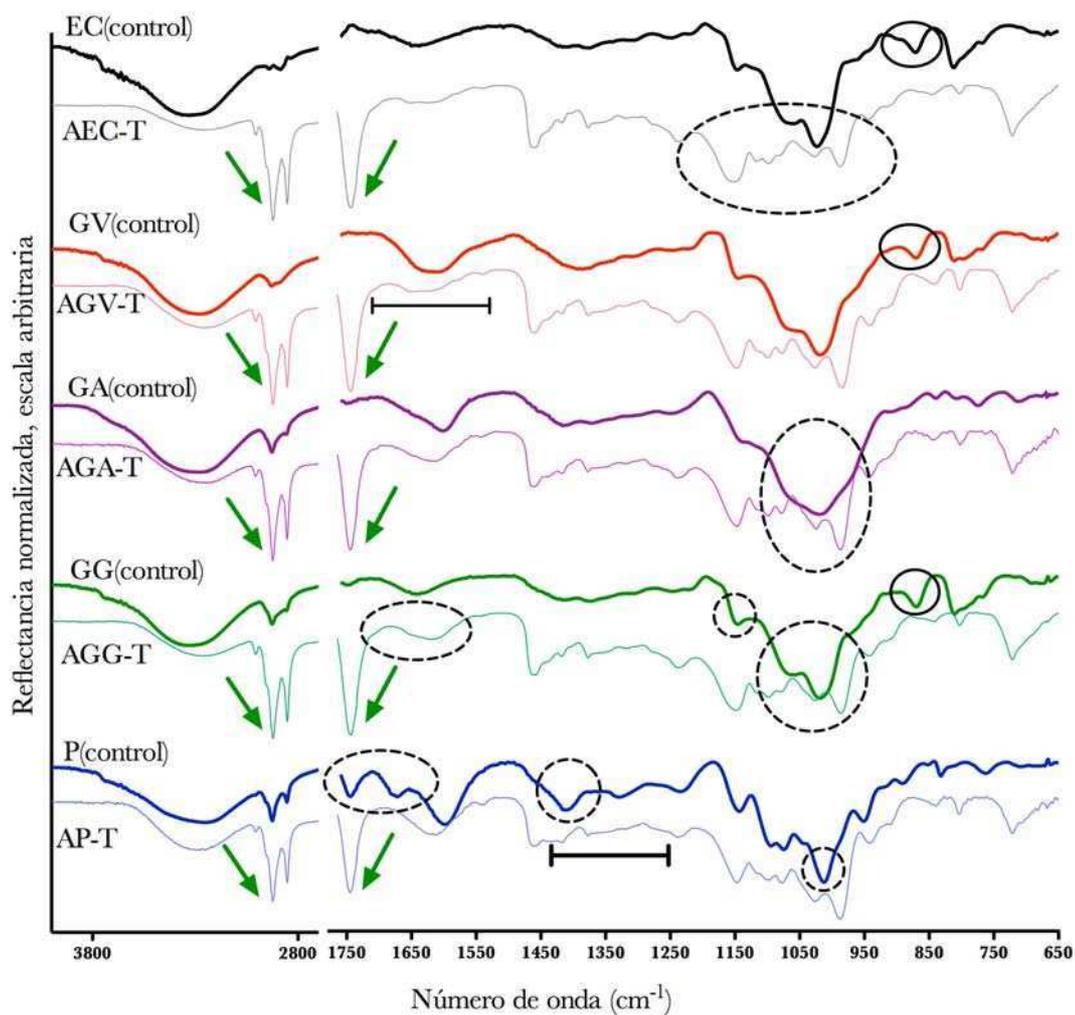


Figura 4.11. Espectros FT-IR de las diferentes cápsulas con sus respectivos controles (biopolímeros liofilizados). Se destacan algunas bandas: flechas: corresponden a señales provenientes de lípidos. Se destacan además círculos que hacen mención a bandas indicas en el texto.

Los espectros de las gomas presentan muchas similitudes entre sí, especialmente para los tres galactomananos (gomas guar, espina corona y vinal), sobre todo en la región de los carbohidratos (1200-700  $\text{cm}^{-1}$ ), la región que posee las señales de los carbonos anoméricos de las distintos monómeros (900-700  $\text{cm}^{-1}$ ), y señales específicas que corresponden principalmente a la galactosa ( $\alpha$  o  $\beta$ ) a  $871 \pm 7 \text{ cm}^{-1}$ , manosa ( $876 \pm 9 \text{ cm}^{-1}$ ) (para los galactomananos) y glucosa ( $915, 874$  y  $767 \pm 8 \text{ cm}^{-1}$ ) (Polu y col., 2006; Pedersen y col., 2000, Price y col., 1997, Paul y col., 1997). Las diferencias entre los

galactomananos empleados se reflejan entre otros, en sus varias relaciones M/G que generaron diferencias en la intensidad relativa de las bandas 1150, 1070 y 970  $\text{cm}^{-1}$  con respecto a la banda principal de 1020  $\text{cm}^{-1}$ .

La goma guar presenta sus principales bandas a 1017, 1082 y 1158  $\text{cm}^{-1}$  (vibraciones de estiramiento de C-OH) y una banda 1648  $\text{cm}^{-1}$ , que se observó como hombro en las cápsulas de goma guar (AGG-T) de la banda 1620  $\text{cm}^{-1}$  (vibración de flexión de grupos -OH). Además, las cápsulas AGG-T mostraron un ensanchamiento de la banda de 1150  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros del alginato y la goma guar coinciden en muchas bandas.

El espectro FTIR de la goma arábica muestra bandas características alrededor de 3000–3600  $\text{cm}^{-1}$  para el estiramiento OH, 2993 y 2918  $\text{cm}^{-1}$  para el estiramiento C-H y 1612  $\text{cm}^{-1}$  para el estiramiento C=O, con un pico principal en 1017  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas del alginato y la goma arábica coinciden entre si por lo que tampoco hay diferencias muy grandes entre ambas.

Los espectros de la goma de vinal y de la goma espina corona aún no fueron reportados en bibliografía. La goma vinal presenta un pico ancho entre 1700-1500  $\text{cm}^{-1}$  que seguramente incluye varios picos, con máximos entre 1600-1630  $\text{cm}^{-1}$ . En las cápsulas AGV-T, la forma de la banda de 1620  $\text{cm}^{-1}$  se asemejó más a la del vinal que a la del alginato, mostrando un aumento relativo en 1640  $\text{cm}^{-1}$  comparado con la de 1620  $\text{cm}^{-1}$ . En cuanto a las cápsulas con goma espina corona, se observó un ensanchamiento de la banda de 1150  $\text{cm}^{-1}$  (coincidente con la presencia de una banda a ese número de onda en el espectro control de la espina corona), además de una modificación relativa del patrón de tres bandas entre 1060-1130  $\text{cm}^{-1}$ .

De esta forma, mediante el análisis de los espectros IR se ponen de manifiesto principalmente las interacciones entre quitosano y alginato a través de los desplazamientos de los picos (cápsulas A-TQ), así como la presencia de cada uno de los diferentes excipientes empleados en cada una de las cápsulas a partir del reconocimiento de las principales señales.

Para evaluar la movilidad de los diferentes compuestos en la matriz y su posible influencia en la estabilidad del licopeno, se estudió la movilidad en las cápsulas húmedas evaluando los tiempos de relajación transversales y los coeficientes de difusión a partir de resonancia magnética nuclear de bajo campo (*LF-NMR*) resuelta en el tiempo.

Desde la teoría general de RMN, cuando se coloca un material que contiene hidrógenos en un campo magnético uniforme y se aplica un campo de radiofrecuencia (RF), el H resuena y absorbe la energía del pulso de RF (Slichter y col., 1990; Price y col., 1997; Blümich y col., 2008). Luego, cuando se termina dicho pulso, el protón liberará la energía absorbida de forma tal de volver al equilibrio térmico, y esta liberación de energía es aquella que se detecta durante el análisis. Existen dos tiempos de relajación: el longitudinal ( $T_1$ ) y el transversal ( $T_2$ ), que permiten caracterizar el tiempo de recuperación hacia el equilibrio. Los tiempos  $T_1$  se denominan también relajación espín-entorno (*spin-lattice*), y corresponden al cambio energético entre los espines nucleares excitados y el entorno, y consideran la reducción global de energía. Los  $T_2$  se conocen como relajación espín-espín, y representan la interacción entre los momentos magnéticos nucleares (espines) y se refieren a la energía total de los núcleos (que permanecerá constante en su totalidad) (Bakhmutov 2004). Generalmente, los  $T_2$  son menores o iguales a los valores de  $T_1$  para un mismo material. La técnica de *LF-*

*NMR* ha sido ampliamente reportada en mediciones de propiedades de materiales utilizados en alimentos y para control de calidad (Todt y col., 2001; Micklander y col., 2002; Todt y col., 2006a), debido a que es un método rápido, conveniente y no destructivo, y se basa en la detección de la distribución y movilidad de los protones de agua y aceite que suelen formar la matriz de los alimentos (Blümich y col., 2009). Existen muchos tipos de protones, es decir, aquellos en agua libre, o agua más estructurada, o que forman parte de los lípidos, proteínas, carbohidratos, que pueden ser distinguidos por *LF-NMR* a través del uso de diferentes secuencias de pulsos (Pedersen y col., 2000). La distribución de los protones en compuestos y estructuras diferentes en la matriz alimentaria dará lugar a diferentes tiempos de relajación.

Se realizaron mediciones de los tiempos de relajación transversales o espín-espín ( $T_2$ ) utilizando la secuencia CPMG, que permite analizar las relajaciones de sistemas con mucha movilidad, con tiempos de relajación mayores a 1 ms. En todas las muestras de cápsulas húmedas conteniendo licopeno se observaron dos picos de relajación, entre 50 y 72 ms y entre 164-210 ms, como se reporta en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Tiempos de relajación ( $T_2$ ) y amplitudes ( $A_2$ ) obtenidos mediante ajuste bi-exponencial de las curvas de decaimiento de las cápsulas húmedas conteniendo licopeno mediante LF-NMR.

Cápsulas	Amplitud <sub>21</sub> (%)	$T_{21}$ (ms)	Amplitud <sub>22</sub> (%)	$T_{22}$ (ms)
A	$47 \pm 2^{(b)}$	$66 \pm 3^{(a,b)}$	$34 \pm 4^{(a,b)}$	$168 \pm 13^{(a,b)}$
A-T	$47 \pm 4^{(a,b)}$	$66 \pm 2^{(a,b)}$	$37 \pm 4^{(a,b)}$	$170 \pm 13^{(a,b)}$
A-TQ	$49 \pm 8^{(a,b)}$	$52 \pm 1^{(c)}$	$29 \pm 4^{(a)}$	$164 \pm 3^{(b)}$
A-TB	$59 \pm 4^{(a,b)}$	$67 \pm 3^{(a,b)}$	$29 \pm 1^{(a,b)}$	$200 \pm 18^{(a,b)}$
AP-T	$44 \pm 8^{(a,b)}$	$67 \pm 1^{(a)}$	$30 \pm 2^{(b)}$	$174 \pm 7^{(a,b)}$
AGG-T	$48 \pm 1^{(b)}$	$71 \pm 1^{(a,b)}$	$43 \pm 4^{(a)}$	$192 \pm 6^{(a)}$
AGA-T	$55 \pm 3^{(a,b)}$	$69 \pm 1^{(a,b)}$	$33 \pm 3^{(a,b)}$	$179 \pm 3^{(a)}$
AGV-T	$58 \pm 4^{(a,b)}$	$72 \pm 4^{(a,b)}$	$37 \pm 4^{(b)}$	$198 \pm 16^{(a,b)}$
AEC-T	$58 \pm 2^{(a,b)}$	$72 \pm 1^{(b)}$	$34 \pm 1^{(a,b)}$	$210 \pm 16^{(a,b)}$

Los tiempos obtenidos son similares a los esperados tanto para cápsulas de alginato-Ca(II) (con un único tiempo  $T_2$  entre 40 y 80 ms, dependiendo de las características del alginato (Simpson y col., 2003) o tiempos reportados en el rango de 150 a 200 ms (Rayment y col., 2009), como para cápsulas conteniendo emulsiones (único tiempo a 60 ms, Hester-Reilly y Shapley (2007), como para los dos tiempos  $T_2$  reportados por Zhang y col. (2013), para aceites comestibles (aproximadamente dos poblaciones con tiempos de 80 y 220 ms).

En el caso de los sistemas de cápsulas estudiados, se intentaron realizar ajustes con ecuaciones tri- o tetra-exponenciales para intentar representar a cada uno de los componentes del sistema, pero el mejor ajuste obtenido se produjo mediante la ecuación bi-exponencial.

En general, para sistemas diluidos de polisacáridos en solución o en geles, la respuesta obtenida por RMN será la obtenida por los protones del agua, pero modulada por el intercambio entre éstos con los protones de las biomoléculas presentes (cadenas

de los polisacáridos y azúcares) (Hills y col., 1991; Pottery col., 1993). Los valores de  $T_2$  del agua en geles de polisacáridos suelen ser mucho menores que los del agua (Abletly col., 1976) debido a la reducida flexibilidad de las cadenas de los biopolímeros. Además, la magnitud de esta reducción depende del estado de agregación y si el sistema se encuentra o no gelado. Por lo tanto, Rayment y col. (2009) indicaron que los valores de  $T_2$  son un buen indicador del estado de la gelación y permiten caracterizar las propiedades microestructurales en los geles.

En el caso particular de los sistemas analizados en la presente tesis, no sólo la respuesta obtenida por RMN será la obtenida por los protones del agua, sino también la obtenida por los protones del aceite. Hester-Reilly y Shapley (2007) analizaron cápsulas de alginato con y sin emulsiones utilizando análisis de RMN por imagen, verificando que los tiempos de relajación obtenidos en esta tesis a partir de la secuencia CPMG son comparables con los obtenidos por estos autores (alrededor de  $(60 \pm 20)$  ms para las cápsulas con emulsiones) y son mucho menores que los del agua libre ( $(670 \pm 35)$  ms). Por otro lado, cabe aclarar que si bien las muestras poseen una gran cantidad de agua (Tabla 4.1), no se encontraron tiempos de relajación superiores a los reportados, incluso utilizando secuencias que llegaban a medir ecos de espín a más de 2400 ms. Los resultados que se presentan corresponden a una secuencia utilizada que permite medir el decaimiento hasta 1200 ms, como se muestra en la Figura 4.12.

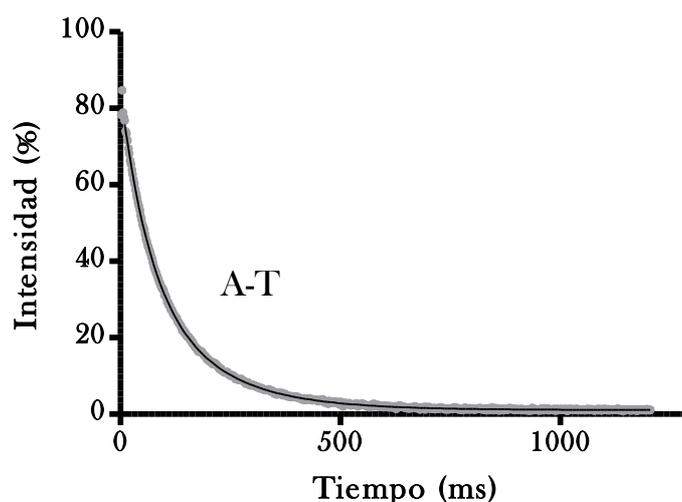


Figura 4.12. Relajación de los espines obtenida mediante LF-NMR para cápsulas húmedas de alginato-trehalosa conteniendo licopeno (A-T). Se muestra el ajuste obtenido (en negro) mediante una ecuación bi-exponencial.

Por lo tanto, dado el solapamiento de las contribuciones de los protones del agua -intercambiando con los polisacáridos y azúcares- y los del aceite, no es posible asignar unívocamente cada uno de los dos  $T_2$  obtenidos a una u otra componente. Lo más plausible es pensar que ambos  $T_2$  están influenciados por las dos contribuciones. El análisis de las muestras deshidratadas, que se analizará en profundidad en la siguiente sección, permitió arribar a esta conclusión.

En este escenario, resulta difícil obtener predicciones acerca de las interacciones agua-polisacáridos-//interfase//aceite-licopeno, y en última instancia, lograr comprender cómo se modifica la estabilidad del licopeno.

Se observó que las gomas provocan mayores valores de  $T_{21}$  y  $T_{22}$  (a excepción de AGA-T, Tabla 4.2), lo que no estuvo directamente relacionado con un mayor contenido de agua (Tabla 4.1) en dichos sistemas. Por otro lado, la presencia de quitosano (cápsulas A-TQ) provocó reducciones en los tiempos de relajación, especialmente en el  $T_{21}$ .

Las amplitudes de ambos tiempos se mantienen en casi todos los sistemas, con algunas excepciones, siendo mayor la amplitud del primer tiempo de relajación ( $A_{21}$ ), mostrando que posiblemente esta población de protones esté más asociada con los protones del agua-polisacáridos que con los del aceite, respecto a la segunda población ( $A_{22}$ ). Esta observación se completó con los datos analizados para los sistemas deshidratados, que se comentarán más adelante (Tabla 4.8).

La adición de trehalosa no mostró diferencias significativas con los valores obtenidos para las muestras de alginato, debido fundamentalmente a que la presencia del gel de alginato ya provoca una gran disminución de los valores (recordar que lo que se observa son los valores de los  $T_2$  que corresponden a protones, en este caso del agua y del aceite).

Teniendo en cuenta los datos obtenidos para contenido de licopeno y estructura fina (Figura 4.6), no es posible observar una correlación entre la movilidad de los sistemas respecto al contenido de licopeno o a la conservación de la estructura fina espectral. Si bien las cápsulas A-TQ son las que muestran menor movilidad en sus sistemas y mayor conservación de licopeno, las AGV-T también muestran alta conservación, pero una movilidad molecular significativamente más alta.

Por otro lado, se obtuvieron los coeficientes de difusión a 25 °C utilizando la secuencia PGSE, que utiliza un eco de espín interrumpido por dos gradientes de campo magnético (mayores detalles se indicaron en la sección 3.2.3.b. de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos para las cápsulas con licopeno se muestran en la Tabla 4.3. Los coeficientes de difusión ( $D$ ) variaron entre 0,37 y  $0,52 \cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s para las cápsulas con licopeno. Todas las cápsulas muestran valores de coeficientes de difusión

menores que los del agua ( $2,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (Holz y col., 2000)), debido a la presencia de los azúcares y los biopolímeros. Por otro lado, debido a que mediante el análisis empleado se obtiene un único valor de  $D$ , es muy probable que la presencia del aceite, que posee valores de  $D$  mucho menores (cerca de  $9 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$  (Šmejkalová y Piccolo, 2010)), provoque una gran disminución del valor observado. Mediante otros análisis de *LF-NMR* es posible analizar más de un coeficiente de difusión en una muestra (Santagapita y col., 2013), pero requiere la realización de una secuencia que no es posible realizar con el equipamiento actual.

