



# UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

División de Estudios de Posgrado

Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

Bioaccesibilidad de microencapsulados de extractos de *Haematococcus pluvialis* ricos en astaxantina

## Tesis

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

## Presenta:

I.I.A. Jerzain Guillermo Martínez Gómez

## Director de Tesis:

Dr. Raúl Salas Coronado

## Co-Directora

Dra. Norma Francenia Santos Sánchez

Diciembre, 2021 Huajuapán de León, Oaxaca, México.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Principios Bioactivos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), bajo la dirección del Dr. Raúl Salas Coronado y la codirección de la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez. Durante los dos años que estuve en el programa de maestría recibí una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) con número de becario: 1011577.

Parte de este trabajo se presentó en el congreso virtual CUCCAL XIII, en la modalidad de cartel, organizado por la Sociedad Mexicana de Inocuidad y Calidad para Consumidores de Alimentos (SOMEICCA), los días 18, 19 y 20 de marzo de 2021.

También se presentó de manera virtual en el 9° Congreso de la Facultad de Ingeniería Química (CONFIQ-9), organizado por la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) los días 7 y 8 de octubre de 2021 en la modalidad oral.

## **Dedicatorias**

A Dios por guiar mis pasos en cada decisión que he tomado en mi vida profesional.

A mis padres Elisa y Roberto por ser los principales pilares durante mi vida personal y profesional.

A mis hermanos pequeños Alondra, Ariadne e Israel por estar conmigo todo este tiempo compartiendo buenos y malos momentos y ojalá sea un gran ejemplo como su hermano mayor.

A mis abuelitos paternos y maternos: Eva, Francisco, Guillermo y en especial a mi abuelita Georgina (descanse en paz) le agradezco infinitamente por todas las enseñanzas de la vida y te dedico este pequeño logro.

# Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi director de tesis al Dr. Raúl Salas Coronado y co-directora a la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez por el inmenso apoyo en la parte experimental y redacción de tesis. También por todos los conocimientos brindados durante los dos años de maestría.

A Alex Marquéz de la Cruz y la M.C. Alejandra Torres Ariño por la adquisición de las micrografías de la microalga y a la maestra por sus conocimientos brindados de la misma.

A la técnico Angélica López Luis por todo el apoyo en el laboratorio, también sobre las recomendaciones y cuidados que se deben tener durante la parte experimental.

A todas mis evaluadoras a la Dra. Mirna Patricia Santiago, Dra. Thalía Isolda Ramírez, Dra. Beatriz Hernández Carlos, Dra. Norma F. Santos Sánchez y a la MC. Alejandra Torres Ariño, quienes gracias a su apoyo y evaluaciones de cada fin de semestre me ayudaron a fortalecer más el documento de tesis.

A la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza, Dr. Rogelio Valadez Blanco, Dra. Luz Hermila Villalobos Delgado quienes también formaron parte de mis conocimientos adquiridos.

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca por permitirme ser estudiante de esta gran casa de estudios.

A las secretarias Sarita, Celes, Carmen y Blanca por su gran apoyo en toda la documentación que suele realizarse dentro de la institución.

Al Instituto de Hidrología, específicamente a la MC. Corina Cisneros Cisneros y al Biólogo Ulises Ruiz Castañeda por el apoyo en el uso del espectrofotómetro de UV/vis para la cuantificación de astaxantina.

Al Instituto de Minería, específicamente a la Dra. Patricia Magaly Gallegos quien me apoyó en el manejo del microscopio óptico petrográfico para la obtención de las micrografías de los microencapsulados.

A todos mis amigos que conocí durante mi estancia en la UTM, a Rosy, Ángela, Conchis, Yesi, Rubí, Germán, Rafa, Itzel, Isa, Juan Carlos, Yarely, Karla y al Dr. Héctor por los buenos momentos y convivencias que compartimos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada.

# Resumen

El presente proyecto tuvo como finalidad obtener microencapsulados de extractos de *Haematococcus pluvialis* mediante la técnica de coacervación compleja y evaluar su bioaccesibilidad mediante un método de digestión *in vitro*, así como su actividad antirradicalar. Los agentes de pared usados fueron proteína de chícharo y cáñamo; así como goma arábica y quitosano. Esto permitió generar cuatro tratamientos. A los microencapsulados obtenidos se les determinó la eficiencia de microencapsulación (EMA) por espectrofotometría de UV/vis, la morfología-tamaño por microscopía óptica petrográfica y la evaluación de la bioaccesibilidad. Los microencapsulados mostraron ser estables con una humedad entre 88-92% a 4°C. Los cuatro tratamientos mostraron EMAs superiores al 80%. La evaluación de la composición de las paredes de las microcápsulas se llevó a cabo por FTIR-ATR. El análisis de los espectros de IR permitió identificar bandas características de los polisacáridos. Por otro lado, la morfología de las microcápsulas resultaron esféricas y con apariencia rugosa. El tamaño de las microcápsulas se encontró en un intervalo de  $6.62 \pm 1.45$  a  $26.91 \pm 8.32$   $\mu\text{m}$ . Los tratamientos con la proteína de cáñamo resultaron ser de mayor tamaño. Respecto a los resultados de la actividad antirradicalar, los extractos obtenidos de la proteína de cáñamo tuvieron una eficiencia antirradicalar muy alta y superior a los tratamientos con proteína de chícharo. Finalmente, los mejores resultados de la prueba de bioaccesibilidad se obtuvieron en los tratamientos con goma arábica, liberando la mayor cantidad de astaxantina en la etapa intestinal.