*Tabla 4.3. Estudio de los coeficientes de difusión  $D$  ( $\cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ) a  $25^\circ\text{C}$  en cápsulas húmedas conteniendo licopeno determinados por *LF-NMR*.*

Cápsulas	$D$ ( $\cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ )
A	$0,52 \pm 0,03$ <sup>(a)</sup>
A-T	$0,40 \pm 0,02$ <sup>(d,)</sup>
A-TQ	$0,37 \pm 0,02$ <sup>(d)</sup>
A-TB	$0,38 \pm 0,01$ <sup>(d)</sup>
AP-T	$0,450 \pm 0,001$ <sup>(c)</sup>
AGG-T	$0,480 \pm 0,007$ <sup>(b,)</sup>
AGA-T	$0,51 \pm 0,02$ <sup>(a,b)</sup>
AGV-T	$0,368 \pm 0,004$ <sup>(d)</sup>
AEC-T	$0,40 \pm 0,02$ <sup>(d)</sup>

Hester-Reilly y Shapley (2007) encontraron que las cápsulas de alginato conteniendo emulsiones presentan una buena señal para la detección de coeficientes de difusión para su utilización en diagnóstico por imágenes, a diferencia de los sistemas que únicamente poseen alginato. Esto se debe a la movilidad restringida dentro de las cápsulas debido a la presencia de las gotas de aceite emulsificadas dentro de las mismas.

Entre las muestras, se observó que todos los aditivos empleados (adicionalmente al alginato) provocaron reducciones significativas del coeficiente de difusión, a excepción de la muestra con goma arábica (AGA-T).

Los valores de coeficiente de difusión obtenidos muestran un comportamiento similar a los observados para los  $T_2$ , a excepción de las cápsulas con goma vinal y con goma espina corona, que muestran una importante reducción de los valores de  $D$ , en consonancia con los valores obtenidos para el contenido y la actividad de agua (Tabla 4.1) en estos dos sistemas. En forma similar a lo visto para los  $T_2$ , las cápsulas de A-TQ mostraron los menores valores de  $D$ .

En todos los casos, un aumento del valor de  $D$  respecto al sistema A-T conlleva una mayor pérdida en el contenido de licopeno (Figura 4.6), a excepción de los sistemas AEC-T y A-TB, que muestran una pérdida de licopeno pero no hay cambios significativos en los valores de  $D$ . Resultados similares se pueden observar en el cambio en el índice  $III/II\%$ : aquellos en los que más se modifica el  $D$  (respecto al sistema A-T), más cambios se observan en el mencionado índice.

Por lo tanto, el poseer un reducido coeficiente de difusión parece ser un requisito para poder alcanzar mayores valores de contenido de licopeno en las cápsulas, por lo que podría ser utilizado como un indicador rápido para predecir el contenido en las mismas. Un menor valor de  $D$  posiblemente ponga de manifiesto algunas diferencias en la salida del licopeno desde las cápsulas durante su generación, o tal vez una mayor estabilidad de las emulsiones, hecho que no fue abordado en la presente tesis.

#### **4.4. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LAS CÁPSULAS Y LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y ESTABILIDAD DE LICOPENO.**

##### **4.4.1. CONGELACIÓN DE CÁPSULAS DE LICOPENO.**

Debido a que la congelación es uno de los tratamientos más utilizados en preservación de alimentos como estrategia de conservación y que fue reportado que durante este proceso se presentan pérdidas significativas de licopeno debido a una posible reacción autocatalítica en condiciones de congelado y vacío en oscuridad (Sharma y col., 1996), se realizó un estudio en diferentes condiciones de congelación.

El proceso de congelación induce a la formación de cristales (tanto de hielo como de grasas) y la presencia de las interfaces pueden afectar al componente interno en las cápsulas (Zheng y Sun, 2006), afectando la estabilidad del licopeno, posiblemente separando al compuesto de la matriz que lo contiene y exponiéndolo a procesos de oxidación y/o isomerización, afectando su estabilidad dentro de la cápsula.

El primer estudio se realizó sobre la pulpa de pomelo, que fue la matriz utilizada para la extracción, en *freezer* a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, y los resultados se muestran en la Figura 4.13a. En esta Figura es posible observar diferencias significativas en la concentración de licopeno entre la muestra de pulpa congelada y la muestra fresca, con una disminución del 70 %. La Figura 4.13b muestra los cambios en la estructura fina del espectro a partir del índice III/II%, donde se observa una disminución significativa en la muestra congelada.

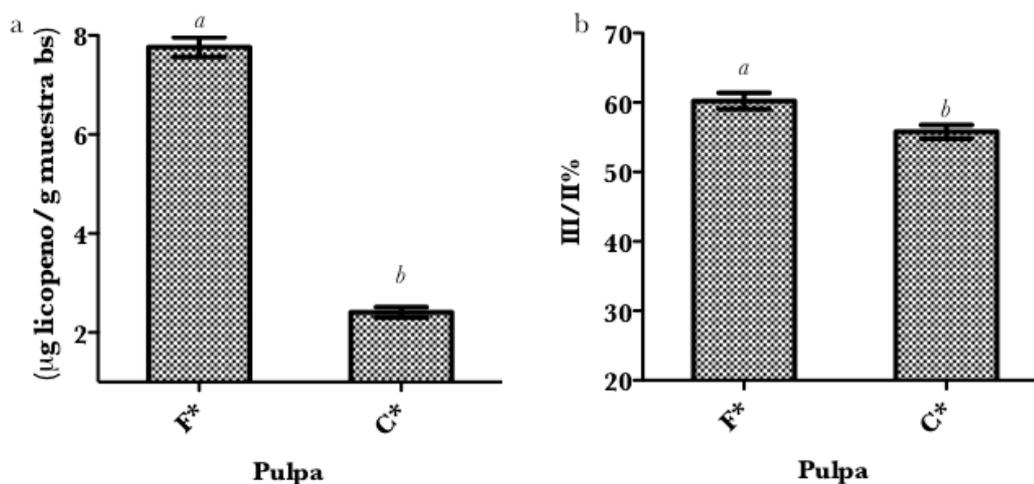


Figura 4.13. Contenido de licopeno en pulpa fresca (F\*) y congelada (C\*) a  $-18^{\circ}\text{C}$ , en freezer convencional, durante 48 hs. Se incluyen los desvíos estándar. Las diferentes letras sobre las columnas (a-b) indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ .

Debido entonces a que el licopeno obtenido a partir de la pulpa de pomelo es sensible a la congelación, se estudió la estabilidad del licopeno en las diferentes formulaciones de cápsulas realizadas, con el objetivo de encontrar un agente biopolímero que sea capaz de encapsular el licopeno y asimismo protegerlo de este tipo de proceso. Las cápsulas se sometieron a dos tipos de tratamientos a bajas temperaturas: el primero consistía en realizar ciclos de congelado en nitrógeno líquido por 1 min y descongelado por 15 min, realizando 4 ciclos con estas características. El segundo tratamiento a baja temperatura consistía en someter a las cápsulas a  $-18^{\circ}\text{C}$  por 1 mes en un freezer convencional. En ambos casos, luego de cada tratamiento las cápsulas fueron medidas espectrofotométricamente, calculando el porcentaje remanente de licopeno respecto a su valor inicial (tiempo cero, Figura 4.6). La Figura 4.14 muestra los valores de licopeno remanente obtenido para las diferentes cápsulas luego de los dos mencionados tratamientos.

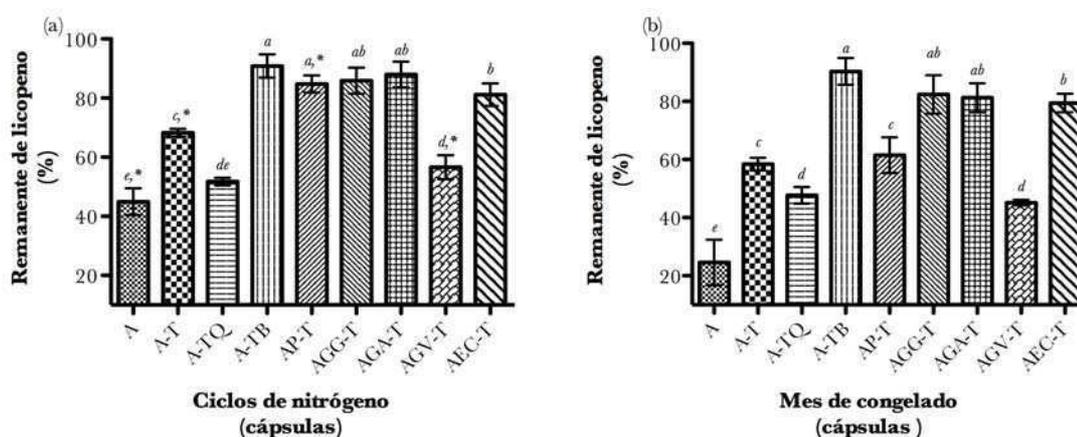


Figura 4.14. Evaluación del contenido de licopeno ( $\mu\text{g}$  licopeno/g muestra bs) normalizado por el contenido de licopeno en el respectivo tiempo cero de las diferentes cápsulas tratadas por ciclos de congelado con nitrógeno (a) y durante 1 mes a  $-18$  °C (b). Las diferentes letras sobre las columnas (a-e) indican diferencias significativas entre los valores de diferentes cápsulas para un mismo tratamiento, con  $p < 0,05$ . Los asteriscos marcados en la Figura a indican diferencias significativas entre los valores de un mismo sistema de cápsulas pero entre tratamientos, con  $p < 0,05$ . Los valores de contenido de licopeno remanente no marcados con asteriscos no son significativamente diferentes entre los dos tratamientos.

En líneas generales, el tratamiento de 1 mes de congelado presentó una disminución de licopeno remanente mayor que la de ciclos de nitrógeno (Figura 4.14). Particularmente notorio es el descenso del contenido de licopeno en las cápsulas A, en donde la pérdida es mayor al 70% en el caso del congelado a 1 mes, y mayor al 50% en el caso de los ciclos de congelado. Se observó que para casos particulares esta disminución no fue significativamente mayor.

Los valores de licopeno remanente muestran que la inclusión de trehalosa en las cápsulas mejoró significativamente la protección de licopeno frente al congelado, ya sea en ciclos cortos o en el tratamiento continuo.

Los cápsulas que contienen  $\beta$ -CD, goma guar o goma arábica, y espina corona (en menor medida) mostraron ser las que mejor conservaron el contenido de licopeno durante los dos tratamientos de congelado. Las cápsulas conteniendo pectina sólo

resultaron efectivas durante el tratamiento en ciclos (respecto a las cápsulas A-T), mientras que las cápsulas que contienen goma vinal o quitosano mostraron comportamientos aún menores a los obtenidos utilizando únicamente trehalosa.

Los mecanismos por los cuales se observó mayor protección en las antes mencionadas cápsulas obedecen a diferentes principios. La  $\beta$ -CD juega un rol importante como agente encapsulante, formando complejos de inclusión con moléculas hidrofóbicas. Se ha reportado la encapsulación de licopeno con  $\beta$ -CD (Blanch y col., 2007) cuyos complejos de inclusión se mantienen estables por más de 6 meses a temperatura ambiente, en presencia de luz y  $O_2$ , por lo que no se descarta la generación de un complejo de inclusión entre el licopeno y la  $\beta$ -CD en las condiciones utilizadas para la formación de las cápsulas.

Por otro lado, se ha descrito que las gomas guar y arábica cumplen un rol como estabilizantes en gotas de emulsiones que contienen agentes encapsulados (Izydorczyk 2005), lo que puede explicar la mayor estabilidad observada en este caso en las cápsulas con licopeno.

Los tratamientos a ciclos cortos permiten evaluar el daño producido aleatoriamente por la generación de cristales en diferentes puntos de las cápsulas (ya que se considera que la nucleación de los cristales sucede aleatoriamente), mientras que el tratamiento a tiempo continuo permite el crecimiento de los cristales formados, aumentando su tamaño. En el caso particular de la muestra con pectina, que es un biopolímero aniónico, dado que forma parte de la estructura de las cápsulas junto con el alginato, formando la red tridimensional que da lugar al gel, es posible que la

generación de cristales de mayor tamaño tenga un impacto en la misma, provocando la desestabilización del licopeno encapsulado.

Los casos más paradigmáticos son los de la goma vinal, que a diferencia de las otras gomas no resultó un buen agente protector. Es más, desestabilizó aún más la protección extra que ofreció la trehalosa. Dado que esta goma está en proceso de caracterización como parte de un doctorado en curso, no es posible dar hipótesis acerca de los fundamentos de desestabilización. El quitosano, por otra parte, mostró también un efecto desestabilizante, que puede estar ligado a su característica de biopolímero catiónico. El quitosano interactúa con el alginato formando una segunda capa alrededor de la red alginato-Ca (II), lo que otorga ventajosas propiedades de barrera y de resistencia mecánica, como fuera ya explicado. Sin embargo, la generación de esta segunda capa podría tener efectos negativos sobre las propiedades emulsificantes del alginato, desestabilizando las gotas de las emulsiones, y por consiguiente, al licopeno encapsulado.

Posteriormente, se analizó la estructura fina del licopeno luego de los dos tratamientos de congelado (ciclos y continuo), que se muestra en la Figura 4.15, observándose una mayor disminución del índice en las muestras congeladas durante un mes respecto a las congeladas por ciclos, en forma similar a lo observado para el contenido de licopeno (Figura 4.14). En la Figura 4.15a se observa que el índice de estructura fina es mayor al 80% para seis sistemas (A-TB, AP-T, AGG-T, AGA-T y AGV-T), mientras que para los restantes tres (A-T, A-TQ, AEC-T) fue mayor al 60%, en contraste con los resultados obtenidos en Figura 4.15b en los que la pérdida del índice fue entre 60% a 75 % para seis casos (A, A-T, A-TQ, A-TB, AP-T y AEC-T), en

dos casos fue mayor al 50% (AGG-T y AGV-T), mientras que para uno de los sistemas la pérdida del índice de estructura fina fue significativamente alta, llegando casi a un 70% comparado con su tiempo cero (AGA-T).

Paradójicamente, las cápsulas AGA-T, que habían sido efectivas a la hora de conservar el contenido de licopeno, muestran una desestabilización de la estructura fina del mismo, lo que implica que sufrió isomerización/es en algún/os de sus doble enlaces.

Como conclusión parcial, es posible entonces encapsular exitosamente al licopeno y estabilizarlo frente a procesos de congelación. Sin embargo, siempre habrá una pérdida de licopeno *all-trans* (con todos sus enlaces en trans), generándose isomerizaciones. Sin embargo, Vitale y colaboradores (2010) reportaron que la ingesta de licopeno isomerizado presentó una mayor biodisponibilidad debido a que son más solubles en las micelas formadas por los ácidos biliares durante la digestión, aunque su rol biológico aún resulta indefinido. Sin embargo, existen autores que indican que los isómeros cis son más compatibles con nuestro cuerpo, y que poseen un mayor poder bioactivo (Domínguez y col., 2009; Baysal y col., 2000).

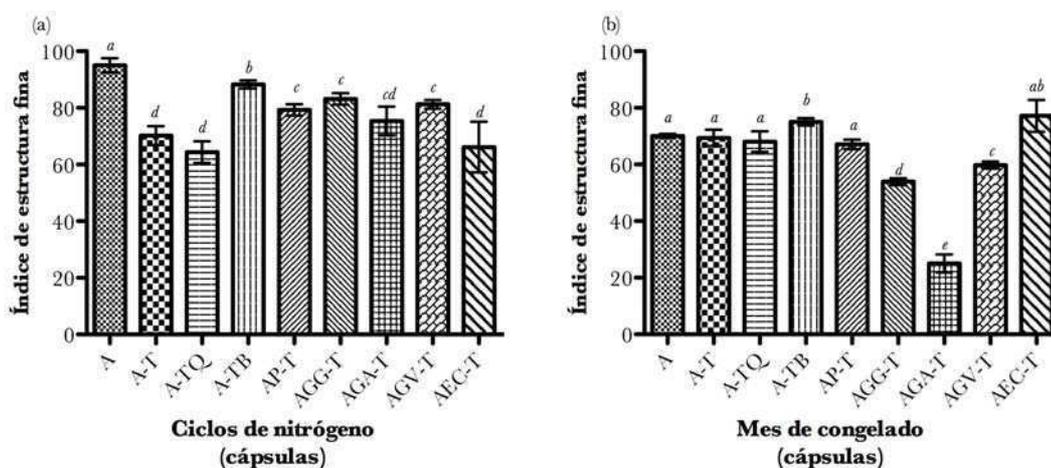


Figura 4.15. Análisis de la estructura fina espectral de las cápsulas de polielectrolitos tratadas por ciclos de congelado con nitrógeno (a) y durante 1 mes a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (b). El índice III/II% se obtiene a partir de la relación porcentual de los valores de absorbancia del pico III (503 nm) y el pico II (472 nm), siendo los valores normalizados por los índices de los respectivos tiempos iniciales (tiempo cero) de cada cápsula. Se incluyen los desvíos estándar. Las letras sobre las columnas indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ .

Uno de los parámetros que se debe tener en cuenta sobre la estabilidad del licopeno es la cristalización de los diferentes componentes en las cápsulas. Para ello se estudió la cristalización del aceite y las cápsulas por *LF-NMR* a través de la utilización de la secuencia de pulsos FID, monitoreando el avance de los componentes de rápida relajación (sólidos) respecto a aquellos de relajación lenta (líquidos, ya sea aceite o agua, ambos con  $T_2$  largos respecto a los sólidos). Cabe aclarar que la cristalización de los compuestos se realiza típicamente a través de análisis por calorimetría diferencial de barrido (*DSC*), ya sea utilizando análisis de corridas dinámicas para evaluar la presencia de eventos de cristalización y/o fusión en un rango determinado de temperaturas, o luego en corridas isotérmicas, para monitorear el avance de cristalización a una dada temperatura. Debido a inconvenientes técnicos, no fue posible contar con un *DSC* para realizar un análisis exhaustivo de las cápsulas. Es por ello que se buscó una técnica de

estudio alternativa que permitiera evaluar a todos los sistemas empleados en forma específica.

Se realizaron estudios isotérmicos a  $-20$ ,  $-30$  y  $-70$  °C, para evaluar el efecto del congelado a la temperatura de *freezer* ( $-20$ °C), a  $-70$  °C para evaluar la congelación total de la muestra en tiempos operativos más cortos, y  $-30$ °C como temperatura intermedia (similar a  $-20$ °C pero con velocidades de congelación más rápidas).

La Figura 4.16 muestra el avance de la cristalización en algunas curvas seleccionadas a las tres temperaturas. Se incluyen muestras control deshidratadas a modo comparativo.

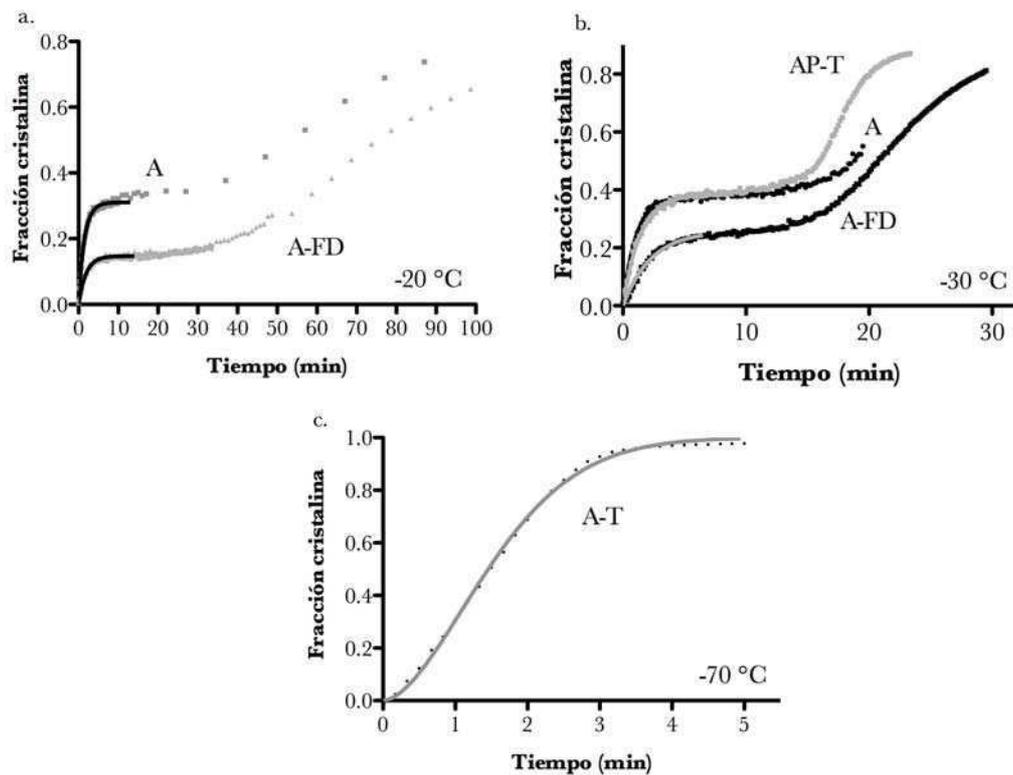


Figura 4.16. Estudios isotérmicos por LF-NMR de cápsulas húmedas y liofilizadas (estas últimas indicadas con FD). Se muestra el avance de la cristalización en función del tiempo a  $-20$  (a),  $-30$  (b) y  $-70$  °C (c). Los puntos corresponden a los valores experimentales y las líneas a los ajustes obtenidos mediante la ecuación de asociación de única fase (a  $-20$  y  $-30$  °C) y la ecuación de Avrami (a  $-70$  °C). A: alginato; T: trehalosa; P: pectina.

Las curvas obtenidas a  $-20$  y  $-30$  °C muestran similitudes, ya que en ambos casos se arriba a un *plateau* antes de proseguir con una segunda etapa de cristalización. Dado que las cápsulas poseen dos componentes mayoritarios que pueden cristalizar (agua y aceite de oliva), y teniendo en cuenta los valores de cristalización y fusión para el aceite de oliva (Hammer, 2008), que muestran un primer pico de cristalización que inicia entre  $-15$  y  $-20$  °C y finaliza antes de  $-30$  °C, seguido por un segundo pico de cristalización (de  $\gg$  entalpía) entre  $-40$  y  $-55/-60$  °C, se utilizaron los valores de *plateau* obtenidos a  $-20$  y  $-30$  °C en un análisis conjunto. Los valores de *plateau* se obtuvieron mediante el ajuste de una ecuación de asociación en una única fase (ecuación 3.4, sección 3.2.3.c.i. de Materiales y Métodos), obteniendo muy buenos ajustes en todos los

casos ( $>$  a 0,97, con un único caso con  $R^2$  de 0,93). Los resultados obtenidos de los ajustes se muestran en la Tabla 4.4 para las cápsulas húmedas tratadas isotérmicamente a  $-20$  y  $-30^\circ\text{C}$ .

Tabla 4.4. Valores (en %) de cristalización obtenidos al llegar al primer plateau en las cinéticas de cristalización a  $-20$  y  $-30^\circ\text{C}$  realizadas mediante LF-NMR en las cápsulas húmedas conteniendo licopeno.

Cápsulas	Fracción cristalina (%)	
	$-20^\circ\text{C}$	$-30^\circ\text{C}$
A	$31,8 \pm 0,1$ (a)	$37,5 \pm 0,2$ (c)
A-T	$25,5 \pm 0,9$ (c)	$37,9 \pm 0,2$ (a,c)
A-TQ	$30 \pm 1$ (a,b)	$39 \pm 1$ (a,b,c)
A-TB	$28,0 \pm 0,5$ (b)	$38,3 \pm 0,2$ (a,b,c)
AP-T	$27,9 \pm 0,5$ (b)	$38,5 \pm 0,2$ (a,b)
AGG-T	$28,0 \pm 0,2$ (b)	$38,1 \pm 0,2$ (a,b,c)
AGA-T	$29,7 \pm 0,9$ (a,b)	$39,0 \pm 0,3$ (b)
AGV-T	$25,6 \pm 0,3$ (c)	$35,8 \pm 0,3$ (d)
AEC-T	$25,7 \pm 0,3$ (c)	$36,7 \pm 0,6$ (a,b,c,d)

Considerando los valores obtenidos de los *plateau* para las cápsulas A deshidratadas, que fueron de  $14,7 \pm 0,1$  y  $26,0 \pm 0,6$  % para los tratamientos a  $-20$  y  $-30^\circ\text{C}$ , respectivamente, se puede atribuir que estos porcentajes de fracción cristalina corresponden a la cristalización de los lípidos del aceite de oliva (ya que el contenido de agua de las cápsulas deshidratadas es muy bajo – menor al 3%-, cuyos valores son reportados en la siguiente sección en la Tabla 4.7).

Por lo tanto, es posible considerar que la cristalización observada hasta llegar al primer *plateau* corresponde tanto al agua como a los lípidos del aceite de oliva, siendo mayor la proporción de agua que cristalizó en las muestras a  $-20^\circ\text{C}$  (54 %, siendo el 46 % correspondiente a lípidos) que a  $-30^\circ\text{C}$  (31 % de agua, 69 % de lípidos).

Las diferentes formulaciones mostraron diferencias respecto a la cantidad de agua cristalizada, ya que es posible asumir que la proporción de lípidos que cristalizaron

es similar en todas las formulaciones. La presencia de trehalosa redujo significativamente los valores obtenidos, debido principalmente a la formación de una matriz amorfa que incorpora/retiene un mayor volumen de agua, que no estará disponible para cristalizar (Mazzobre, 2001).

Por otro lado, se estudiaron los  $t_{50}$  de cristalización, que es el tiempo que tarda un determinado sistema en arribar al 50% de cristalización. Los  $t_{50}$  obtenidos para las cápsulas tratadas a  $-30^{\circ}\text{C}$  se muestran en la Tabla 4.5. Las cápsulas A muestran valores significativamente mayores respecto a los de las cápsulas que contienen trehalosa, como también se puede observar en la Figura 4.16b. Este hecho está ligado, como se comentó previamente, a la presencia de la trehalosa como formador de matriz amorfa, reteniendo agua, como se comentó anteriormente.

El estudio de los  $t_{50}$  de cristalización no se realizó en la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  debido a la larga duración de las corridas isotérmicas.

*Tabla 4.5.  $t_{50}$  de cristalización obtenidos a  $-30^{\circ}\text{C}$  mediante LF-NMR en las cápsulas húmedas conteniendo licopeno.*

Cápsulas	$t_{50}$ (min)
	$-30^{\circ}\text{C}$
A	$19,3 \pm 0,1$ (a)
A-T	$17,1 \pm 0,1$ (b)
A-TQ	$17,0 \pm 0,4$ (b,c)
A-TB	$16,1 \pm 0,1$ (b,c,d)
AP-T	$16,6 \pm 0,1$ (b,c)
AGG-T	$16,9 \pm 0,1$ (b,c)
AGA-T	$16,6 \pm 0,1$ (b,c)
AGV-T	$16,8 \pm 0,1$ (b,c)
AEC-T	$16,7 \pm 0,4$ (b,c,d)

Por último, se obtuvieron los valores de ajuste de la cinética de cristalización aplicando la conocida ecuación de Avrami (Avrami, 1939), que se muestran en la Tabla

4.6 para las cápsulas tratadas isotérmicamente a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 4.16c). La ecuación de Avrami ha sido frecuentemente usada para describir la velocidad global de cristalización isotérmica (Sperling, 1986; Roos y Karel, 1992; Gedde, 1995; Roos, 1995; Jouppila y col., 1997, Mazzobre, 2001). El modelo supone que la cristalización comienza al azar en diferentes puntos y se propaga hacia afuera a partir de los sitios de nucleación (Gedde, 1995).

A partir del ajuste con esta ecuación, se obtienen dos valores: el  $n$  (o índice de Avrami) que está relacionado con el mecanismo de nucleación y crecimiento de los cristales, y el  $k$  que es la constante de cristalización isotérmica, que depende principalmente de la temperatura (Arvanitoyanis y Blanshard, 1994).

Los valores de  $n$  de Avrami obtenidos son similares tanto para las cápsulas húmedas como para las cápsulas liofilizadas, y muestran un crecimiento bidimensional, pero con mayor crecimiento en una dirección respecto a la otra. Dado que las cápsulas están compuestas mayoritariamente por aceite de oliva (Tabla 4.1) y la similitud encontrada entre las cápsulas húmedas y secas en los valores de  $n$  de Avrami, es posible decir que este tipo de cristalización se asocia a la cristalización de los lípidos en las muestras. Existen estudios que muestran valores de  $n$  para cristalización de aceite de oliva entre 2 y 4, pero fueron realizados a otras temperaturas (Chiavaro y col., 2012).

*Tabla 4.6. Valores de los parámetros de ajuste de la ecuación de Avrami obtenidos de las curvas a  $-70^{\circ}\text{C}$  mediante LF-NMR en cápsulas húmedas y liofilizadas (estas últimas indicadas como FD) seleccionadas conteniendo licopeno.*

Cápsulas	Con licopeno	
	n	k
A-T	$1,72 \pm 0,03$	$0,364 \pm 0,008$
A-T-FD	$1,43 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,01$
A-FD	$1,51 \pm 0,03$	$0,365 \pm 0,008$
AGV-T-FD	$1,39 \pm 0,03$	$0,423 \pm 0,009$

Las cápsulas congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$  fueron caracterizadas según su forma y tamaño una vez descongeladas, mediante análisis por imagen, de la misma forma que fue realizado con las cápsulas húmedas. Los parámetros analizados (área, perímetro, diámetro y circularidad) se muestran en la Figura 4.18. En general se observó que tanto para el área como para el perímetro y el diámetro de Feret, las cápsulas que contenían más de un agente protector presentaron mayores valores respecto a las de las cápsulas A, salvo para el sistema con espina corona (AEC-T), que fue el único sistema que redujo todos los parámetros analizados. Todas las cápsulas congeladas mostraron elevados valores de circularidad (entre 0,75 y 0,85).

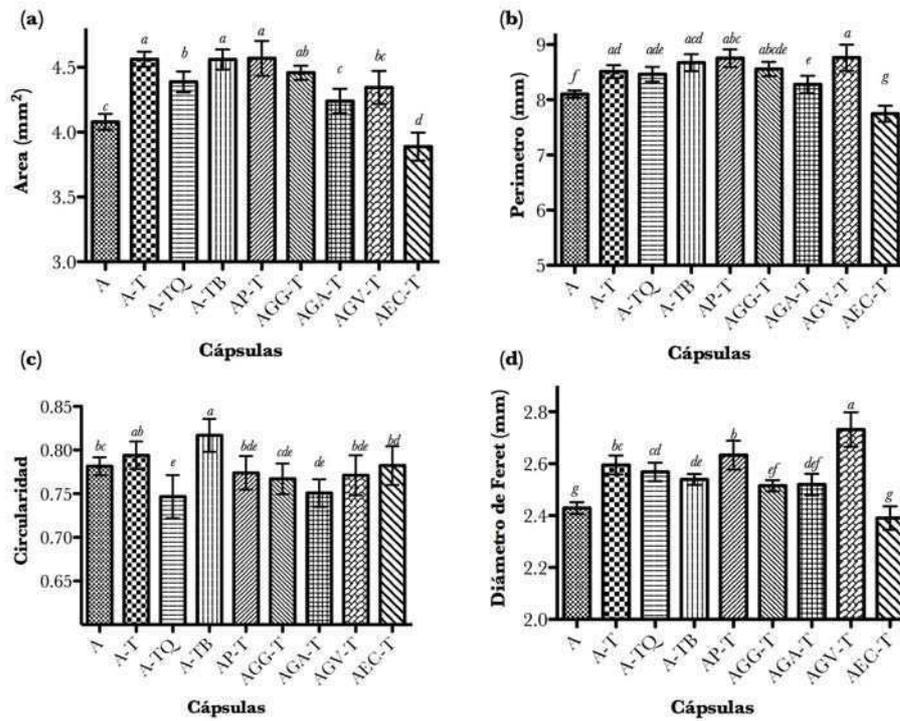


Figura 4.17. (a) Área (b) perímetro (c) circularidad y (d) diámetro de Feret obtenidos por análisis de imagen de las cápsulas congeladas en relación con la composición de las cápsulas. Se indican los intervalos de confianza al 95%. Las diferentes letras sobre las columnas (a-g) indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ .

Las cápsulas congeladas fueron comparadas con las cápsulas húmedas para los cuatro parámetros analizados, y sus resultados se muestran en la Figura 4.19. Se observó que en la mayoría de las cápsulas, el área disminuyó luego de la congelación con respecto a la de las cápsulas húmedas. En cambio, el perímetro y el diámetro mostraron mayores valores para las cápsulas congeladas que para las húmedas. Las cápsulas de alginato (A) mostraron una tendencia inversa respecto al de la mayoría de los sistemas, que puede estar relacionada fundamentalmente a la ausencia de trehalosa en estos sistemas.

Para los valores de circularidad, las cápsulas congeladas tendieron a valores similares de circularidad, mientras que los valores obtenidos para las cápsulas húmedas

fueron más dispersos. Por lo tanto, no se observó una única tendencia: hay tres sistemas en los que aumentó la circularidad (A, A-T y AGV-T), tres sistemas que mantuvieron la misma circularidad (A-TB, AP-T AGG-T) y tres sistemas que disminuyeron su circularidad (A-TQ AGA-T y AEC-T).

En cuanto al diámetro de Feret la tendencia en la mayoría de casos fue que el diámetro fue mayor en las cápsulas congeladas que en las húmedas, salvo en el sistema A, que es menor.

La congelación provocó modificaciones en las características de las cápsulas debido principalmente a que el agua presente en las cápsulas sale de ellas al descongelarse; sin embargo, esos cambios fueron específicos y dependieron de la composición del sistema.

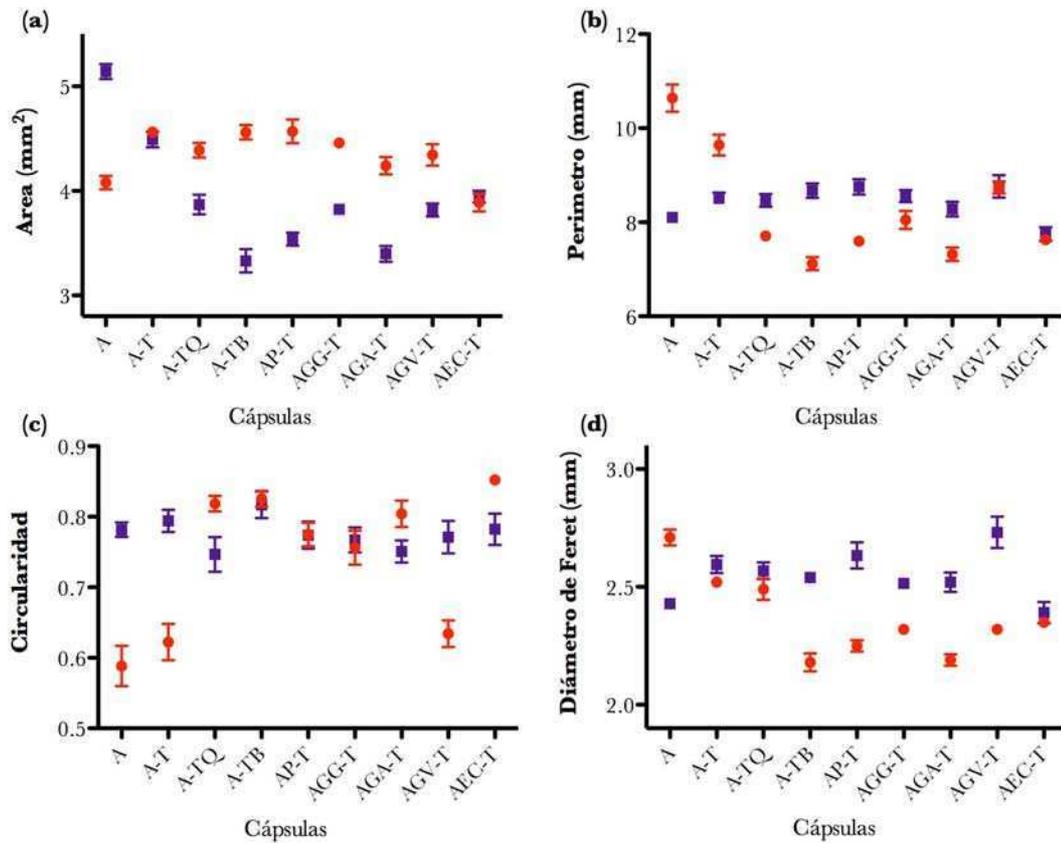


Figura 4.18. Estudio comparativo de cápsulas húmedas (●) y congeladas (■) de parámetros de Área (a), perímetro (b), circularidad (c) y diámetro de Feret (d) obtenidos por análisis de imagen de las cápsulas húmedas en relación con la composición. Se indican los intervalos de confianza al 95%.

#### 4.4.2. DESHIDRACIÓN DE CÁPSULAS DE LICOPENO.

Para obtener cápsulas deshidratadas se utilizaron dos métodos de secado: por liofilización y por vacío. Se sabe que dichos métodos provocan reducciones de tamaño diferentes, así como provocan diferentes resultados en cuanto a la conservación de agentes lábiles (Santagapita y col., 2011 y 2012).

Las cápsulas deshidratadas fueron caracterizadas según su contenido y actividad de agua y su forma y tamaño. Los valores de contenido de agua y el  $a_w$  de las cápsulas se muestran en la Tabla 4.7.

Se utilizaron 2 métodos para determinar el contenido de agua en las muestras deshidratadas: titulación de agua (Karl Fischer) y análisis de muestras por NIR. Ambos métodos de análisis están explicados en la sección de materiales y métodos 3.2.5.b. y 3.2.5.c, respectivamente.

*Tabla 4.7. Contenido de agua (en base húmeda-bh-) determinado por Karl-Fischer y mediante espectroscopía NIR y  $a_w$  de cápsulas de polielectrolitos deshidratadas por liofilizado y secado al vacío. Las diferentes letras (a-d) indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ .*

Cápsula	Liofilizadas			Secadas al vacío		
	CA (% bh) (Karl-Fischer)	CA (% bh) (NIR)	$a_w$	CA (% bh) (Karl-Fischer)	CA (% bh) (NIR)	$a_w$
A	2,39 ± 0,01 (f)	1,07 ± 0,07 (f)	0,346 ± 0,004 (e)	2,776 ± 0,008 (e)	1,28 ± 0,10 (g)	0,41 ± 0,01 (a)
A-T	2,85 ± 0,03 (c)	2,46 ± 0,08 (c)	0,339 ± 0,001 (e)	2,896 ± 0,006 (d)	2,76 ± 0,02 (d)	0,400 ± 0,001 (d)
A-TQ	2,71 ± 0,02 (e)	2,52 ± 0,08 (c)	0,345 ± 0,004 (e)	2,78 ± 0,02 (e)	1,52 ± 0,03 (f)	0,406 ± 0,006 (b)
A-TB	2,30 ± 0,03 (g)	1,79 ± 0,03 (e)	0,363 ± 0,001 (d)	2,46 ± 0,04 (g)	3,65 ± 0,05 (a)	0,402 ± 0,008 (c)
AP-T	2,77 ± 0,01 (d)	3,88 ± 0,01 (a)	0,394 ± 0,005 (b)	2,53 ± 0,02 (f)	2,91 ± 0,01 (c)	0,402 ± 0,006 (c)
AGG-T	2,747 ± 0,002 (d)	2,8 ± 0,2 (b)	0,376 ± 0,009 (c)	3,918 ± 0,009 (a)	3,3 ± 0,2 (b)	0,404 ± 0,008 (c)
AGA-T	3,206 ± 0,007 (a)	2,8 ± 0,2 (b)	0,362 ± 0,007 (d)	3,02 ± 0,02 (c)	2,6 ± 0,1 (e)	0,397 ± 0,007 (e)
AGV-T	2,79 ± 0,01 (d)	2,42 ± 0,01 (d)	0,406 ± 0,002 (a)	3,79 ± 0,08 (d)	2,77 ± 0,08 (d)	0,395 ± 0,002 (e)
AEC-T	2,99 ± 0,06 (b)	2,9 ± 0,3 (b)	0,366 ± 0,001 (d)	2,19 ± 0,06 (h)	2,8 ± 0,1 (d)	0,41 ± 0,04 (a)

Los resultados de contenido de agua por Karl Fischer, que es una de las técnicas más utilizadas para la determinación de agua en sistemas deshidratados, mostraron un bajo contenido de agua en las muestras, a priori discrepante con los elevados valores de  $a_w$  obtenidos.