*Palabras clave:* astaxantina, carotenoide, antioxidante, microencapsulados, coacervación compleja, digestión *in vitro*.

# Índice de contenido

Índice de Apéndices.....	X
Índice de Anexos .....	XI
Índice de Figuras .....	XII
Índice de Tablas.....	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XIV
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Originalidad.....	2
1.2 Hipótesis.....	3
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos particulares .....	3
1.4 Justificación.....	4
Capítulo 2. Análisis de Fundamentos .....	5
2.1 Taxonomía de <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	5
2.2 Morfología celular y ciclo de vida.....	5
2.3 Características de la astaxantina .....	7
2.4 Ruta biosintética de los carotenoides.....	7
2.5 Ruta biosintética de la axtaxantina .....	8
2.6 Estructura química de la astaxantina.....	9
2.7 Fuentes naturales de astaxantina.....	12
2.8 Compuestos antioxidantes y su mecanismo.....	13
2.9 Usos y aplicaciones.....	14
2.10 Beneficios saludables de la astaxantina .....	14
2.11 Posición superior en la membrana celular .....	17
2.12 Almacenamiento y estabilidad de la astaxantina .....	18
2.13 Aceite de oliva extravirgen .....	18
2.14 Biodisponibilidad de la astaxantina .....	19
2.15 Formulados de astaxantina.....	20
2.15.1 Encapsulación.....	20
2.15.2 Microencapsulación .....	20
2.15.3 Nanoencapsulación.....	21

2.15.4	Micro y nano-encapsulación por coacervación .....	22
2.15.5	Método de coacervación compleja .....	25
2.15.6	Biopolímeros empleados como recubrimientos de micro- y nanocápsulas .....	26
2.15.6.1	Polisacáridos .....	27
2.15.6.2	Proteínas .....	28
2.15.6.2.1	Métodos para cuantificación y purificación de proteínas .....	31
2.15.6.2.2	Solubilidad de las proteínas .....	32
2.16	Importancia de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad .....	33
2.16.1	Bioaccesibilidad y digestión <i>in vitro</i> .....	34
Capítulo 3. Metodología Experimental .....		37
3.1	Reactivos, disolventes y materiales .....	38
3.2	Equipos .....	39
3.3	Preparación de proteína aislada de cáñamo .....	40
3.3.1	Determinación de la pureza de la proteína aislada de harina de cáñamo .....	41
3.4	Preparación de las disoluciones de proteínas, polisacáridos y aceite rico en astaxantina .....	43
3.5	Obtención de los microencapsulados .....	44
3.6	Cuantificación de astaxantina .....	46
3.7	Determinación de la eficiencia de microencapsulación (EMA) .....	48
3.8	Determinación de humedad de los microencapsulados .....	49
3.9	Análisis de la morfología y tamaño de las microcápsulas por microscopía óptica petrográfica .....	49
3.10	Adquisición de espectros de IR .....	50
3.11	Evaluación de la actividad antirradicalar de los extractos de los microencapsulados frente al radical DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) .....	50
3.12	Simulación <i>in vitro</i> del proceso de digestión humana .....	52
3.13	Análisis estadístico .....	55
Capítulo 4. Resultados y discusiones .....		56
4.1	Purificación de la proteína de cáñamo .....	56
4.2	Caracterización de las microcápsulas .....	58
4.2.1	Espectros FTIR de las microcápsulas .....	61
4.2.2	Tamaño y distribución de las microcápsulas .....	63
4.2.3	Eficiencia de microencapsulación .....	66
4.2.4	Evaluación de la actividad antirradicalar .....	67
4.2.5	Bioaccesibilidad de los microencapsulados .....	70
Conclusiones .....		76



Perspectivas .....	77
Referencias .....	78
Apéndices .....	86
Anexos .....	94

## Índice de Apéndices

<b>Apéndice 1.</b> Esquema para la preparación de las disoluciones de biopolímeros y el extracto de <i>H. pluvialis</i> .....	86
<b>Apéndice 2.</b> Esquema general para la obtención de las microcápsulas .....	87
<b>Apéndice 3.</b> Curvas de calibración obtenidas por UV/vis e IR .....	88
<b>Apéndice 4.</b> Curvas de calibración del ácido ascórbico y ácido gálico utilizados como controles para la determinación de la capacidad antioxidante frente al radical DPPH* .....	89
<b>Apéndice 5.</b> IC <sub>50</sub> y T <sub>EC50</sub> de los extractos obtenidos de los microencapsulados para la evaluación de la actividad antirradicalar frente al DPPH* .....	90