Es por ello que fue conveniente realizar otro método de medición de contenido de agua, por lo que se seleccionó la adquisición de espectros NIR y posterior análisis

quemométrico como método. Los resultados obtenidos se reportan en la Tabla 4.7. El desarrollo de las curvas de calibración y modelos obtenidos se encuentra en el anexo 6.1. Si bien los resultados obtenidos por NIR y Karl-Fischer difieren en algunos casos, el orden de magnitud obtenido es el mismo, por lo que realmente las cápsulas obtenidas por los dos métodos de secado resultaron muy deshidratadas. Si bien es posible realizar un análisis pormenorizado de los valores de contenido de agua entre las muestras liofilizadas y las secadas al vacío y entre las diferentes composiciones de las cápsulas, es más importante resaltar que todas las cápsulas poseían un contenido de agua realmente muy bajo, alrededor del 2-3 %, y con un valor máximo de 3,9 %.

En líneas, generales, los valores de  $a_w$  obtenidos para las muestras liofilizadas fueron menores que los de las muestras secadas al vacío. Sin embargo, en ambos casos los valores de  $a_w$  obtenidos fueron elevados respecto a lo que se espera de un producto deshidratado con tan bajo contenido de agua. Se requerirá la realización de una isoterma de sorción de agua completa partiendo tanto de producto deshidratado como húmedo humidificado a diferentes humedades relativas para clarificar esta aparente discrepancia.

Una vez obtenidas las cápsulas deshidratadas por ambos métodos, se estudió el efecto de la deshidratación sobre la concentración de licopeno analizando su comportamiento según los cambios en la composición. Al igual que para las cápsulas húmedas, las cápsulas deshidratadas se someten a una extracción, con solventes y previa adición de citrato de potasio 1 %p/v como se explicó en la secciones 3.2.a. Cabe resaltar que las cápsulas deshidratadas tardaron entre 15 y 20 minutos más en la extracción del licopeno con el agente secuestrante (citrato de potasio) respecto a las

cápsulas húmedas. Al igual que en las cápsulas húmedas para el sistema A-TQ, las cápsulas permanecieron parcialmente estables, como se discutió anteriormente. La Figura 4.20 muestra los valores de concentración de licopeno de las cápsulas deshidratadas por ambos métodos liofilización y por vacío, expresados como remanente de licopeno normalizado por los valores obtenidos a tiempo cero (Figura 4.6). En esta Figura (4.20) se observó que, en líneas generales, los comportamientos de las diferentes cápsulas son similares en ambos tipos de secado, con algunas excepciones. En el caso de las cápsulas de alginato (A), la concentración de licopeno disminuyó casi un 90% durante el tratamiento de secado al vacío (Figura 4.20a), y casi un 80 % luego de la liofilización (Figura 4.20b). En general se observó que la adición de un segundo biopolímero o azúcar puede aumentar la retención de licopeno durante la deshidratación y proveerle de protección al componente encapsulado. Los sistemas que mayor retención de licopeno mostraron fueron las cápsulas A-TB, AGG-T y AGA-T para ambos tratamientos, y AEC-T también para las cápsulas liofilizadas. Esto se condice con los resultados observados durante la congelación de las cápsulas, donde estos mismos sistemas fueron aquellos con mayor contenido de licopeno remanente.

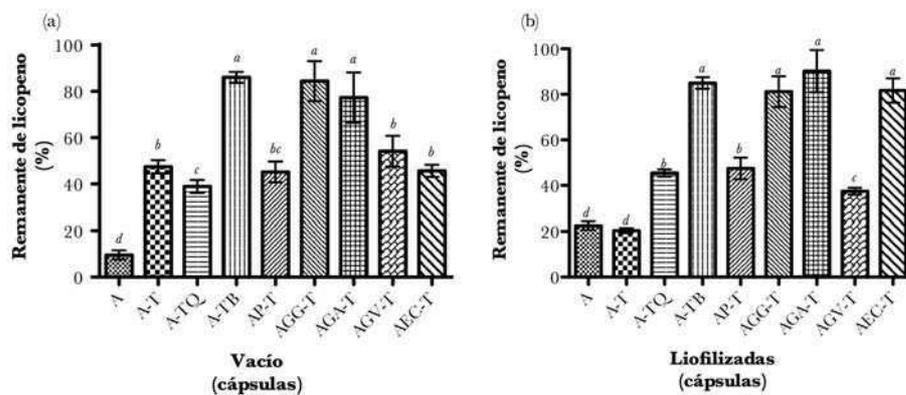


Figura 4.19. a. Porcentaje de licopeno remanente en cápsulas secadas al vacío (a) y por liofilización (b). El contenido remanente de licopeno se calcula a través de la relación entre el contenido de licopeno en cada tratamiento

respecto del contenido de licopeno obtenido a tiempo cero, para todos cápsulas de polielectrolitos. Las diferentes letras sobre las columnas (a-d) indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ .

Para analizar características del licopeno encapsulado, una vez obtenidos los espectros se realizó el cálculo para determinar la estructura fina del licopeno encapsulado, como se muestra en la Figura 4.21.

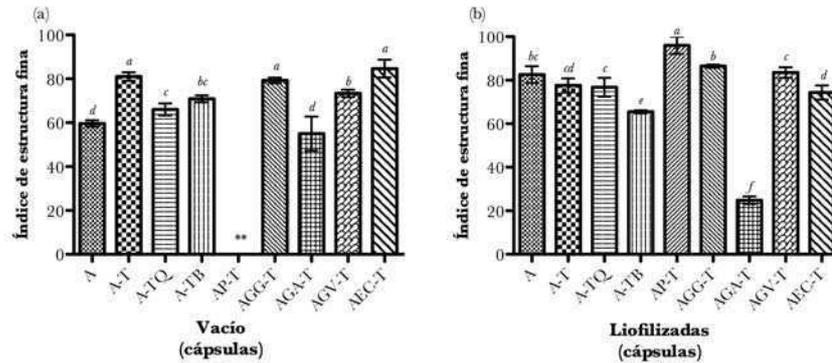


Figura 4.20. Análisis de la estructura fina espectral del licopeno presente en las cápsulas de polielectrolitos deshidratadas por secado al vacío (a) y liofilización (b). Las diferentes letras sobre las columnas (a-f) indican diferencias significativas entre los valores, con  $p < 0,05$ . \*\*el valor de pectina para el tratamiento de vacío no corresponde al de licopeno all-trans ya que este se isomerizó.

En líneas generales, se observó una mayor pérdida de la estructura fina (y por lo tanto, de licopeno *all-trans*) en las cápsulas secadas al vacío respecto a las liofilizadas, con algunas excepciones.

Los sistemas que conservan un mayor contenido de licopeno remanente luego del secado (A-TB, AGG-T y AGA-T) mostraron una aceptable conservación de la estructura fina de los espectros, especialmente para las cápsulas de AGG-T, con índices III/II% mayores al 80 % respecto a los tiempos iniciales. De estos tres sistemas, las cápsulas formuladas con goma arábiga AGA-T fueron aquellas que mostraron la mayor reducción de este índice, especialmente en las muestras secadas al vacío, donde no se obtiene una adecuada conservación. En las cápsulas de licopeno por vacío (Figura 4.20.a), las cápsulas A-T, AGG-T y AEC-T, son aquellas que mejor mantienen la

estructura del licopeno (en un 80%), lo cual indicaría que para este caso son las matrices que mejor protegen al licopeno para que este no pierda sus características, siendo sólo una de estas tres cápsulas (AGG-T) las que contienen un remanente de licopeno elevado (mayor al 80%), como fue comentado previamente. Para el resto de sistemas, salvo el AT-P secado al vacío que se comentará más adelante, el índice de estructura fina fue superior al 50% para las cápsulas secadas al vacío y mayor al 60% para las liofilizadas, lo que indica que las matrices utilizadas para el tratamiento de vacío fueron relativamente adecuadas.

Si bien asumimos una distribución homogénea del licopeno en toda la cápsula, es posible que durante el almacenamiento el licopeno pueda migrar desde el interior de las cápsulas hacia la superficie de las mismas, quedando más expuesto a ser isomerizado por oxígeno/aire, luz o temperatura (observándose un cambio de color concomitante, hacia el amarillo) o, peor aún, degradado por estos mismos agentes (Britton, 1995), que se observó en la pérdida de color (cápsulas blancas o cuasi transparentes, en el caso de las deshidratadas).

Un caso particular se observó para las cápsulas conteniendo pectina (AP-T) para el tratamiento de secado en vacío. En la Figura 4.22 se muestran los espectros obtenidos para estas cápsulas a tiempo cero y luego del secado. Se observó un cambio drástico en la forma espectral de las bandas, debido a una isomerización del licopeno, produciendo valores de  $III/II\%$  negativos debido a que la base para la determinación de los picos de 503 y 472 nm da mayor que el valor obtenido en 503 nm (Figura 4.22). Por lo tanto, estas cápsulas muestran una pérdida total de licopeno *all-trans*, lo que no implica que el contenido de licopeno (sumando a todos los posibles isómeros) no pueda ser calculado.

Esta isomerización se ve reflejada en el aumento de absorbancia de los dos picos más cercanos a 400 nm (425 y 447 nm), como se muestra en la Figura 4.22.

Por lo tanto, el uso de pectina en la elaboración de las cápsulas AP-T que serán secadas al vacío no es adecuado si se quiere preservar al licopeno en la mayor cantidad y en su forma más natural, que es uno de los principios de la encapsulación de componentes activos naturales (Arica y col., 2002).

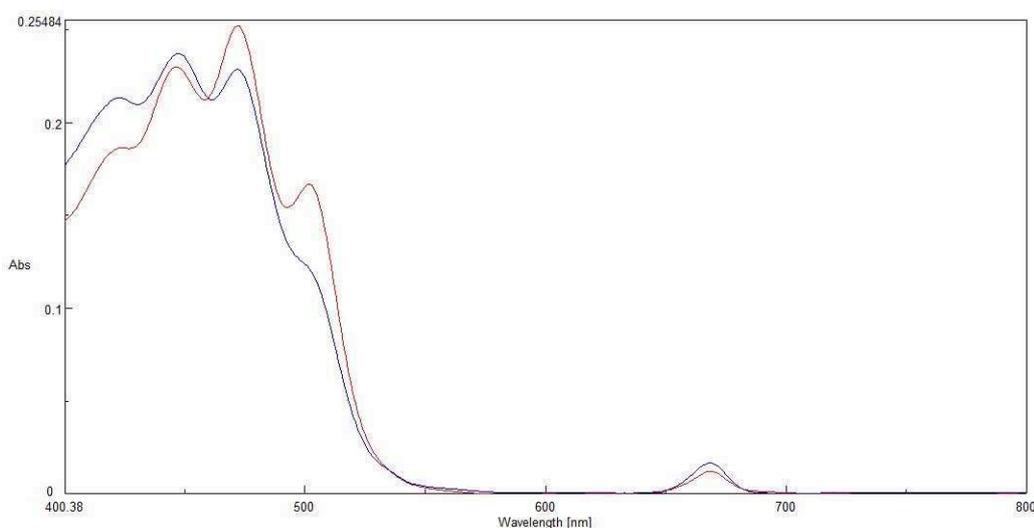


Figura 4.21. Espectros de absorción UV/Vis. Línea azul: cápsulas AP-T secadas al vacío; línea roja: cápsulas AP-T a tiempo cero.

En forma similar a lo realizado en las cápsulas húmedas, se estudiaron los tiempos de relajación y los coeficientes de difusión por *LF-NMR*.

Los tiempos de relajación  $T_2$  fueron medidos utilizando la misma secuencia CPMG utilizada para las cápsulas húmedas, de forma tal de entender los cambios en los dos tiempos antes obtenidos (entre 50 y 72 ms y entre 164-210 ms, Tabla 4.2), que se atribuyeron a contribuciones tanto del agua – interaccionando con los biopolímeros y azúcares en el gel- y el aceite.

La Tabla 4.8 muestra los valores de  $T_2$  obtenidos para las cápsulas liofilizadas conteniendo licopeno. Se muestran sólo estos valores dado que los obtenidos para las cápsulas secadas al vacío fueron similares y las cápsulas liofilizadas mostraron mejor conservación del índice III/II%. Las curvas de decaimiento obtenidas fueron muy similares a la reportada en la Figura 4.12. En todos los casos es posible observar una disminución tanto en ambos  $T_2$  (particularmente en los tiempos  $T_{21}$ ), y una modificación en las amplitudes obtenidas respecto a las cápsulas húmedas (Tabla 4.2). La reducción en las amplitudes y en los tiempos correspondió a la remoción de agua durante el secado. Los resultados obtenidos por los dos métodos de secado no mostraron diferencias significativas entre sí respecto a los tiempos de relajación. Sin embargo, la remoción de agua no ocasionó la desaparición de alguno de los  $T_2$ , o un cambio substancial post-secado, por lo que se confirmó que los tiempos analizados para las cápsulas húmedas corresponden a una contribución mixta del agua interaccionando con los biopolímeros y azúcares en el gel- y el aceite. Una vez deshidratadas, las contribuciones remanentes serán puramente las del aceite, dado que las contribuciones de los protones de los sólidos solubles (carbohidratos y biopolímeros) son más rápidas, y por lo tanto quedan por fuera de la detección de la secuencia empleada.

Además, se observó una reducción en las amplitudes  $A_{21}$  y  $A_{22}$  respecto a las cápsulas A-T en aquellas muestras con mejor conservación del contenido de licopeno (AGG-T, AGA-T, A-TB, AEC-T), y valores similares o aún mayores para las muestras con menor conservación de licopeno. De cualquier modo, existen otros mecanismos específicos además de la reducción de los cambios en la movilidad, como puede ser por ejemplo la complejación producida por la  $\beta$ -CD.

Tabla 4.8. Tiempos de relajación ( $T_2$ ) y amplitudes ( $A_2$ ) obtenidos mediante ajuste bi-exponencial de las curvas de decaimiento de las cápsulas liofilizadas conteniendo licopeno mediante LF-NMR.

Cápsulas	Amplitud <sub>21</sub> (%)	$T_{21}$ (ms)	Amplitud <sub>22</sub> (%)	$T_{22}$ (ms)
A	42 ± 4 (a,b)	55,1 ± 0,9 (a,b)	40 ± 2 (a)	158 ± 2 (b)
A-T	46 ± 2 (b)	54,0 ± 0,8 (a,b)	43 ± 1 (a)	157 ± 2 (b)
A-TQ	49 ± 8 (a,b)	52 ± 1 (b)	29 ± 4 (c)	164 ± 3 (a)
A-TB	43 ± 2 (a,b)	55,7 ± 0,5 (b)	41,5 ± 0,9 (a)	160 ± 2 (b)
AP-T	47 ± 7 (a,b)	54 ± 2 (a,b)	43 ± 3 (a)	155 ± 6 (b,c)
AGG-T	40,7 ± 0,9 (a,b)	54,6 ± 0,9 (a,b)	38 ± 1 (a,b)	155 ± 2 (b)
AGA-T	37,2 ± 0,8 (a)	53,5 ± 0,9 (a,b)	37 ± 1 (a,b)	155 ± 2 (b)
AGV-T	37,9 ± 0,8 (a)	53,7 ± 0,9 (a,b)	38,5 ± 0,9 (a,b)	156 ± 2 (b)
AEC-T	35 ± 3 (a)	53 ± 1 (a,b)	35 ± 2 (a,b)	151 ± 5 (b)

Por otro lado, se determinaron los coeficientes de difusión, empleando la misma secuencia que para las cápsulas húmedas. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.9 para las cápsulas liofilizadas, y son un orden de magnitud menor a los reportados para las cápsulas húmedas. Su determinación resultó mucho más compleja debido a que las amplitudes medidas con y sin gradiente fueron muy similares. Esa complejidad se refleja en los altos valores de los desvíos estándar obtenidos. Considerando el valor reportado para aceites comestibles (cerca de  $9 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$  (Šmejkalová y Piccolo, 2010)), los valores hallados se aproximan y son cercanos a estos, pero son superiores (entre  $5,1$  y  $1,1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ). Esto puede deberse a las diferentes técnicas empleadas; además, con la técnica empleada no es posible medir coeficientes de difusión tan pequeños, por lo que los valores determinados se encuentran muy cerca del límite de detección, incrementando el error.

Tabla 4.9. Estudio de los coeficientes de difusión  $D$  ( $\cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s) a 25°C en cápsulas liofilizadas conteniendo licopeno determinados por LF-NMR.

Cápsulas	D ( $\cdot 10^{-9}$ m <sup>2</sup> /s)
A	0,011 $\pm$ 0,003 <sup>(a)</sup>
A-T	0,05 $\pm$ 0,02 <sup>(a)</sup>
A-TQ	0,018 $\pm$ 0,005 <sup>(a)</sup>
A-TB	0,022 $\pm$ 0,003 <sup>(a)</sup>
AP-T	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>(a)</sup>
AGG-T	0,01 $\pm$ 0,02 <sup>(a)</sup>
AGA-T	0,026 $\pm$ 0,004 <sup>(a)</sup>
AGV-T	0,017 $\pm$ 0,008 <sup>(a)</sup>
AEC-T	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>(a)</sup>

Las cápsulas deshidratadas se caracterizaron respecto a su forma y tamaño a través de análisis de imagen, de igual manera que fue realizada con las cápsulas húmedas y congeladas, con el fin de determinar el efecto que tiene el tratamiento sobre la estructura física de las cápsulas. Los parámetros analizados (área, perímetro, diámetro y circularidad) se muestran en la Figura 4.23 para las cápsulas deshidratadas por liofilización y la Figura 4.24 para las cápsulas deshidratadas por vacío.

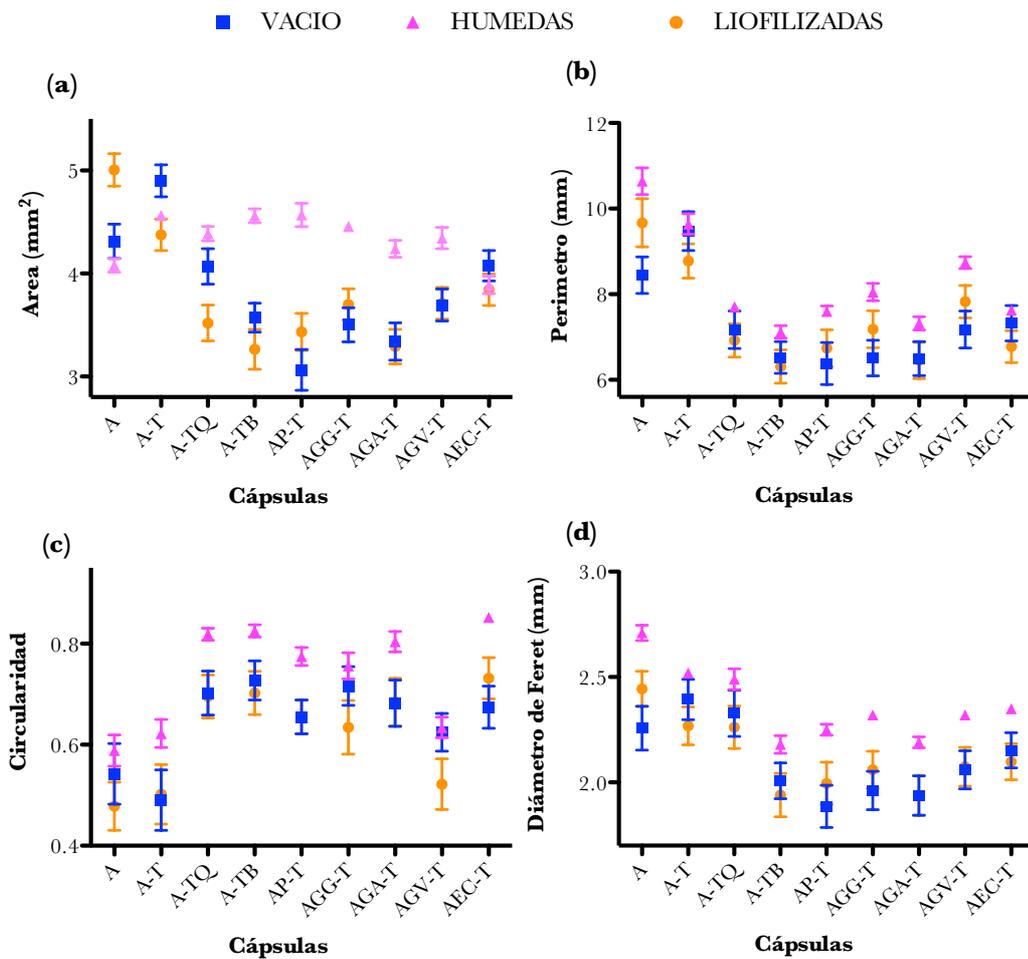


Figura 4.22. Estudio comparativo del área (a), perímetro (b), circularidad (c) y diámetro de Feret (d) respecto a las cápsulas húmedas, obtenidos por análisis de imagen de los diferentes sistemas en relación con la composición. Se indican los intervalos de confianza al 95%.

De acuerdo con el estudio comparativo realizado en la Figura 4.22, en general se observó que en perímetro, diámetro de Feret y circularidad hubo una disminución de los valores de las cápsulas deshidratadas con respecto a la húmedas. Este comportamiento también se observó para el área (Figura 4.22a), aunque no en todos los sistemas: dos de ellos (A y A-T) presentaron un aumento en el valor del área (dependiente de la composición y del tipo de secado). Los valores de circularidad luego de la deshidratación disminuyeron significativamente con respecto a las cápsulas húmedas, generando cápsulas menos esféricas.

Si bien se observaron disminuciones en el diámetro de Feret, los cambios observados para las cápsulas secadas al vacío fueron mucho menores que los reportados por Santagapita (2010), que observó hasta un 50% de reducción del tamaño de las cápsulas preparadas con diferentes excipientes. Esto se debe probablemente a la gran cantidad de aceite que tienen las cápsulas, lo que les permite deshidratarse con una reducción mínima del tamaño. Por otro lado, dado que la circularidad se vio muy afectada por la salida del agua durante la deshidratación, es posible pensar en una distribución homogénea del agua. Estudios de microscopía FT-IR podían dilucidar esta hipótesis. Se intentaron observar las cápsulas por microscopía electrónica de barrido (*SEM*) pero no fue posible obtener imágenes debido a la gran cantidad de aceite presente en las mismas, que ocasionaba corrientes que impedían la correcta visualización de la superficie de las cápsulas, aún metalizadas con platino.

#### **4.5. ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE LICOPENO ENCAPSULADO.**

Otro de los aspectos a tener en cuenta en la encapsulación es la liberación controlada de los componentes funcionales. Muchos autores estudian la liberación controlada en condiciones *in vitro* emulando la digestión del alimento es ingerido (estómago, tracto gastrointestinal), de forma tal que los constituyentes encapsulados que son inestables permanezcan intactos en el estómago y luego puedan liberarse en el intestino en un rango de valores específicos de pH (Lakkis y col., 2008).

La liberación controlada tiene en cuenta las características de la matriz, de modo que estas sean controlables, pero se debe asegurar que no interfiera con el biocompuesto encapsulado, y además se logre desintegrar una vez finalizada la liberación. Debido a esto, se utilizan algunas matrices como hidrocoloides o biopolímeros para realizar el

control de liberación de agentes biológicos tales como proteínas y fármacos (Sinha y col., 2003; Gombotz y col., 1998; Lisa, 1995). Para estudios de liberación controlada se tiene especial cuidado en el tipo de mecanismo de liberación que interviene entre la cápsula y el compuesto encapsulado tal como ruptura de la pared celular, disolución de la pared, derretimiento de la pared y difusión a través de la pared (Vidhyalakshmi y col., 2009).

La difusión es un mecanismo de liberación común en cápsulas de alginato que contienen biocompuestos que difieren en el peso molecular. El tamaño de poro del gel, reflejado por la viscosidad del vehículo, debido al tamaño de la molécula y/o su concentración puede afectar la difusión de los componentes o productos y limitar la velocidad de reacción de las sustancias encapsuladas. El tamaño de poro es un parámetro crítico para seleccionar la matriz que protege al biocompuesto. Las sustancias de bajo peso molecular, pueden difundir fácilmente hacia o desde una matriz con poros grandes. Poros grandes causan problemas ya que permiten que el biocompuesto encapsulado salga sin control alguno (Tanaka y col., 1983). El análisis de microcápsulas de alginato-calcio por microscopía electrónica mostró que los poros poseen un diámetro entre 5 nm hasta 200 nm (Andresen y col., 1977). Santagapita (2010) observó poros en las superficies de cápsulas de alginato deshidratadas con un tamaño entre 30 y 100 nm, dependiendo del método de deshidratación, mostrando la influencia de los mismos en la liberación del biocompuesto.

El modelado matemático de liberación controlada de drogas a partir de sistemas poliméricos ha sido ampliamente estudiado durante las últimas décadas, principalmente en el campo farmacéutico (Peppas y col., 2000; Siepmann y Peppas, 2001; Lin y

Metters, 2006). Muchos de los modelos han sido desarrollados a partir de las soluciones de la ecuación de difusión de Fick. La solución exacta de la ecuación de Fick es complicada (Crank, 1975) y se han propuesto modelos que simplificaron el análisis de la liberación controlada. Uno de los más empleados es una ecuación semiempírica que relaciona la liberación fraccional de una droga con el tiempo (Ecuación 4.1) (Korsmeyer y col., 1983; Peppas, 1985; Sinclair y Peppas, 1984; Ritger y Peppas, 1987a y b; Deladino y col., 2008; Coppi y Iannuccelli, 2009) y que es posible adaptar al material en estudio de la siguiente manera:

$$\frac{L_t}{L_\infty} = kt^n \quad \text{Ecuación 4.1}$$

donde:  $L_t$  = contenido del licopeno liberado a tiempo determinado;  $L_\infty$  = contenido máximo que corresponde a la liberación total del licopeno.  $k$  es una constante relacionada con las características geométricas, estructurales y la red macromolecular del sistema y el agente liberado de las cápsulas (en  $s^{-n}$ ),  $t$  es el tiempo (en  $s$ ) y  $n$  es indicativo del tipo de mecanismo de liberación (adimensional).

La expresión generalizada de la ecuación 4.1 fue empleada para estudiar la liberación de distintas sustancias contenidas en cápsulas húmedas de características similares a las del presente trabajo (Santagapita y col., 2011; Fu y Soboyejo, 2010; Shu y col., 2010; Coppi y Iannuccelli, 2009; Deladino y col., 2008; Pasparakis y Bouropoulos, 2006). La aplicación de la ecuación 4.1 asume difusividades independientes de la concentración y cambios en los volúmenes de las cápsulas menores al 25 % durante la liberación del agente encapsulado (Peppas, 1985; Peppas y Korsmeyer, 1986).

Los límites de  $n$  para transporte difusional (o *fickiano*) se definen para cada geometría (Ritger y Peppas, 1987 a, b). En el caso de esferas, para polímeros que no se hinchan al humedecerse, la difusión *fickiana* (o “transporte caso I” según Alfrey y col., 1966) está definida para valores de  $n = 0,43$ . En este caso la velocidad de difusión es menor que la velocidad de relajación de las cadenas del polímero en el que la sustancia difunde. En el otro extremo, valores de  $n = 1$  indican una liberación independiente del tiempo, o de orden cero, conocida en la ciencia de polímeros como “transporte caso II” (Alfrey y col., 1966). Este caso corresponde a situaciones en las que la difusión es mucho más rápida que la velocidad de los procesos de relajación. Valores de  $n$  entre 0,43 y 1 indican un mecanismo de transporte anómalo o mezclado (mezcla de difusión *fickiana* y orden cero), en el que la velocidad de difusión y relajación son comparables.

En condiciones de difusión *fickiana* ( $n = 0,43$  para esferas), Ritger y Peppas (1987 a, b) plantearon soluciones simplificadas a la 2da ley de Fick para varias geometrías y condiciones de contorno y para tiempos cortos, que son aquellos que corresponden a una liberación fraccional menor que 0,6 (ecuación 4.2), pudiendo calcular el coeficiente de difusión.

$$\frac{L_t}{L_\infty} = 4 \left( \frac{Dt}{\pi R^2} \right)^n \tag{Ecuación 4.2}$$

donde  $R$  es el radio medio de las cápsulas (cm),  $D$  es el coeficiente de difusión efectivo y  $n = 0,43$  (calculado con la ecuación 4.1). Relacionando las ecuaciones 4.1 y 4.2, se obtiene la ecuación 4.3.

$$D = \left( \frac{K}{4} \right)^n * \pi R^2 \tag{Ecuación 4.3}$$

A partir de los valores de  $k$  y  $n$  ajustados mediante la ecuación 4.1, cuando el

caso de transporte corresponde a difusión *fickeana* ( $n = 0,43$ ) y el radio de las cápsulas es conocido, se puede calcular el  $D$  con la ecuación 4.3.

La ecuación 4.1 describió adecuadamente los datos experimentales en la primera parte de las curvas, como muestran las líneas llenas de la Figura 4.24. Los parámetros  $n$ ,  $k$  y  $D$  obtenidos mediante el ajuste con las ecuaciones 4.1 y 4.3 se muestran en la Tabla 4.10. Los coeficientes de correlación obtenidos de esta forma para el cálculo de  $n$  y  $k$  fueron mayores que 0,95. El valor de  $D$  se calculó para los casos de difusión *fickeana* ( $n \sim 0,43$ ), como se reporta en Tabla 4.10.

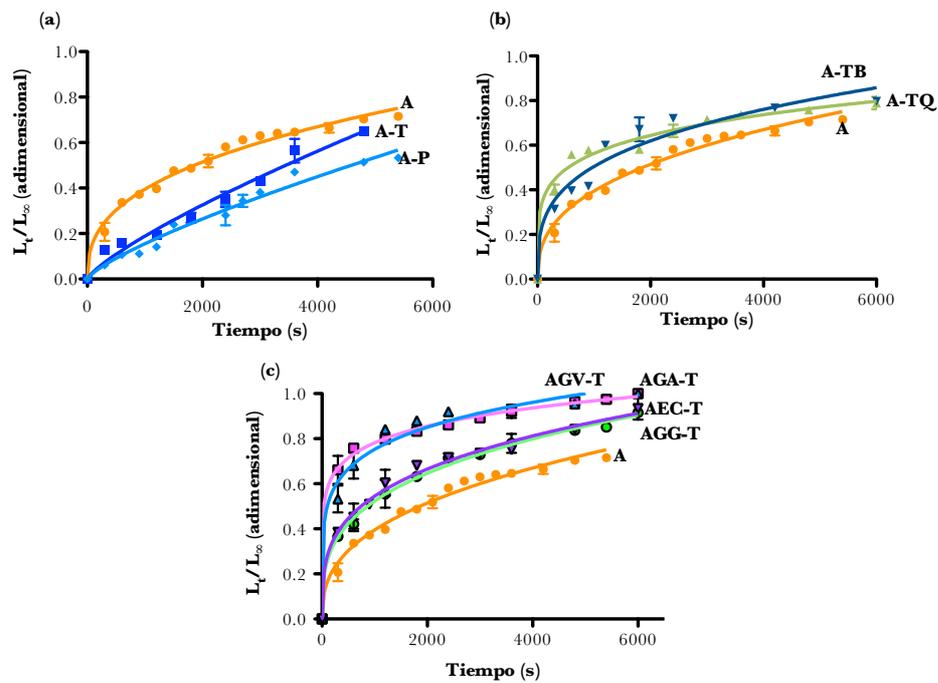


Figura 4.23. Liberación del licopeno en mezcla de solventes (hexano, acetona y etanol, en proporción 50:25:25) en función del tiempo de extracción. La liberación del licopeno se expresa como la relación entre la cantidad de licopeno que se libera en el tiempo respecto a la cantidad total presente en las cápsulas. Las líneas llenas muestran los ajustes obtenidos mediante la ecuación de Peppas (ecuación 4.1) para los valores experimentales (representados por símbolos). La curva de liberación obtenida para las cápsulas A se repite en los tres gráficos a modo comparativo.

Tabla 4.10. Parámetros  $n$  y  $k$  obtenidos a través del ajuste de la ecuación semiempírica (ecuación 4.1), tipo de transporte y coeficiente de difusión calculado según ecuación 4.3. \* Correspondería a difusión fickeana según lo asignado por otros autores.

Cápsula	N° ptos	$k$ ( $s^{-n}$ )	$n$	Tipo de transporte	$D$ ( $\cdot 10^{-11}$ m <sup>2</sup> /s)
A	9	$0,018 \pm 0,004$	$0,44 \pm 0,03$	Difusión fickeana	2,7
A-T	8	$0,0008 \pm 0,0006$	$0,8 \pm 0,1$	Anómalo	-
A-TQ	5	$0,10 \pm 0,05$	$0,25 \pm 0,07$	Difusión fickeana*	-
A-TB	5	$0,02 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,1$	Difusión fickeana	4,6
AP-T	12	$0,0011 \pm 0,0005$	$0,73 \pm 0,05$	Anómalo	-
AGG-T	5	$0,03 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,06$	Difusión fickeana	4,8
AGA-T	11	$0,32 \pm 0,01$	$0,130 \pm 0,005$	Difusión fickeana*	-
AGV-T	8	$0,23 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,03$	Difusión fickeana*	-
AEC-T	5	$0,06 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,05$	Difusión fickeana*	-

Como era esperable debido al tamaño del licopeno (unos pocos nm) y el diámetro promedio de los poros que normalmente se producen en cápsulas de alginato-Ca(II), y considerando el solvente utilizado para la extracción, las cápsulas A presentaron valores de  $n$  próximos a 0,43, indicando que la liberación de licopeno se produce por difusión. La inclusión de trehalosa provocó un cambio en el mecanismo de transporte del licopeno, obteniéndose un  $n$  cercano a 0,8, lo que indica que el transporte se limita tanto por la relajación de las cadenas de los polímeros como por la difusión, y ambos fenómenos intervienen en la liberación del licopeno en forma similar, situación que también se verificó en el sistema AP-T, que contiene pectina, otro polielectrolito aniónico como el alginato. Sin embargo, la presencia del resto de los excipientes utilizados perturbó la estructura de las cápsulas, generando sistemas de menor  $n$  en todos los casos. En presencia de  $\beta$ -ciclodextrina y goma guar (cápsulas A-TB y AGG-T), se obtuvieron  $n$  cercanos a 0,43, mientras que los valores de sistemas como A-TQ,

AGA-T, AGV-T y AEC-T, presentaron valores de  $n$  aún menores a 0,43. En estos casos, hubo una liberación de licopeno muy rápida, lo que se condice con lo propuesto por otros autores que encontraron que en los casos que se obtuvieron  $n < 0,43$  existen mecanismos combinados de difusión parcial a través de la matriz y además a través de poros llenos de solvente (Peppas, 1985). Coppi y Iannuccelli (2009) asimilaron este comportamiento al transporte caso I o *fickiano*.

## **5. CONCLUSIONES**

Las principales conclusiones que se pueden obtener de este trabajo de tesis son las siguientes:

La matriz seleccionada para la extracción de licopeno fue la pulpa liofilizada, que mostró el más alto contenido de licopeno por gramo de muestra seca y una estructura espectral adecuada del licopeno, que corresponde al licopeno *all-trans*. La ventaja obtenida utilizando esta matriz se debe a dos características principales: i) la estructura de la pulpa, que a diferencia del jugo retiene carotenoides en su matriz celular, pero que a diferencia de rodajas presente la matriz más degradada; ii) la eliminación previa del agua de la matriz permite concentrar los solutos, aumentando su disponibilidad y minimizando los volúmenes del agente extractor.

Se obtuvo un extracto rico en licopeno obtenido a partir de un proceso libre de solventes, adecuado para aplicaciones en la industria alimentaria, utilizando aceite de oliva como agente extractor.

Con el fin de conservar el extracto rico en licopeno, se realizaron emulsiones con soluciones de alginato conteniendo azúcares y biopolímeros que posteriormente fueron encapsuladas en cápsulas de polielectrolitos, que resultaron ser una buena estrategia para obtener formulaciones ricas en licopeno. Las cápsulas de alginato y aquellas suplementadas con trehalosa y quitosano o goma de vinal fueron las que mejor conservaron el contenido de licopeno, minimizando además los cambios en su estructura.

La forma y el tamaño de las cápsulas fueron fuertemente afectadas por la composición. La adición de un segundo biopolímero, de  $\beta$ -ciclodextrina o de trehalosa

provoca que las cápsulas sean más compactas, pero este hecho no necesariamente implica un aumento en la circularidad. Las cápsulas con goma arábiga o  $\beta$ -CD mostraron ser las de menor tamaño. Las cápsulas que contienen espina corona mostraron el mayor valor de circularidad.

Los componentes de las cápsulas fueron exitosamente determinados a través de estudios por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (*FT-IR*). Este estudio permite observar la interacción alginato-quitosano, y la presencia de cada uno de los componentes utilizados en la preparación de las cápsulas a partir de la identificación de sus bandas principales.

Se obtuvieron dos poblaciones de protones con sus respectivos tiempos de relajación  $T_2$  estudiados mediante resonancia magnética nuclear de bajo campo (*LF-NMR*). Ambas poblaciones poseen contribuciones tanto del aceite (empleado en la extracción de licopeno y posterior emulsificación) como del agua que intercambia fundamentalmente con los protones del alginato que forman la matriz gelificada y los biopolímeros y azúcares presentes. Debido a esto, resulta muy complejo predecir las interacciones agua-polisacáridos-//interfase//aceite-licopeno, y en última instancia, lograr comprender cómo se modifica la estabilidad del licopeno a partir de este análisis. Por otro lado, el estudio del coeficiente de difusión obtenido también mediante *LF-NMR*, que al igual que los  $T_2$  posee contribuciones tanto del agua como del aceite, mostró que menores valores de coeficiente de difusión conllevan a mayores valores de contenido de licopeno en las cápsulas, por lo que podría ser utilizado como un indicador rápido para predecir el contenido de licopeno en las mismas. Un menor valor de  $D$

posiblemente ponga de manifiesto algunas diferencias en la salida del licopeno desde las cápsulas durante su generación.