## Índice de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Métodos utilizados comúnmente para evaluar la capacidad/actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	94
<b>Anexo 2.</b> Bandas características de los materiales de barrera, aceite de oliva y astaxantina.....	95

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Fases de desarrollo de <i>Haematococcus pluvialis</i> en microscopía de campo claro (40X)	6
<b>Figura 2.</b> Esquema general de la biosíntesis de carotenoides.....	8
<b>Figura 3.</b> Ruta de biosíntesis de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Enantiómeros ( <b>1</b> : 3S,3'S), ( <b>2</b> : 3R,3'R) y compuesto meso de astaxantina ( <b>3</b> : 3R,3'S)	11
<b>Figura 5.</b> Estructuras generales de monoésteres y diésteres de astaxantina .....	11
<b>Figura 6.</b> Productos comerciales derivados de astaxantina .....	14
<b>Figura 7.</b> Actividad inhibitoria de radicales libres con astaxantina y $\alpha$ -tocoferol.....	16
<b>Figura 8.</b> Sitio de interacción de la astaxantina en la membrana celular .....	18
<b>Figura 9.</b> Micro- y nanocápsulas esféricas .....	21
<b>Figura 10.</b> Etapas principales en el proceso de coacervación compleja.....	24
<b>Figura 11.</b> Fabricación de cápsulas por coacervación compleja .....	25
<b>Figura 12.</b> Perfiles de solubilidad de la proteína de chícharo y cáñamo en función del pH .....	33
<b>Figura 13.</b> Metodologías de evaluación de biodisponibilidad y bioaccesibilidad.....	34
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática de un modelo de digestión <i>in vitro</i> .....	36
<b>Figura 15.</b> Esquema general de la metodología.....	37
<b>Figura 16.</b> Obtención de la proteína aislada de cáñamo .....	41
<b>Figura 17.</b> Obtención de microcápsulas suspendidas en medio acuoso. ....	46
<b>Figura 18.</b> Procedimiento para la ruptura de los microencapsulados .....	48
<b>Figura 19.</b> Espectros FTIR de a) harina de cáñamo comercial; b) aislado proteico de cáñamo; c) estándares de caseína-goma arábiga .....	58
<b>Figura 20.</b> Formación de microcápsulas suspendidas en medio acuoso almacenadas a 4°C .....	59
<b>Figura 21.</b> Microencapsulados a) en medio acuoso; b) Remoción de agua .....	59
<b>Figura 22.</b> Presencia de residuos insolubles de la proteína de cáñamo .....	60
<b>Figura 23.</b> Espectros IR de las microcápsulas .....	62
<b>Figura 24.</b> Micrografías y gráficos de frecuencia de distribución de diámetro de los microencapsulados.....	65
<b>Figura 25.</b> Eficiencias de microencapsulación .....	66
<b>Figura 26.</b> IC <sub>50</sub> de los extractos obtenidos de los cuatro tratamientos .....	68
<b>Figura 27.</b> T <sub>EC50</sub> del extracto AA-QUI-CANÑ .....	69
<b>Figura 28.</b> Sistema de digestión <i>in vitro</i> para la evaluación de la bioaccesibilidad de los microencapsulados.....	70
<b>Figura 29.</b> a) simulación gástrica de GA-CHI; b) simulación intestinal de GA-CHI .....	73
<b>Figura 30.</b> Etapa de reacción en microplaca de los extractos etanólicos de los digeridos con el radical DPPH' .....	75

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Características de la astaxantina.....	7
<b>Tabla 2.</b> Especies acuáticas con astaxantina.....	12
<b>Tabla 3.</b> Fuentes de astaxantina en clorofitas.....	13
<b>Tabla 4.</b> ED <sub>50</sub> de carotenoides como captadores de radicales libres .....	16
<b>Tabla 5.</b> Agentes encapsulantes.....	27
<b>Tabla 6.</b> Composición fraccional de proteínas extraídas de chícharo y cáñamo .....	31
<b>Tabla 7.</b> Métodos colorimétricos para cuantificación de proteína total .....	31
<b>Tabla 8.</b> Métodos para mejorar la pureza de proteínas.....	32
<b>Tabla 9.</b> Condiciones para la formación de los microencapsulados.....	46
<b>Tabla 10.</b> Constituyentes y concentraciones de los fluidos sintéticos que se emplearon en la simulación de la digestión de las microcápsulas .....	54
<b>Tabla 11.</b> T <sub>EC50</sub> y eficiencia antirradicalar (AE) de los extractos de los cuatro tratamientos .....	70
<b>Tabla 12.</b> Concentración de astaxantina antes y después del proceso de digestión .....	73
<b>Tabla 13.</b> Valores de IC <sub>50</sub> de los carotenoides para la actividad de extinción de <sup>1</sup> O <sub>2</sub> en dos disolventes ...	75