La congelación del licopeno presente en la pulpa fresca durante 24 hs ocasionó grandes pérdidas del mismo. La estrategia de encapsulación resultó ser muy adecuada para la conservación del licopeno, especialmente con las formulaciones conteniendo trehalosa con  $\beta$ -ciclodextrina, goma guar, arábica o espina corona. El utilizar cápsulas que contenían sólo alginato ocasiona pérdidas de licopeno entre el 50 y el 70% respecto a su contenido inicial.

De los dos métodos de congelación empleados (ciclos cortos con nitrógeno líquido y tratamiento continuo a 1 mes a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), el último resultó ser más perjudicial para el licopeno, afectando tanto su estabilidad como el contenido.

Los estudios de cristalización isotérmicos mostraron que la presencia de trehalosa en las cápsulas redujo notoriamente el contenido de agua congelada (a temperatura de *freezer*) así como el tiempo necesario para llegar al 50 % de cristalización (a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), lo que podría ser responsable de los mayores valores de contenido de licopeno obtenidos en estos sistemas respecto a los observados en las cápsulas conteniendo sólo alginato.

Las cápsulas de polielectrolitos fueron exitosamente deshidratadas, obteniendo sistemas de muy bajo contenido de agua (menores al 4 %). Los efectos de la deshidratación sobre el contenido de licopeno fueron muy similares en ambos tipos de secado. En el caso de las cápsulas de alginato (A), la concentración de licopeno disminuyó entre un 80 y un 90 % durante la deshidratación. La adición de un segundo

biopolímero o azúcar (además de la trehalosa) pudo aumentar la retención de licopeno durante la deshidratación y proveerle protección al componente encapsulado. Los sistemas que mayor retención de licopeno mostraron fueron las cápsulas conteniendo trehalosa con  $\beta$ -ciclodextrina, goma guar o arábica para ambos tratamientos, y además las cápsulas conteniendo trehalosa y espina corona en el caso de las liofilizadas. Esto se condice con los resultados observados durante la congelación de las cápsulas, donde estos mismos sistemas fueron aquellos con mayor contenido de licopeno remanente. Por otro lado, se observó una mayor pérdida de la estructura fina (y por lo tanto, de licopeno *all-trans*) en las cápsulas secadas al vacío respecto a las liofilizadas, por lo que la liofilización sería el método recomendado para la deshidratación.

Los valores de  $T_2$  y coeficientes de difusión mostraron menores valores respecto a los determinados para las cápsulas húmedas, que corresponden con la remoción de agua durante la deshidratación. Las dos poblaciones de protones halladas se deben a contribuciones mixtas de agua y aceite, confirmando los resultados obtenidos para las cápsulas húmedas. Si bien se observó una reducción en las amplitudes de las dos poblaciones de protones respecto a las cápsulas A-T en aquellas muestras con mejor conservación del contenido de licopeno (cápsulas conteniendo trehalosa con  $\beta$ -ciclodextrina, goma guar, arábica o espina corona), y valores similares o aún mayores para las muestras con menor conservación de licopeno, existen otros mecanismos específicos además de los cambios en la movilidad, como puede ser por ejemplo la complejación producida por la  $\beta$ -CD, independientemente de la movilidad final del sistema.

La presencia de aceite de oliva en las cápsulas redujo notoriamente la disminución de tamaño observada por otros autores durante la deshidratación, obteniendo cápsulas mucho más estables (desde el punto de vista físico) respecto de los tratamientos empleados en la presente tesis.

El empleo de una ecuación semiempírica permitió establecer ciertas características del proceso de liberación del licopeno. La composición de las cápsulas influye notablemente sobre el mecanismo de transporte de liberación. Por lo tanto, manejando adecuadamente esta variable, es posible lograr una liberación de velocidad controlada.

Los resultados de esta tesis pueden contribuir a la selección de excipientes para la formulación de cápsulas de polielectrolitos conteniendo no sólo licopeno sino biomoléculas lábiles en general, y pueden ser utilizados como punto de partida en varias aplicaciones tecnológicas.

## **6. ANEXO**

Los siguientes anexos muestran los resultados obtenidos con la medición de contenido de agua a través de los espectros NIR y análisis multivariado.

## 6.1. ESTUDIO DE CONTENIDO DE AGUA POR NIR.

### 6.1.1. CÁPSULAS DESHIDRATADAS

Se realizó una curva de calibración con emulsiones con aceite de oliva en el rango 1 a 5% de agua (solución al 1% p/v de alginato de sodio).

Los espectros crudos obtenidos para la emulsión y luego del pretratamiento se pueden ver en la Figura 6.1 a y b, respectivamente.

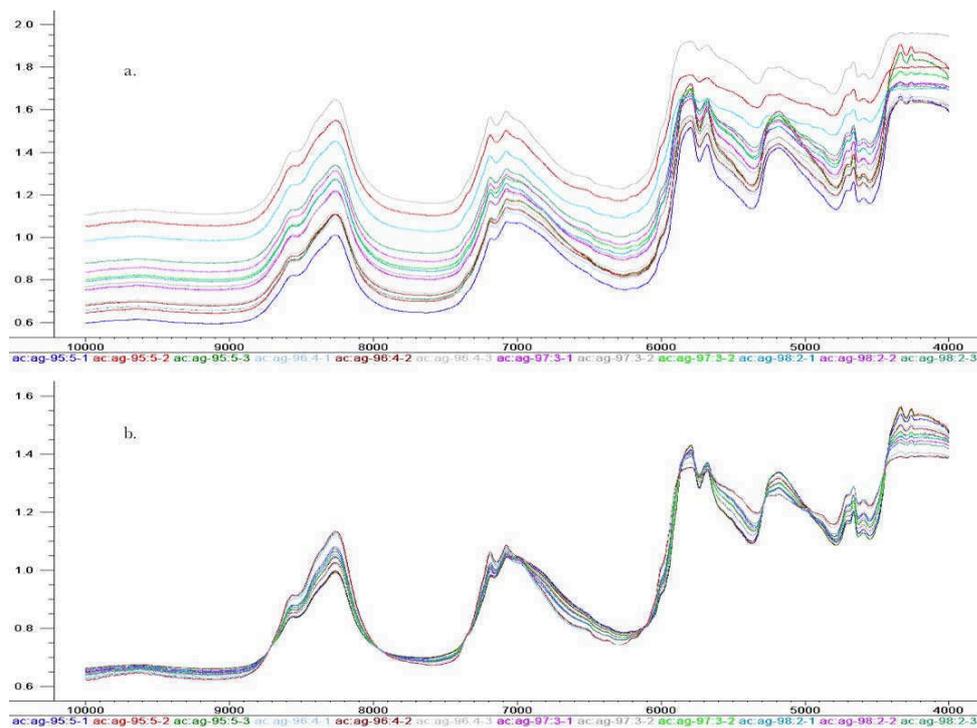


Figura 6.1. Espectros NIR obtenidos para preparación de curva de calibración con emulsiones. a. Espectros crudos b. Espectros normalizados.

Posteriormente, se obtuvo un modelo de regresión lineal utilizando el algoritmo PLS para predecir los valores de contenido de agua en las cápsulas. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 6.2.

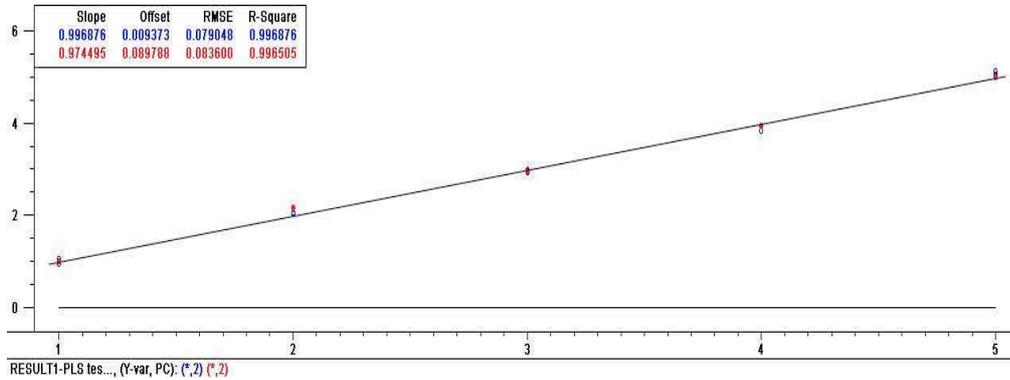


Figura 6.2. Curva de calibración obtenida del análisis espectral multivariado con algoritmo PLS.  $RMSE=0,079048$  y  $0,083600$  y  $R^2=0,996876$  y  $0,996505$  respectivamente.

La Figura 6.2 muestra que los valores de ajuste (errores medios de calibración y validación  $-RMSE-$  y  $R^2$ ) obtenidos fueron más que satisfactorios tanto para la calibración como para la validación del modelo. La Figura 6.3 muestra los *loadings* obtenidos, que indican que las zonas espectrales de mayor influencia en el modelo son aquellas que corresponden al agua (5200) y al aceite (5800), (Xiaobo y col., 2010)

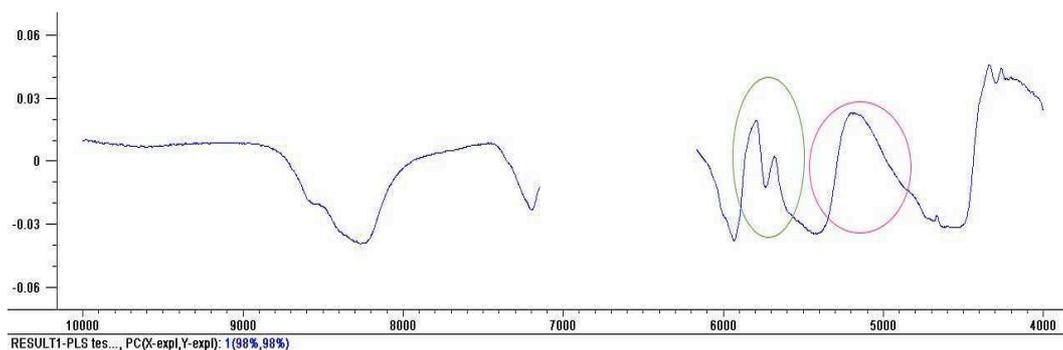


Figura 6.3. Loading para emulsiones 1-5%

La Figura 6.3 a y b muestra los espectros crudos obtenidos para las cápsulas deshidratadas por los dos métodos y luego del pretratamiento, respectivamente.

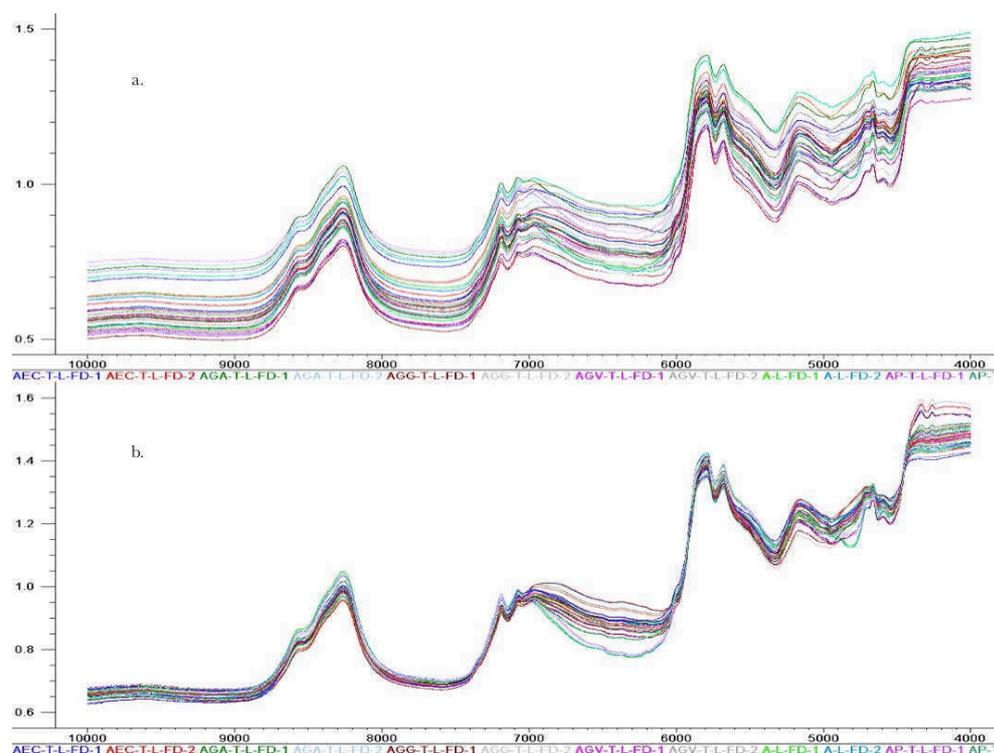


Figura 6.4. Espectros NIR obtenidos para predecir el contenido de agua en cápsulas deshidratadas

Los valores de contenido de agua para las cápsulas fueron predichos por el modelo obtenido previamente con las emulsiones. Los valores obtenidos se reportan en la Tabla 4.7. El error medio de predicción (*RMPE*) obtenido fue de 0,1 (en % de agua), similares a los reportados por el modelo de calibración, mostrando que las muestras empleadas para tal fin fueron adecuadas.

### 6.1.2. CÁPSULAS HÚMEDAS

Se realizó una curva de calibración con emulsiones con aceite de oliva en el rango 25 a 55% de agua (solución al 1% p/v de alginato de sodio).

Los espectros crudos obtenidos para la emulsión y luego del pretratamiento se pueden ver en la Figura 6.5 a y b, respectivamente.

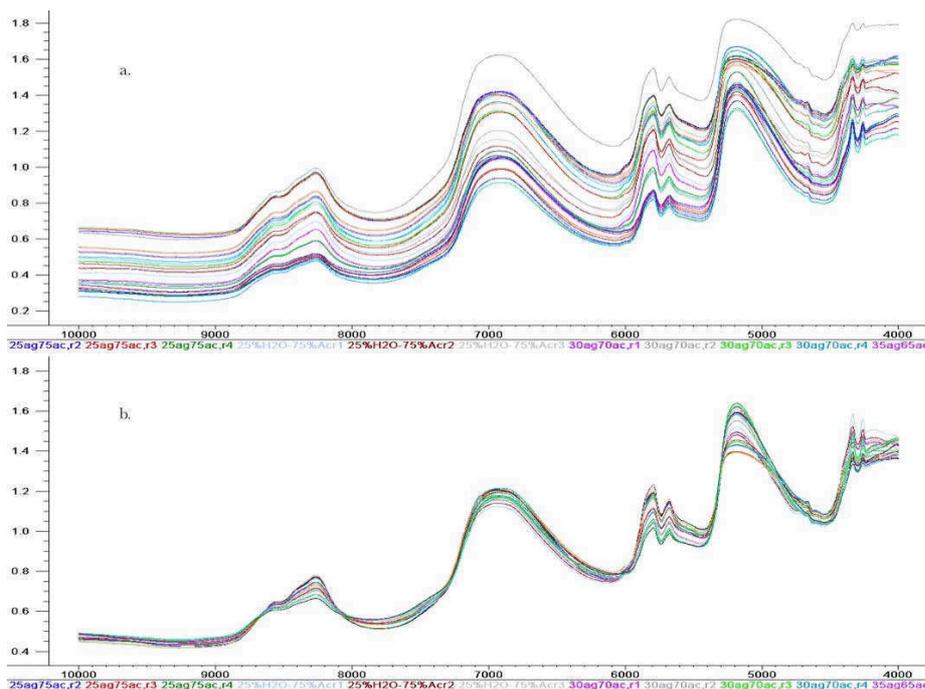


Figura 6.5. Espectros NIR obtenidos para preparación de curva de calibración con emulsiones para determinación de contenido de agua en muestras húmedas. a. Espectros crudos b. Espectros normalizados.

Posteriormente, se obtuvo un modelo de regresión lineal utilizando el algoritmo PLS para predecir los valores de contenido de agua en las cápsulas. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 6.6.

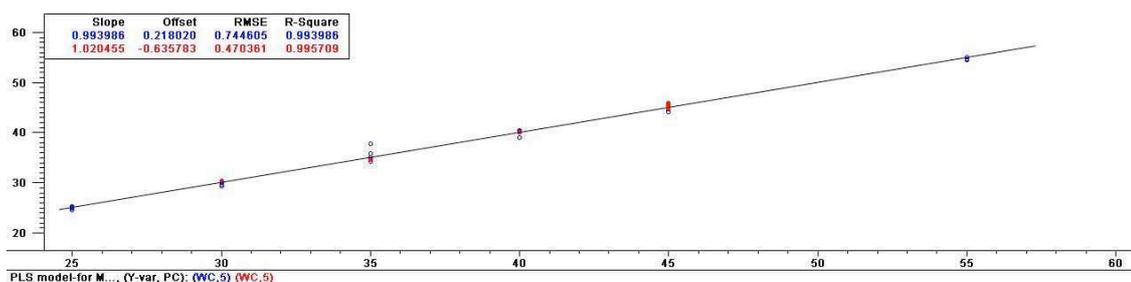


Figura 6.6. Curva de calibración obtenida del análisis espectral multivariado con algoritmo PLS.  $RMSE=0,744605$  y  $0,470361$  y  $R^2=0,993989$  y  $0,995709$  respectivamente.

La Figura 6.6 muestra que los valores de ajuste (errores medios de calibración y validación  $-RMSE-$  y  $R^2$ ) obtenidos fueron más que satisfactorios tanto para la calibración como para la validación del modelo. La Figura 6.3 muestra los *loadings*

obtenidos, que indican que las zonas espectrales de mayor influencia en el modelo son aquellas que corresponden al agua (5200) y al aceite (5800), (Xiaobo y col., 2010)

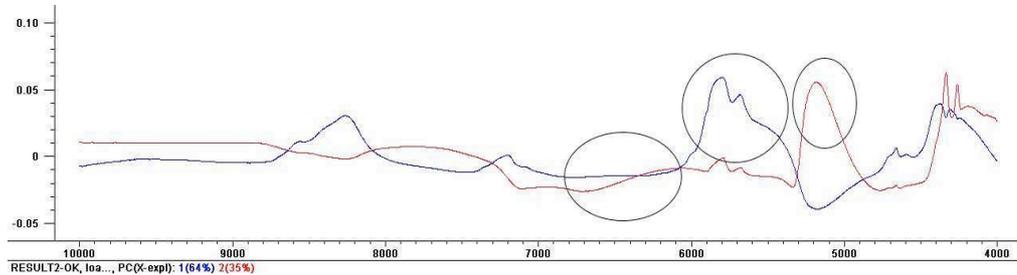


Figura 6.7. Loading para muestras húmedas.

La Figura 6.3 a y b muestra los espectros crudos obtenidos para las cápsulas deshidratadas por los dos métodos y luego del pretratamiento, respectivamente.