## Lista de Abreviaturas

AC	Agente de coacervación
AI	Agente inductor
AOEV	Aceite de oliva extravigen
ASE	Astaxantina sin encapsular
ATM	Astaxantina total en las microcápsulas
BHT	Hidroxitolueno butilado
QUI	Quitano
CAÑ	Cáñamo
CHI	Chícharo
CMC	Carboximetilcelulosa
DPPH*	Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
ED <sub>50</sub>	Dosis efectiva media
EMA	Eficiencia de microencapsulación
FSS	Fluido salival simulado
FGS	Fluido gástrico simulado
FRAP	Poder reductor férrico
GA	Goma arábica
GE	Gelatina
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media máxima
LBS	Líquido biliar simulado
LDS	Líquido duodenal simulado
ROS	Especies reactivas de oxígeno
$\alpha$ -TEAC	Capacidad antioxidante en equivalentes de $\alpha$ -tocoferol
TAH	Transferencia de átomos de hidrógeno
TEAC	Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox
TSE	Transferencia de un solo electrón
pI	Punto isoeléctrico

# Capítulo 1. Introducción

La astaxantina es un pigmento carotenoide extraído de microalgas clorofitas, principalmente de *Haematococcus pluvialis*, también se encuentra en otras especies acuáticas. Este compuesto está comercialmente disponible en forma de suplemento alimenticio en varios países, entre ellos México. La astaxantina es soluble en aceites y se le atribuyen propiedades biológicas, tales como actividad antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatoria y antidiabética. También se ha utilizado para la prevención de enfermedades cardiovasculares (Roche, 1987).

La fórmula molecular de la astaxantina es  $C_{40}H_{52}O_4$  y en su forma libre es sensible a la oxidación. Los grupos hidroxilo en el anillo ionona pueden esterificarse lo que conduce a una actividad antioxidante alta, así como presentar una polaridad intermedia (Meyers, 1993). Además, los animales no pueden sintetizar este compuesto y, por lo tanto, se adquiere dentro de la dieta a partir de especies acuáticas, microalgas y hongos (Lorenz y Cysewski, 2000). La astaxantina esterificada es inestable y susceptible a la degradación, sin embargo para reducir esos cambios se puede emplear la microencapsulación (Guerin *et al.*, 2003). Esta técnica proporciona una barrera que permite proteger contra factores externos (humedad, acidez, temperatura, oxidación, luz, alcalinidad) a los compuestos y de esa manera mejorar la estabilidad (Bansode *et al.*, 2010; Vakarelova *et al.*, 2017).

Las tecnologías para la microencapsulación más empleadas son la coacervación, secado por pulverización, liofilización y extrusión (Bustamante *et al.*, 2016). La coacervación puede realizarse de dos formas, una implica el uso de un biopolímero para generar la barrera que permite recubrir al agente a encapsular (coacervación simple) y la otra involucra dos o más

biopolímeros para generar la barrera por atracciones electrostáticas atractivas (Bansode *et al.*, 2010).

Los compuestos bioactivos (astaxantina) que son digeridos, deben llegar intactos al intestino delgado para que cumplan su función específica. Esto se vuelve un reto importante, debido a que estos compuestos bioactivos sometidos al proceso de digestión, durante el tránsito del tracto digestivo, pueden sufrir degradación y consecuentemente, disminuir o perder su bioactividad (Alminger *et al.*, 2014; Courraud *et al.*, 2013).

Por todo lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue evaluar la estabilidad y bioaccesibilidad de microencapsulados de extractos de *Haematococcus pluviialis* ricos en astaxantina.

## **1.1 Originalidad**

En los últimos años ha llamado el interés el empleo de proteínas derivadas de vegetales en comparación con proteínas derivadas de fuentes animales. Además, las proteínas vegetales no han sido muy utilizadas en la industria y de esa manera se puede dar un valor agregado al empleo de este tipo de proteínas.

En el caso de los polisacáridos, algunos de ellos incluso pueden ser extraídos a partir de desechos. Además, este tipo de biopolímeros pueden generar alternativas que permitan el aprovechamiento de estos para llevar a cabo una microencapsulación.

En la literatura existen reportes relacionados con la obtención de microencapsulados de astaxantina y sus derivados. Sin embargo, el uso del método de coacervación compleja para obtener estos microencapsulados de extractos de *H. pluviialis* en aceite de oliva extravirgen, empleando dos proteínas distintas (cáñamo o chícharo) y polisacáridos (goma arábica o quitosano) como agentes de barrera aún no ha sido reportado. Los resultados del presente estudio



permiten conocer el efecto de la proteína sobre la estabilidad de microcápsulas de extractos de *H. pluviialis* en aceite de oliva extravirgen durante un proceso de digestión *in vitro*.

## **1.2 Hipótesis**

La microencapsulación de astaxantina mediante el método de coacervación compleja, utilizando como agentes encapsulantes una combinación de proteína (chícharo o cáñamo)/polisacárido (goma arábica o quitosano), permite mejorar su estabilidad durante un proceso de digestión *in vitro* y consecuentemente su bioaccesibilidad.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general**

Evaluar la estabilidad de microencapsulados, bioaccesibilidad y actividad antirradicalar de extractos de *Haematococcus pluviialis* ricos en astaxantina.

### **1.3.2 Objetivos particulares**

1. Obtener microencapsulados de astaxantina-aceite de oliva empleando como agentes de pared proteínas de chícharo o cáñamo en presencia de goma arábica o quitosano.
2. Caracterizar físicamente las microcápsulas mediante microscopía óptica petrográfica.
3. Evaluar la eficiencia de microencapsulación de astaxantina total mediante espectrofotometría de UV/vis.
4. Evaluar las microcápsulas durante un proceso de digestión *in vitro* para determinar su bioaccesibilidad.
5. Identificar las microcápsulas más estables y bioaccesibles al proceso de digestión *in vitro*.
6. Evaluar la actividad antirradicalar de los productos obtenidos del proceso de digestión *in vitro* mediante el método del radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).

## **1.4 Justificación**

La astaxantina es uno de los compuestos antioxidantes más potentes que existe en la naturaleza. Cabe señalar que la fuente natural más importante de ésteres derivados de astaxantina es la microalga *H. pluvialis*. Existen reportes que la astaxantina mezclada con aceites es más estable y retiene mayor contenido de astaxantina comparado con otros carotenoides. La astaxantina y sus ésteres al tener una cadena hidrocarbonada poli-insaturada se vuelve susceptible a procesos de degradación durante el almacenamiento. Por tal motivo es importante desarrollar métodos para la obtención de formulados que permitan estabilizar sin disminuir la bioaccesibilidad de extractos de *H. pluvialis* ricos en ésteres de astaxantina durante el proceso de digestión.

## Capítulo 2. Análisis de Fundamentos

La astaxantina es un compuesto que se caracteriza por presentar una coloración rojiza, esta molécula es de interés debido a que proporciona beneficios en la salud humana. Además, a diferencia de otros carotenoides, como el licopeno y el  $\beta$ -caroteno, la astaxantina no muestra actividad pro-oxidante, incluso a concentraciones elevadas. Es por eso que evitar la degradación de este compuesto por factores externos ha resultado ser una necesidad. Se ha demostrado que la astaxantina es mejor antioxidante que otros compuestos como el  $\alpha$ -tocoferol, luteína y  $\beta$ -caroteno (Anuradha, 2018).

### 2.1 Taxonomía de *Haematococcus pluvialis*

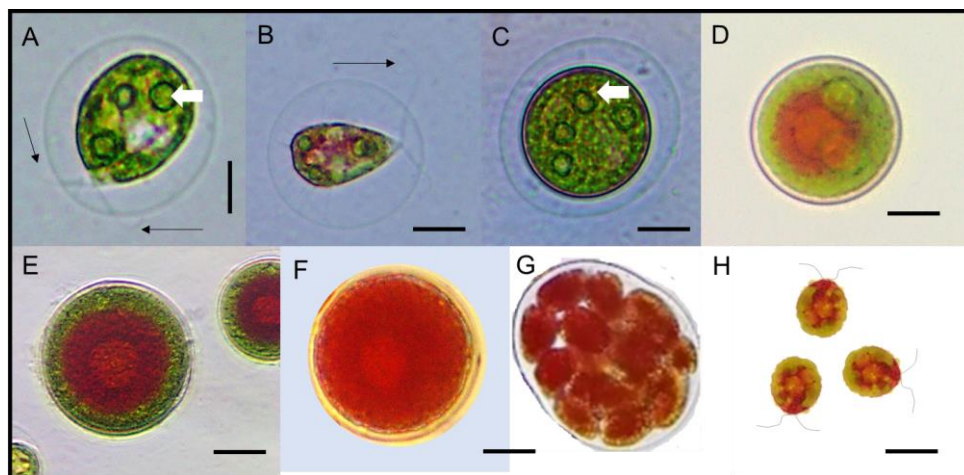
La microalga unicelular y de agua dulce *Haematococcus pluvialis* Flotow 1844 como se le conoce comercialmente, pertenece a la clase *Chlorophyceae*, orden *Chlamydomonadales*, familia *Haematococcaceae*. Además, tiene como sinónimos a *Sphaerella lacustris* y nombre taxonómicamente válido a *H. lacustris* (Li *et al.*, 2012).