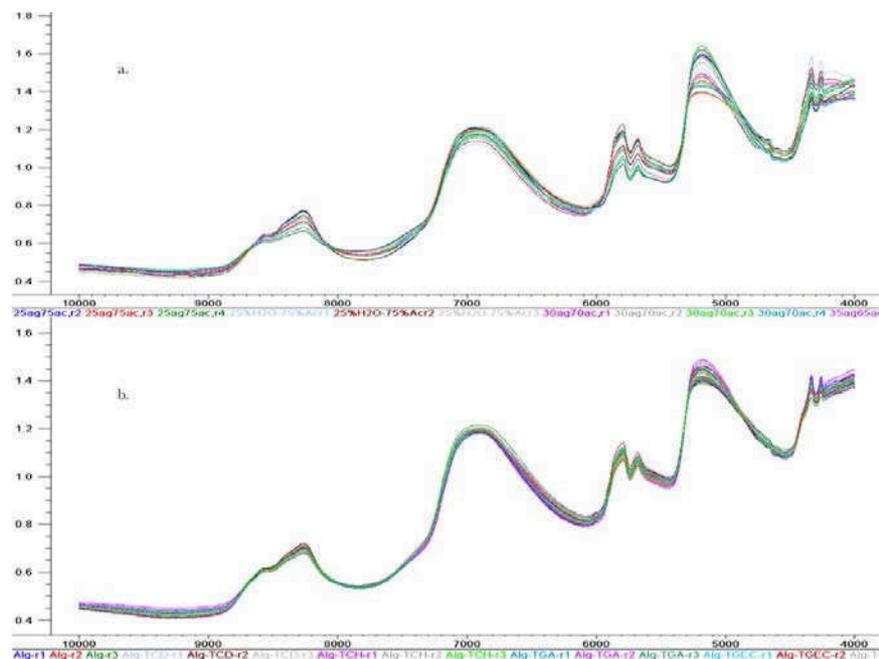


Figura 6.8. Espectros NIR obtenidos para predecir el contenido de agua en cápsulas deshidratadas

Los valores de contenido de agua para las cápsulas fueron predichos por el modelo obtenido previamente con las emulsiones. El error medio de predicción (RMPE)

obtenido fue de 1,9 (en % de agua), un poco superior a los reportados por el modelo de calibración y validación, siendo un error relativo aceptable, mostrando que las muestras empleadas para tal fin fueron adecuadas.

Los valores obtenidos están reportados en Tabla 6.1, y son muy similares a los obtenidos por el método gravimétrico (Tabla 4.1). En algunos casos, si bien existen diferencias significativas entre los valores obtenidos por ambos métodos, ambos valores se encuentran en el mismo rango, manteniendo el orden de magnitud.

*Tabla 6.1 Contenido de agua, determinado por predicción utilizando espectros NIR en base húmeda*

Cápsulas	Contenido de agua (bh)
A	$41 \pm 1$ (a)
A-T	$41 \pm 1$ (a)
A-TQ	$37,0 \pm 0,2$ (b)
A-TB	$40 \pm 1$ (a)
AP-T	$41 \pm 1$ (a)
AGG-T	$39 \pm 1$ (a)
AGA-T	$41 \pm 1$ (a)
AGV-T	$41 \pm 3$ (a)
AEC-T	$39 \pm 1$ (a)

## **7. BIBLIOGRAFÍA.**

- Alquézar García, B. 2007. Caracterización Bioquímica y Molecular de la Carotenogénesis en Frutos Cítricos. Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia.
- Ablett, S., Lillford, P.J., Baghdadi, S.M.A., Derbyshire, W. 1976. NMR relaxation in polysaccharide gels and films. American Chemical Society Symposium Series 34: 344–359.
- Aghel, N., Ramezani, Z., Amirfakhrian, S. 2011. Isolation and quantification of lycopene from tomato cultivated in dezfoul iran. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 2011. 6(1): 9-15.
- Alfrey, E.; Gurnee, E.F.; Lloyd, W.G. 1966. Diffusion in glassy polymers Journal of Polymers Science, Part C 1966, 12, 249–261.
- Andresen, I. L. and Smidsrød, O. (1977) Temperature-Dependence of Elastic Properties of Alginate Gels. Carbohydr. Res. 58, 271-279.
- Anthonsen, M.W., Varum, K.M., Smidsrød, O. 1993. Carbohydrates Polymers. 22, 193.
- Arica, B., Caliş, S., Kaş, H., Sargon, M., Hincal A. 2002. 5-fluorouracil encapsulated alginate beads for the treatment of breast cancer. International journal of pharmaceuticals 242: 267-269.
- Arvanitoyannis, I., Blanshard, J. 1994. Rates of crystallization of dried lactose-sucrose mixtures. Journal of Food Science 59(1): 197-205.
- Astolfi, Z.A., Souza, E., Reipert and Telis, V. 2005. Encapsulation of passion fruit juice by cocrystallization with sucrose: crystallization kinetics and physical properties. Ciencia y Tecnología de Alimentos Campinas 25(4): 795-801.
- Augustin, M.A., Sanguansri, L., Margetts, C., Young, B. 2001. Microencapsulation of food ingredients. Food Australia 53: 220-223.
- Avrami, M. 1939. Kinetics of phase change. I. General Theory. Journal of Chemical Physics 7: 1103-1112.
- Avrami, M.J. 1940. Kinetics of phase change. II. Transformation-time relations for random distribution of nuclei. Journal of Chemical Physics 8: 212-224.
- Azero, E., Andrade, C. 2002. Testing procedures for galactomannan purification. Polymer Testing 21: 551-556.
- Bakmutov, V. I. 2004. Practical NMR relaxation for chemists. Chichester, UK: Wiley.

- Baranska, M., Schutze, W., Schulz, H. 2006. Determination of lycopene and b-carotene content in tomato fruit and related products: comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR spectroscopy. *Analytical Chemistry* 78: 8456–8461.
- Baysal, T., Ersus, S., Starmans, D.A.J. 2000. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of beta-carotene and lycopene from tomato paste waste. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 5507–5511.
- Beristain, C.I., GarcmHa, H.S., Vernon-Carter, E. J. 2001. Spray-dried Encapsulation of Cardamom (*Elettaria cardamomum*) Essential Oil with Mesquite (*Prosopis juliflora*) Gum, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 34: 398-401.
- Blake, A. 1994. Flavor encapsulation with carbohydrate glasses. *International Food ingredient* 3: 30-34.
- Blanch, G. P., Ruiz del Castillo, L., Caja, M., Perez, M.M., Sanchez-Cortez, S. 2007. Stabilization of all-trans-lycopene from tomato by encapsulation using cyclodextrins. *Food Chemistry* 105: 1335–1341.
- Blümich, B., Casanova, F., Appelt, S. 2009. NMR at low magnetic fields. *Chemical Physics Letters* 477(4–6): 231–240.
- Blümich, B., Perlo, J., Casanova, F. 2008. Mobile single-sided NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 52(4): 197–269.
- Bo, S., Wenli, Y., Yaping, Z., Xiaoyong, L. 2006. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering* 76: 664–669.
- Braccini, I., Perez, I. 2001. Molecular basis of Ca<sup>2+</sup> induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules* 2(4): 1089-1096.
- Busch, V.M.; Santagapita, P.R.; Buera, M.P 2011. Aplicaciones de la calorimetría para caracterizar las transiciones térmicas de la semilla de vinal (*Prosopis ruscifolia*) y sus potenciales aplicaciones tecnológicas. *Proceeding of the XIII Congreso argentino CYTAL*. ISBN: 978-987-22165-4-2.
- Busch, V.M.; Santagapita, P.R.; Buera, M.P. 2012. parámetros reológicos de la goma de vinal (*Prosopis ruscifolia*).
- Busch, V.M.; Santagapita, P.R.; Buera, M.P. 2012. Time-dependent crystallisation behaviour of freeze-dried amorphous lactose and trehalose systems modified by *Prosopis ruscifolia* and guar gums.
- Bruttel, P., Schlink, R. 2003. *Water Determination by Karl Fischer Titration*. Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland. ISBN: 8.026.5003 – 2003-09.

- Burke, M. 1985. En: Membranes, metabolism and dry organisms. A. Leopold, (Ed.), Cornell University. Press, Ithaca. 358-363.
- Calligaris, S., Falcone, P., Anese, M. 2002. Color Changes of Tomato Purees During Storage at Freezing Temperatures. Sensory and Nutritive Qualities of Food, *Journal of food science* 67 (6): 2432-2435.
- Cardozo, M.L., Ordoñez, R.M., Zampini, I.C., Cuello, A.S., Dibenedetto, G., Isla, M.I. 2010. Evaluation of antioxidant capacity, genotoxicity and polyphenol content of non conventional foods: Prosopis flour, *Food Research International* 43: 1505–1510.
- Carpenter, J., Crowe, J. 1988. Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation. *Cryobiology* 25: 459-470.
- Carpenter, J.F., Crowe, L., Crowe, J. 1987. Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochemistry Biophysical. Acta* 923: 109-115.
- Carr, H.Y., Purcell, E.M. 1954. Effects of diffusion on free precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Physical Review* 94:630–638.
- Cerrutti, P., Segovia de Huergo, M., Galvagno, M., Schebor, C., Buera, M.P. 2000. Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Applied Microbiology Biotechnology* 54: 575-580.
- Champagne, C.P., Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2):184-190.
- Chan, L.W., Lee, H.Y., Heng, P.W.S. 2006. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*. 63(2):176-187.
- Chiavaro, E., Cerretani, L., Paciulli, M., Vecchio S. 2012. Kinetic evaluation of non-isothermal crystallization of oxidized extra virgin olive oil. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 108 (2): 799-806.
- Chiraldi, C.I., De la Rosa, L.M. 2002. Trehalosa production: Exploring novel Approaches. *Trens en byotechnology* 20 (10): 420-425.
- Chiu, Y.T., Chiu, C.P., Chien, J.T., Ho, G.H., Yang, J., Chen, B.H. 2007. Encapsulation of Lycopene Extract from Tomato Pulp Waste with Gelatin and

- Poly( $\gamma$ -glutamic acid) as Carrier. *Journal Agriculture Food Chemistry* 55(13):5123-30.
- Clinton, S.K. 1998. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition Review* 56(2):35–51.
- Crowe, J., Crowe, L., Chapman, D. 1984a. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223: 701-703.
- Crowe, J., Chapman, D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organism. The role of the trehalose. *Science* 223: 209-217.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review Physiology* 60: 73-103.
- Crowe, L., Reid, D., Crowe, J. 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials. *Biophysical journal* 71: 2087-2093.
- Nardo, T., Shiroma Kian, C., Halim, Y., Francis, D., Rodriguez, S. 2009. Rapid and Simultaneous Determination of Lycopene and  $\beta$ -Carotene Contents in Tomato Juice by Infrared Spectroscopy. *Journal Agriculture Food Chemistry* 57: 1105–1112.
- De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* 20(4):292-302.
- Deis, R. C. 1997. Spray Drying innovative use of an old process. *Food product design* 797-113.
- Del Valle, M. 2003. Review Cyclodextrins and their uses: a review E.M. Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Plaza de los Caidos S/N, 37007 Salamanca, Spain.
- Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A.S., Martino, M.N. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrates Polymers* 71:126-134.
- Department of Agriculture Research. Services University of Minnesota. Nutrition. Coordinating Center. 1998. USDA–NCC Carotenoid Database for U.S. Foods. Nutrient Data Laboratory. Home Page .<http://www.nal.usda.gov/fnic/food-comp>
- Domard, A., Rinaudo, M. 1983. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int. Journal of Biological Macromolecules* 5: 49-52.
- Dominguez, H., Navez, M.J., Lama, J.M. 1994. Enzymatic pre-treatment to enhance

- oil extraction from fruits and oil seeds: a review *Food Chemistry* 49: 271–286.
- Draget, K.I., Moe, S.T., Skjak-Brek, G., Smidsrod, O. 2006. Alginate. In Stephen, A. M., Phillips, G. O., Williams, P. A. (Eds.). *Food polycaccharides and their application*. 2nd Ed. Boca Raton: Taylor and Francis Group, LLC.
- Dror, Y., Cohen, Y., Yerushalmi-Rozen, R. 2006. Structure of gum arabic in aqueous solution. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* vol 44 Issue 22.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Arkansas for Medical Sciences
- Endress, H.U., Mattes, F., Norz, K. 2006. Pectinas. En: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Hui, Y. H. (Ed.), CRC Press- Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL 3 (140):1-35.
- Endress, H.U., Mattes, F., Norz, K. 2006. In *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*; Hui, Y. H., Ed.; CRC Press; Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL 3: 1.
- Eng-Seng, Chan. 2011. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers* 84: 1267–1275.
- Escobar, B., Estevez, A.M., Fuentes, C., Venegas, D. 2009. Use of algarrobo (*Prosopis chilensis*) flour as protein and dietary fiber source in cookies and fried chips manufacture, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 59 (2): 191-8.
- Freyre, M., Astrada, E., Blasco, C., Baigorria, C., Rosycki, V., Bernardi, C. 2003. Valores nutricionales de frutos de vinal (*Prosopis ruscifolia*): consumo humano y animal, *Ciencia y tecnología alimentaria* 4- 0001: 41-46.
- Fundacion Eeroski. 2012.  
<http://frutas.consumer.es/documentos/frescas/pomelo/imprimir.php>
- Gannadios, A., Hanna, M.A., Kurth, L. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafood: a review. *Lebensm.-Wiss.u.-Technology* 30(4): 337-349.
- Garti, N., Madara, Z., Aserina, A., Sternheima, B. 1997. Fenugreek Galactomannans as Food Emulsifiers. Casali Institute of Applied Chemistry, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, 91904, (Israel) Department of Biochemistry and Human

- Nutrition, Faculty of Agriculture, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, 76100, (Israel) *LWT - Food Science and Technology* 30( 3): 305–311.
- Gedde, W.U. 1995. Crystallization kinetics. Chapman and Hall (Ed.), London, U.K. 1ra edición. *Polymer Physics* 169-198.
- Gerster, H. 1997. The potential role of lycopene for human health. *Journal of American College of Nutrition* 16: 109-126.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C.N. 1999. Encapsulation in the food industry: a review 50 (3): 213-224.
- Giovannucci, E. 2005. *Journal Nutrition* 135, 2030S.
- Glicksman, M. 1983. *Food Hydrocolloids*. Boca Raton, FL: CRC Press Volume II.
- Gnanasambandam, R., Proctor, A. 2000. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 68: 327-332.
- Goldstein, A.M., Alter, E.N., Seaman, J.K. 1973. Guar gum in industrial gums, polysaccharides and their derivatives , academi press new york 303-321.
- Gombozt, W.R., Wee, S.F. 1998. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 31:267-285.
- Gouin, S. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology* 15: 330-347.
- Green, J., Angell, C. 1989. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *Journal of Physical Chemistry* 93: 2880-2882.
- Greenspan, L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research. National. Bureau Standards. A in Physical Chemistry* 81A: 89-96.
- Hahn, E. L. 1950. Spin echoes. *Physical Review* 80: 580–594.
- Hammer, A. 2008. The characterization of olive oils by DSC mettler toledo.
- Jaejoon, H., Guenier, A.S., Salmieri, Stéphane., Lacroix, M. 2008. Alginate and Chitosan Functionalization for Micronutrient Encapsulation. *Journal Agriculture Food Chemistry* 56 (7): 2528–2535.
- Haug, A. 1964. Composition and properties pf alginates. Thesis, Norwegian Institute of Technology, Trondheim.

- Hester-Reilly, H.J., Shapley, N.C. 2007. Imaging contrast effects in alginate microbeads containing trapped emulsion droplets. *Journal of Magnetic Resonance* 188 (1):168-175.
- Hills, B. P., Cano, C., Belton, P. S. 1991. Proton NMR relaxation studies of aqueous polysaccharide systems. *Macromolecules* 24: 2944–2950.
- Holz, M., Heil, S. R., Sacco, A. 2000. Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate <sup>1</sup>H NMR PFG measurements. *Physical Chemistry* 2: 4740–4742.
- Hyman, J.R., Gaus, J., Majid, R.F. 2004. A rapid and accurate method for estimating tomato lycopene content by measuring chromaticity values of fruit puree *Journal of American society of horticulture science* 129(5): 717-72.
- Infoagro Systems, S.L. 2013. <http://www.infoagro.com/citricos/pomelo.htm>
- Ipsita, R., Sardar, M., Munishwar, N.G. 2005. Cross-linked alginate–guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin. *Biochemical Engineering Journal* 23 (3):193–198.
- Isengard, H.D. 2010. Ensuring Global Food Safety Exploring Global Harmonization, Chapter 6: 109–123.
- Izydorczyk, M., Cui, S.W., Wang, Q. 2005. Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications. En Cui, S. (Ed.), *Food Carbohydrates, Chemistry, Physical Properties and Applications*, CRC Press, Boca Raton
- Kačuráková, M., Mathlouthi, M. 1996. FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: characterization of the glycosidic bond. *Carbohydrates Research* 284: 145-157.
- Kalogeropoulos, N., Mourtzinou, I., Papadakis, S.E., Konstantinou, K., Karathanos, V. 2008. Encapsulation of Nutraceutical Monoterpenes in B-Cyclodextrin and Modified Starch. *Sensory and Food Quality* 73 (1): 89-94.
- Musahib-ud-din, K., Mackinney, G. 1952. Carotenoids in grapefruit, *Citrus paradisi*. Department of food technology, university of california, Berkeley.
- Kim, T.H., Park, Y.H., Kim, K.J., Cho, C.S. 2003. *International Journal Pharmacology* 250: 371–383.
- Kirby, C.J. 1991. Microencapsulation and controlled delivery of food ingredients. *Food Science and Technology Today* 5 (2): 74–80.

- Krasaekoopt, W., Bhes, B., Hilton, D. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. School of Land and Food Sciences, The University of Queensland, St. Lucia, Qld. 4072, Australia. *International Dairy Journal* 14 (8): 737–743.
- Kun, Y., Lule, U.S., Xiao-Lin, D. 2006. Lycopene: its properties and relationship to human health. *Food Review International* 22:309–33.
- Lakkis, J.M. 2008. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. John Wiley and Sons.
- Lavecchia, R., Zuurro, A. 2008. Enhancement of lycopene extraction from tomato peels by enzymatic treatment. *Chemical Engineering Transactions* 14: 301-308.
- Lee, S.H., Castle, W.S. 2001. Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, and Budd Blood oranges juices. *Journal Agriculture Food Chemistry* 49: 878-822.
- Levine, H., Slade, L. 1992. Another view of trehalose for drying and sabilizing biological materials. *Biopharmaceutical* 5: 36-40.
- Levy, J., Bosin, E., Feldman, B., Giat, Y., Münster, A., Danilenko, M., Sharoni, Y. 1995. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either  $\alpha$ -carotene or  $\beta$ -carotene. *Nutrition Cancer* 24(5):257–66.
- Lime, B.J., Griffiths, F.P., O'Connor, R.T., Heinzelman, D.C., McCall, E.R. 1957. Grapefruit pigment determination. *Spectrophotometric Methods for Determining Pigmentation-Beta-Carotene and Lycopene-in Ruby Red Grapefruit Agricultural and food chemistry* 5(12).
- Lingyun, C., Remondetto, G.E., Subirade, Muriel. 2009. *Calcium Cross-Linked Soy Protein Beads and Microspheres as Carriers for Nutraceutical Compound Delivery*. Canada Research Chair in Proteins, Biosystems and Functional Foods, Nutraceuticals and Functional Foods Institute (INAF/STELA), Université Laval, Laval, Quebec G1K 7P4, Canada
- Lisiewska, Z., Kmiecik, W. 2000. Effect of storage period and temperature on the chemical composition and organoleptic quality of frozen tomato cubes. *Food Chemistry* 70: 167- 173.