### 2.2 Morfología celular y ciclo de vida

*H. pluvialis* consta de cuatro tipos de morfologías celulares: macrozooides (zoosporas), microzooides, palmela, y hematocistos (aplanosporas). Las etapas de macrozooides (zoosporas), microzooides y palmela generalmente se les llama "fase vegetativa verde". Los hematocistos (aplanosporas) se denomina "astaxantina roja inmóvil acumulada en fase enquistada" del ciclo de vida de *H. pluvialis*. Los macrozooides (zoosporas) son esféricos, células elipsoidales con dos flagelos de igual longitud que emergen del extremo. Los cloroplastos tienen forma de copa con numerosos pirenoides dispersos, Figura 1. Además, miden entre 8-20  $\mu\text{m}$  de largo con un distintivo gelatinoso de espesor variable. Estas células vegetativas flageladas de crecimiento

rápido predominan en condiciones de cultivo favorables en la etapa de crecimiento vegetativo temprano. Además, forman una multicapa amorfa en las regiones internas de la matriz extracelular a medida que se desarrollan en una “palmela” no móvil y se convierten en células vegetativas en reposo. Continuando con las condiciones de estrés y cese la división celular, “palmela” se transforma en aplanosporas asexuales. Estas, en su etapa madura acumulan concentraciones altas de astaxantina, en gotas de aceite depositadas en el citoplasma, que resulta en un color característico rojo brillante (Shah *et al.*, 2016).

También, este organismo puede acumular concentraciones altas de astaxantina (3.8% base seca) bajo condiciones de estrés, ya que es sensible a rayos UV, cuando hay escasez de nutrientes, se incrementa la salinidad y la temperatura, a cambios en el ciclo de luz/oscuridad, pH o a especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fernández-Lozano *et al.*, 2015; Ranga-Rao *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Fases de desarrollo de *Haematococcus pluvialis* en microscopía de campo claro (40X)  
 A-B) Célula flagelada y móvil, C) Inicio del estado palmeloide, D-E) Aplanospora, F) Célula enquistada rica en astaxantina, G) Células en división (Esoyngio), H) Zoosporas liberadas del esoyngio ricas en astaxantina  
 Barra de escala = 10  $\mu$ m

Micrografías: Márquez de la Cruz, A. M. y Torres-Ariño A. (2021)

## 2.3 Características de la astaxantina

La astaxantina es un miembro de los tetraterpenos y su nombre se deriva del crustáceo *Astacus astacus*, se encuentra dentro de la familia de las xantófilas, las cuales se caracterizan por ser pigmentos (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Santos-Sánchez *et al.*, 2020). En la Tabla 1 se muestran sus características principales. El consumo de astaxantina se puede encontrar en un intervalo de 4–100 mg/día, esta concentración es segura para los humanos y hasta ahora no se ha reportado de algún tipo de toxicidad que se pueda generar (Anuradha, 2018).

**Tabla 1.** Características de la astaxantina

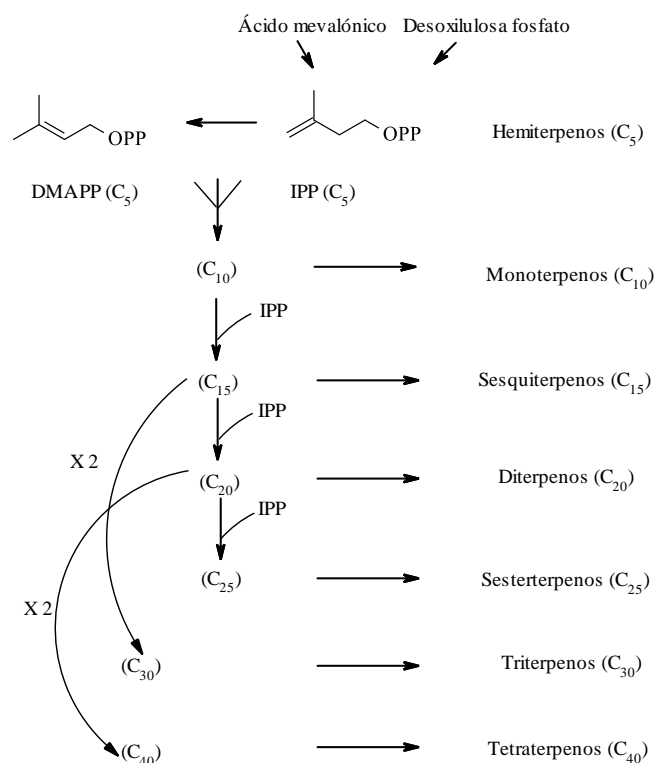
Características	Descripción
Nombre químico	Astaxantina
Peso molecular	596,8 Daltons
Fórmula molecular	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub>
Solubilidad	Insoluble en agua Soluble en hexano, acetona, éter etílico
Color	Rojo oscuro
Almacenamiento	< 69°C

Fuente: (Córdoba-Castro *et al.*, 2015)

## 2.4 Ruta biosintética de los carotenoides

Se han encontrado dos vías distintas para la biosíntesis del isopentenil pirofosfato (IPP) el cual es el precursor de los carotenoides: la vía del mevalonato localizada en el citosol y la vía de 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato localizada en el cloroplasto, esta última se cree que es la que realizan las microalgas unicelulares como *H. pluvialis*. El IPP (C<sub>5</sub>) se isomeriza a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) y mediante la condensación de estos da lugar a geranil pirofosfato (GPP, C<sub>10</sub>), este producto de reacción se condensa con otra unidad de IPP para conducir al farnesil pirofosfato (FPP, C<sub>15</sub>), que es el precursor del geranil-geranil pirofosfato de 20 átomos de carbono (GGPP,

C<sub>20</sub>). Posteriormente, la condensación de dos unidades de GGPP forma un fitoeno de 40 átomos de carbono, que es el precursor de todos los carotenoides (Lv *et al.*, 2016).

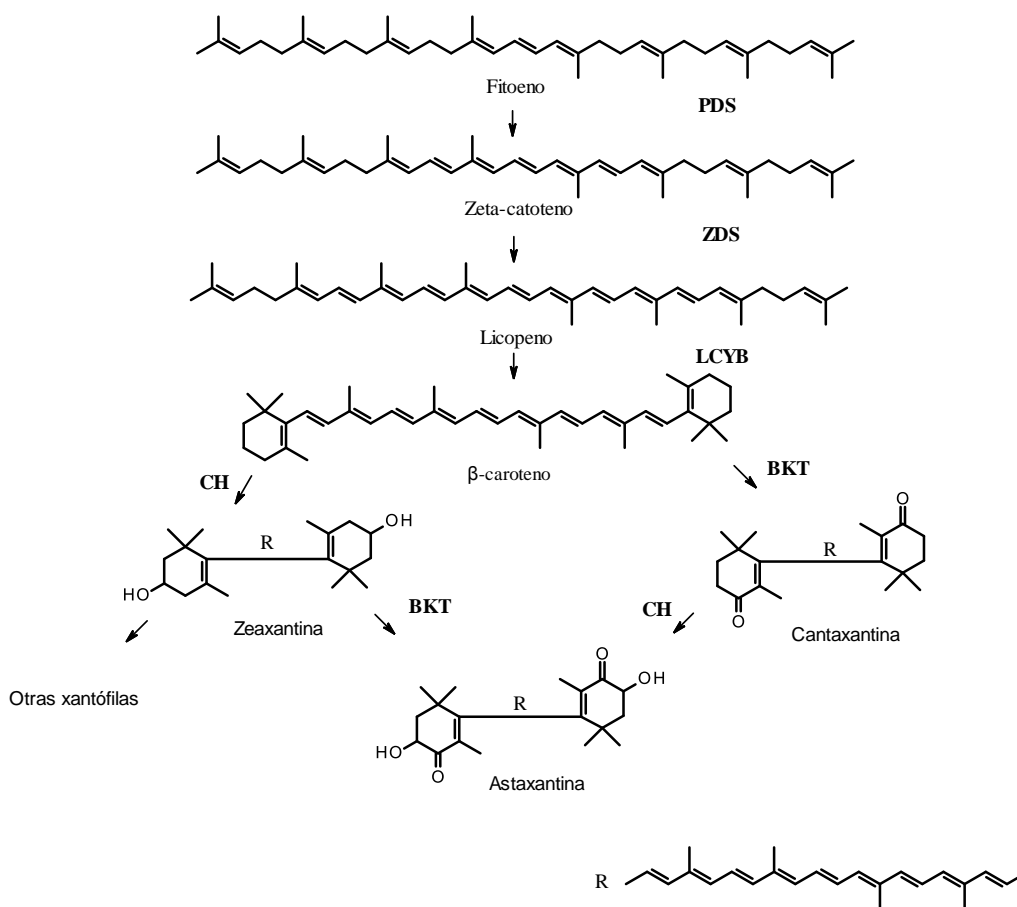


**Figura 2.** Esquema general de la biosíntesis de carotenoides  
Fuente: (Dewick, 2002)

## 2.5 Ruta biosintética de la axtaxantina

Las enzimas de biosíntesis de los carotenoides son fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), ζ-caroteno desaturasa (ZDS), licopeno ciclasa (LCYB), β-caroteno cetolasa (BKT) y carotenoide hidroxilasa (CH). La biosíntesis de la astaxantina comienza con la condensación de dos moléculas de GGPP para formar fitoeno, como se mencionó en la sección anterior. Cuatro reacciones de desaturación conducen a la síntesis de licopeno seguida por dos reacciones de

ciclización para la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno. La conversión de este en astaxantina se lleva a cabo mediante dos enzimas, BKT y CH (Steinbrenner & Linden, 2001).