- Lodato, P., Segovia de Huergo, M., Buera, M.P. 1999. Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 215-220.
- Maji, T., Baruah, I., Dube, S., Hussain, M. 2007. Microencapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technology* 98(4): 840-844.
- Meiboom, S., Gill, D. 1958. Modified spin-echo method for measuring nuclear magnetic relaxation times. *The Review of Scientific Instruments* 29: 688–691.
- Mi, F.L., Her, N.L., Kuan, C.Y., Wong, T.B., Shyu, S.S. 1997. Chitosan tablets for controlled release of theophylline: effect of polymer-drug wet or dry blending and anionic-cationic interpolymer complex. *Journal Applied Polymers Science* 66: 2495-2505.
- Micklander, E., Peshlov, B., Purslow, P.P., Engelsen, S.B. 2002. NMR-cooking: monitoring the changes in meat during cooking by low-field <sup>1</sup>H-NMR. *Trends in Food Science and Technology* 13(9–10): 341–346.
- Ministerio de Economía y Finanzas Públicas, Presidencia de la Republica. 2004. <http://www.mecon.gov.ar/foregio/pomelo/10.htm>
- Muñoz-Botella, S., Del Castillo, B., Martín, M.A. 1995. Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. *Ars. Pharmaceutical* 36: 187–198.
- Murata, Y., Maeda, T., Miyamoto, E., Kawashima, S. 1993. Preparation of chitosan-reinforced alginate gel beads effects of chitosan on gel matrix erosion. School of Pharmacy, Hokuriku University, Kanagawa-machi, Kanazawa 920-11 Japan. *International Journal of Pharmaceutics* 96 (1–3):139–145.
- Nakagawa, K., Iwamoto, S., Nakajima, M., Shono, A., Satoh, K. 2004. Icrochannel emulsification using gelatin and surfactant free coacervate microencapsulation. *Journal colloids and Interface Science* 278: 198-205.
- Nguyen, M.L., Schwartz, S. 1998. Lycopene stability during food processing. *Experimental Biology Medical* 218:101–105.
- Nguyen, M.L., Schwartz, S.J. 1999. Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technology* 53:38–44.
- Nigmatullin, R., Konovalova, V., Pobigay, G. 2009. *Journal Applied Polymers science* 111, 1697.

- Novosel'skaya, I.L., Voropaeva, N.L., Semenova, L.N., Rashidova, S.h. 2000. Trends in the science and applications of pectins. A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses. *Chemistry of Natural Compounds*. 36 (1): 1-10.
- Nussinovitch, A. 1997. *Hydrocolloid applications: gum technology in the food and other industries*. London: Chapman & Hall.
- Oliva, M., Alfaro, C., Palape, I. 2010. Evaluación del potencial tecnológico de galactomananos del endospermo de semillas de *Prosopis* sp. para el uso en la industria de alimentos, *Agriscientia*, 2: 107-113.
- Omoni, A.O., Aluko, R.E. 2005. *Trends Food Science Technology* 16: 344.
- Paiva y Panek. 1996. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnology Annual Review* 2: 293-314.
- Pal, K., Paulson, A., Rousseau, T.D. 2009. Biopolymers in controlled- release delivery systems. In *Modern biopolymer science. Bridging the divide between fundamental treatise and industrial application* 519-557.
- Palzer, S. 2009. Food structures for nutrition, health and wellness. *Trends Food Science Technology* 20: 194-200.
- Paul, S., Mittal, G.S. 1997. Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37(7): 635-662.
- Pedersen, H.T., Munck, L., Engelsen, S.B. 2000. Low-field <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance and chemometrics combined for simultaneous determination of water, oil, and protein contents in oilseeds. *Journal of America Oil Chemists' Society* 77(10): 1069-1076.
- Perduca, M.J., Santiago, L.G., Judis, M.A., Rubiolo, A.C., Carrara, C.R. 2011. Rheological characterization of Espina corona gum from *Gleditsia amorphoides* seeds. Unpublished results, paper sent to LWT- Food Science and Technology.
- Perduca, M.J., Spotti, M.J., Santiago, L.G., Judis, M.A., Rubiolo, A.C., Carrara, C.R. 2013. Rheological characterization of the hydrocolloid from *Gleditsia amorphoides* seeds. *LWT - Food Science and Technology* 51: 143-147.
- Polk, A., Amsden, B., De Yao, K., Peng, T., Goosen, M.F.A. 1994. *Journal Pharmacology science* 83, 178.

- Poncelet, D. 2001. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. In *Bioartificial organs III: tissue sourcing immunoisolation and clinical trials*. Annals of the New York
- Potter, K., Carpenter, T.A., Hall, L.D. 1993. Mapping of the spatial variation in alginate concentration in calcium alginate gels by magnetic-resonance-imaging (MRI). *Carbohydrate Research* 246: 43–49.
- Poulli, K.I., Mousdis, G.A., Georgiou, C.A. 2006. Synchronous fluorescence spectroscopy for quantitative determination of virgin olive oil adulteration with sunflower oil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386(5): 1571–1575.
- Price, W.S. 1997. Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: part 1. Basic theory. *Concepts in Magnetic Resonance* 9(5): 299–336.
- Qi, Z.H., Xu, A. 1999. Starch based ingredients for flavour encapsulation. *Cereal Foods World* 44: 460-465.
- Qiu , X., Leporatti , S., Donath , E., Langmuir, H. 2001. Studies on the drug release properties of polysaccharide multilayers encapsulated ibuprofen microparticles 17: 5375
- Quellet, C., Schudel, M., Rinngerberg, R. 2001. Flavours and fragrance delivey systems. *Chimia*. 55:421-428.
- Rao, A.V., Rao, L.G. 2004. *Current Topics Nutraceutical Research* 2: 27.
- Rayment, P., Wright, P., Hoad, C., Ciampi, E., Haydock, D., Gowland, P., Butler, M.F. 2009. Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, Part 1: In vitro characterization. *Food Hydrocolloids* 23 (3): 816-822.
- Rayment, P., Wright, P., Hoad, C., Ciampi, E., Haydock, D., Gowland, P., Butler, M.F. 2009. Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, Part 1: In vitro characterization. *Food Hydrocolloids* 23 (3): 816-822.
- Reinneccius, G. A. 1991. Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology* 45: 141-147.
- Rha, C.K., Rodríguez-Sanchez, D. 1988. Process for encapsulation and encapsulated active material system, US patent 4: 744, 933.

- Ribeiro, A. J., Silva, C., Ferreira, D., Veiga, F. 2005. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/ internal gelation technique. *European Journal Pharmaceutical Science* 25(1): 31-40.
- Rivera, M., Canela-Garayo, R. 2012. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*. 1224:1-10.
- Roldan-Gutierrez, J., Luque de Castro, M. 2007. Lycopene: The need for better methods for characterization and determination. *Trends in Analytical Chemistry* 26: 2.
- Roos, Y., Karel, M. 1992. Crystallization of amorphous lactose. *Journal of Food Science* 57: 775-777.
- Roos, Y. 1995. *Phase Transitions in Foods*. S. Taylor (Ed.), Academic Press, Inc., New York. Cap. 2, 5 y 7.
- Rosell, C.M., Rojas, J.A., Benedito, C. 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids* 15: 75–81.
- Rosenberg, M., Kopelman, I.J., Talmon, Y. 1990. Factors affecting retention in spray drying encapsulation of volatile material. *Journal Agriculture Food Chemistry* 38: 1288- 1294.
- Rousseau, I., Cerf, D.L., Picton, L., Argillier, J.F., Muller, G. 2004. Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS) from calcium alginate gel beads. *European Polymer Journal*. 40: 2709–2715.
- Rusell, L.F. 2004. Physical characterisation and nutrient analysis. *Handbook of food analysis* 1: 487-571.
- Sankalia, M.G., Mashru, R.C., Sankalia, J.M., Sutariya, V. B. 2005. Papain Entrapment in Alginate Beads for Stability Improvement and Site-Specific Delivery: Physicochemical Characterization and Factorial Optimization Using Neural Network Modeling. *AAPS Pharmacology Science Technology* 6(2): 209-222.
- Santagapita, P.M., Mazzobre, M.F., Buera, M.P. 2011. Formulation and Drying of Alginate Beads for Controlled Release and Stabilization of Invertase. *Biomacromolecules* 12 (9): 3147–3155.
- Santagapita, P. 2010. Estabilidad de enzimas en medios de distinta movilidad molecular. impacto de interacciones con azúcares y biopolímeros y de la

- encapsulación. Tesis realizada para el Doctorado en Ciencias Químicas. Biblioteca Dr. Luis Federico Leloir, FCEN, UBA.
- Santagapita, P.R., Gomez Brizuela, L., Mazzobre, M.F., Ramírez, H.L., Corti, H.R., Villalonga Santana, R., Buera, M. P. 2008. *Biomacromolecules* 9: 741–747.
- Santagapita, P.R., Laghi, L., Panarese, V., Tylewicz, U., Rocculi, P., Dalla Rosa, M. 2013. Modification of transverse NMR relaxation times and water diffusion coefficients of kiwifruit pericarp tissue subjected to osmotic dehydration. *Food Bioprocess and Technology* 6:1434-1443.
- Santagapita, P.R., Mazzobre, M.F., Buera, M.P. 2012. Invertase stability in alginate beads. Effect of trehalose and chitosan inclusion and of drying methods. *Food Research International* 47: 321-330.
- Santagapita, P.R., Mazzobre, M.F., Buera, M.P. 2011. Evaluation of trehalose addition in alginate beads on enzyme stability and physical properties according to the type of drying. *Proceedings of Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA 8)*. 4 pp.(CD).
- Sarmiento, B., Ferreira, D., Veiga, F., Ribeiro, A. 2006. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrates Polymers* 66:1-7.
- Schneiderman, E., Stalcup, A.M. 2000. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *Journal Chromatography Biomedical* 745: 83–102.
- Schrooyen, P., Meer, P., Kruijff, C. 2001. Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society* 4: 475-479.
- Sharma, S.K., Maguer, M.L. 1996. Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. *Food Research International* 29:309–315.
- Shi, J., Le Maguer, M., Bryan, M. 2002. Lycopene from Tomatoes, in: *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*, CRC Press, Boca Raton.
- Simpson, N.E., Grant, S.C., Blackband, S.J., Constantinidis, I. 2003. NMR properties of alginate microbeads. *Biomaterials* 24 (27): 4941-4948.
- Sinclair, W. 1950. *The Grapefruit: Its Composition, Physiology, and Products*. University of California, Division of agricultural science

- Singh, P., Goyal, G. 2008. Dietary Lycopene: Its Properties and Anticarcinogenic Effects. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 7: 255-270.
- Sinitsya, A., Copikova, J., Prutyaynov, V., Skoblyya, S., Machovic, V. 2000. Amidation of highly methoxylated citrus pectin with primary amines. *Carbohydrate Polymers* 42: 359-368.
- Slichter, C.P. 1990. Principles of magnetic resonance. Springer Series in Solid-State Sciences (3 rdth ed.). Berlin Heidelberg, Germany: Springer.
- Šmejkalová, D., Piccolo A. 2010. High-power gradient diffusion NMR spectroscopy for the rapid assessment of extra-virgin olive oil adulteration. *Food Chemistry* 118: 153–158.
- Smidsrod, O., Draget, K. I. 1997. Alginate gelation technologies. In Dickinson E, Bergenstahl B. (Eds.). *Food colloids proteins, lipids and polysaccharides*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Smitha, B., Sridhar, S., Khan, A. A. 2005. Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *European Polymer Journal* 41: 1859-1866.
- Soon-Mi, S., Gun-Hee, K. 2002. Color Changes and Carotenoid Pigment Loss in Retentate from Star Ruby Grapefruit Juice under Refrigerated Conditions. *Food Science Technolgy Research* 8 (3): 244–246.
- Sperling, L.H. 1986. En: *Introduction to Physical Polymer Science*. John Wiley & Sons, New York. 224-295.
- Stahl, W., Sies, H. 1996. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans *Archives Biochemistry and Biophysics* 336 (1): 1-9.
- Storey, B.T., Noiles, E.E., Thompson, K.A. 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 37: 46-58.
- Szejtli, J. 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews* 98: 1743-1753.
- Tanaka, H., Matsumura, M. and Veliky, I. A. (1983) Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 53-58.
- Todt, H., Burk, W., Guthausen, G., Guthausen, A., Kamlowski, A., Schmalbein, D. 2001. Quality control with time-domain NMR. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103(12): 835–840.

- Todt, H., Guthausen, G., Burk, W., Schmalbein, D., Kamlowski, A. 2006a. Time-domain NMR in quality control: standard applications in food. In G. A. Webb (Ed.), *Modern magnetic resonance* Dordrecht, Netherlands: Springer. 1739–1743
- Verbeken, D., Dierckx, S., Dewettinck. 2003. Exudate gums: Occurrence, production, and applications. ISSN: 0175-7598. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (1):10–21.
- Vidhyalakshmi, R.; Bhakayaraj, R. y Subhasreey, R. S., 2009. Encapsulation “The Future of Probiotics”-A Review. *Adv. Biol. Res.*, 3, 96-103.
- Vitale, A. A., Bernatene, E.A., Pomilio, A.B. 2010. Carotenoides en quimioprevención: Licopeno *Acta Bioquímica Clínica Latinoamerica* 44 (2): 195-238.
- Walter, R.H. 1991. Function of pectin in plant tissue structure and firmness. In R.H. Walter, (Ed.), *The chemistry and technology of pectin*. San Diego: Academic Press. Chapter 1:1-22.
- Wang, W., Bo, S., Li, S., Qin, W. 1991. *International Journal Biology Macromolecules* 13: 281.
- Wang, Y., Chung, T.S., Wang, H., Goh, S.H. 2009. Butanol isomer separation using polyamide-imide/CD mixed matrix membranes via pervaporation. *Chemical Engineering Science* 64 (24): 5198-5209.
- Watanabe, Y., Fang, X., Minemoto, Y., Adachi, S., Matsuno, R. 2002. Supressive effect of saturated L-ascorbate on the oxidation of linoleic acid encapsulated with maltodextrins or gum Arabic by spray drying. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 3984- 3987.
- Wayne, W., Fish, P., Perkins, V., Collins, J.K. 2002. A Quantitative Assay for Lycopene That Utilizes Reduced Volumes of Organic Solvent. *Journal of food composition and analysis* 15: 309–317.
- Xiaobo, Z., Jiewena, Z., Poveyb, M., Holmes, M., Hanpina, M. 2010. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 667:14–32.
- Yao, K.D., Tu, H., Cheng, F., Zhang, J.W., Liu, J. 1997. pH sensitivity of the swelling of a chitosan-pectin polyelectrolyte complex. *Die Angew Makromol Chemistry* 245: 63-72.

- Zhang, Q., Saleh, A.S.M., Shen, Q. 2013. Discrimination of Edible Vegetable Oil Adulteration with Used Frying Oil by Low Field Nuclear Magnetic Resonance. *Food and Bioprocess Technology* 6 (9): 2562-2570.
- Zheng, L., Da-Wen, Sun. 2006. Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes a review. *Trends in Food Science and Technology* 17: 16–23.
- Zhou, X.H., Li Wan Po, A. 1991. Peptide and protein drugs: II. Non-parenteral routes of delivery. *International Journal Pharmaceutics* 75(2-3): 117-130.
- Zhou, X.H. 1994. Overcoming enzymatic and absorption barriers to nonparenterally administered protein and peptide drugs. *Journal Controlled Release* 29(3): 239-252.

## Fe de erratas

### **“Encapsulación de licopeno empleando polielectrolitos. Influencia del secado y congelado sobre su estabilidad.”**

Autora: Lic. Tatiana Rocío Aguirre Calvo

Tesis presentada para optar al título de Magíster de la Universidad de Buenos Aires en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos.

Listado de correcciones:

- *Abstract*: donde dice: “The effect of different methods of freezing and drying was evaluated and the concentration and lycopene stability depending of treatments was analyzed, in both wet and dried systems.”, debería decir: “The effect of different methods of freezing and drying was evaluated and the concentration and stability of lycopene depending of treatments were analyzed, in both wet and dried systems.”
- Página 11: donde dice “Actualmente se vende como preparaciones a base de aceite (de maíz) con un 10 al 30 % de licopeno, por lo que su utilización se ve restringida sólo a ciertos productos alimentarios.”, debería decir: “Actualmente se vende como insumo para las industrias de alimentos en preparaciones a base de aceite (de maíz) con un 10 al 30 % de licopeno, por lo que su utilización se ve restringida sólo a ciertos productos alimentarios.”
- Página 11: donde dice “El blanqueamiento de pulpa de tomate durante el almacenamiento a -7 y -18°C se atribuyó a la degradación de los carotenoides debido a reacciones catalizadas por enzimas de oxidación, además de a los efectos asociados con la congelación (tales como la concentración de solutos, aumento de la fuerza iónica, cambios en el pH, la solubilidad del oxígeno, la actividad de agua y la viscosidad) (Calligaris y col., 2002).”, debería decir: “El blanqueamiento de pulpa de tomate durante el almacenamiento a -7 y -18°C se atribuyó a la degradación de los carotenoides debido a reacciones catalizadas por enzimas de oxidación, además de a los efectos asociados con la congelación (tales como el aumento de la concentración de solutos, de la fuerza iónica y de la viscosidad, cambios en el pH -dependientes de las especies presentes en el alimento-, y disminución de la solubilidad del oxígeno (por expulsión de gases) y de la actividad de agua) (Calligaris y col., 2002; Fenema, 2008).”
- Página 23: donde dice “Hay dos teorías: una la cual explica que siendo polioles, los azúcares pueden formar...”, debería decir: “Hay dos teorías: una explica que siendo polioles, los azúcares pueden formar...”
- Página 38, primer objetivo específico: donde dice “Extraer el licopeno de fuentes naturales de fuentes no convencionales, tal como el pomelo rosado, utilizando métodos libres de solventes orgánicos.”, debería decir: “Extraer el licopeno de fuentes naturales no convencionales, tal como el pomelo rosado, utilizando métodos libres de solventes orgánicos.”

- Página 55, luego de la Ecuación 3.3: se agrega: “donde  $\alpha$  representa la fracción cristalina,  $n$  es el índice de Avrami (relacionado con la nucleación y crecimiento) y  $k$  es la constante de cristalización isotérmica.”
- Página 55, luego de la Ecuación 3.4: se agrega: “donde  $Y$  es la fracción cristalina,  $Y_0$  la fracción cristalina existente previo al tratamiento isotérmico, el *plateau* es el valor umbral de cristalización,  $k$  es la velocidad con la que se arriba a dicho umbral, y  $X$  es el tiempo a la temperatura de tratamiento.”
- Página 57: donde dice “Para el cálculo de los valores de contenido de agua en base seca se reemplaza en el denominador de la ecuación 3.5 el  $P_f$  por el  $P_i$ .”, debería decir: “Para el cálculo de los valores de contenido de agua en base seca se reemplaza en el denominador de la ecuación 3.5 el  $P_i$  por el  $P_f$ .”
- Página 58: donde dice “Donde  $y$  es el contenido de agua (%p/v) y  $x$  el volumen (40  $\mu$ L) de emulsión agregada.”, debería decir: “Donde  $y$  es el contenido de agua determinado por Karl Fischer (%p/p – en base húmeda-) y  $x$  es el contenido de agua pesado (%p/p) utilizado en la preparación de la emulsión.”
- Página 100: donde dice “Sin embargo, Vitale y colaboradores (2010) reportaron que la ingesta de licopeno isomerizado presentó una mayor biodisponibilidad debido a que son más solubles en las micelas formadas por los ácidos biliares durante la digestión, aunque su rol biológico aún resulta indefinido.”, debería decir: “Sin embargo, Vitale y colaboradores (2010) reportaron que la ingesta de licopeno isomerizado presentó una mayor biodisponibilidad debido a que el licopeno es más soluble en las micelas formadas por los ácidos biliares durante la digestión, si bien el rol biológico del licopeno isomerizado aún resulta indefinido.”