**Figura 3.** Ruta de biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis*

Fuente: (Steinbrenner & Linden, 2001)

## 2.6 Estructura química de la astaxantina

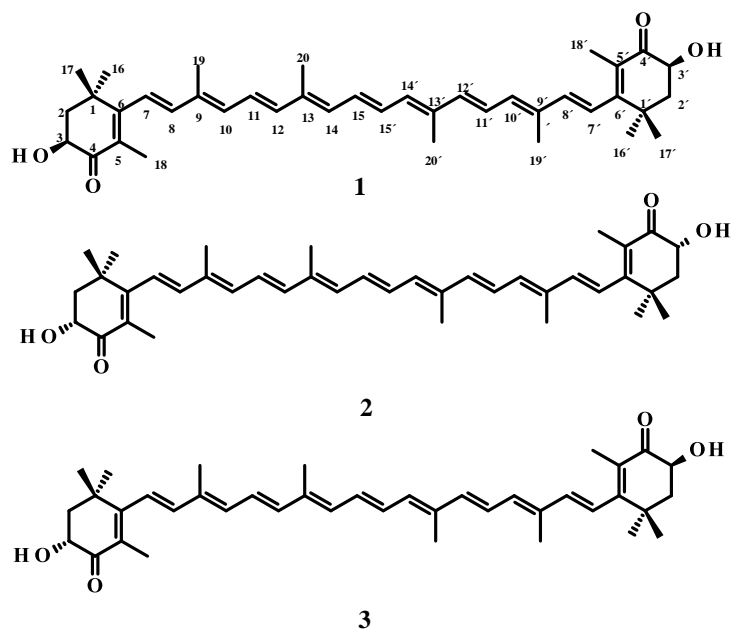
La estructura de este compuesto tiene 13 dobles enlaces conjugados como se muestra en la Figura 4, estas insaturaciones le confiere una actividad antioxidante potente, permitiendo la eliminación de ROS y neutralizando radicales libres (Miki, 1991; Vershinin, 1999). Cada doble enlace de la cadena de polieno puede existir en dos configuraciones como isómeros geométricos *Z* o *E* (Dhankhar *et al.*, 2012).

La astaxantina consta de dos anillos terminales (iononas) unidos a una cadena de polieno. En estos anillos se tienen dos centros estereogénicos en la posición 3,3', que son base de los grupos hidroxilo. La presencia de estos grupos, el grupo ceto y la cadena poli-insaturada explica la capacidad antioxidante que tiene este compuesto, comparado con algún otro carotenoide. Además, se sabe que los grupos hidroxilos forman mono- y diésteres cuando reaccionan con uno o dos ácidos grasos, respectivamente (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).

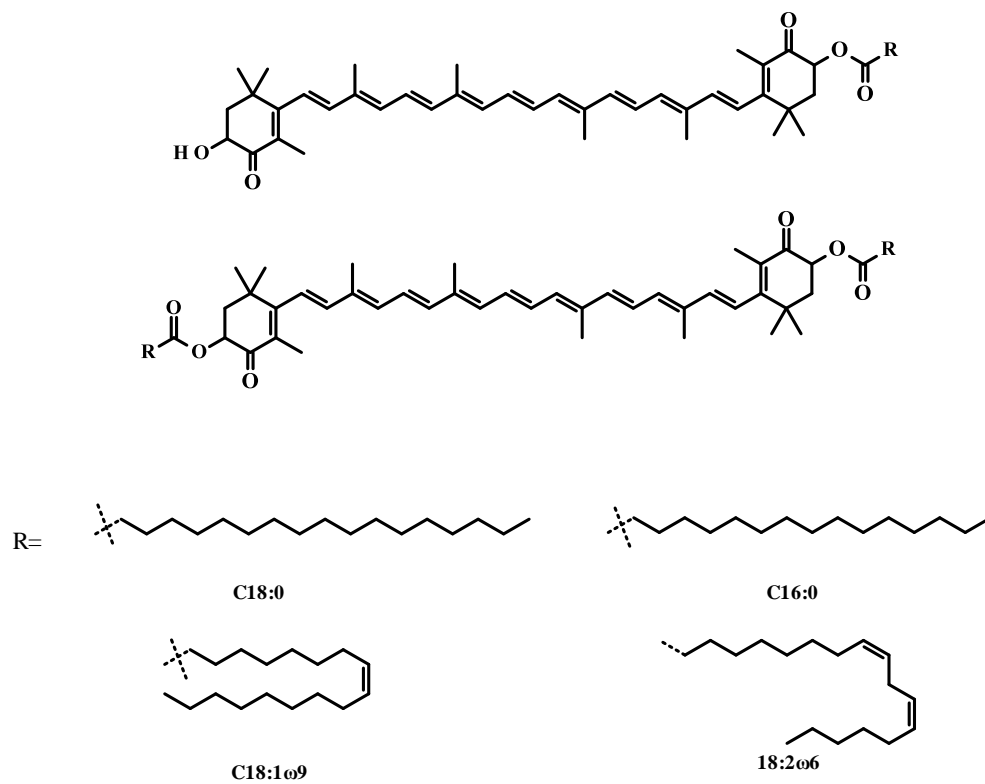
Debido a los dos centros estereogénicos existen un par de enantiómeros (**1** y **2**) y un compuesto *meso* (**3**) de la astaxantina, Figura 4. Además, como ya se mencionó, se pueden presentar isómeros geométricos de la astaxantina, así como las formas libres y esterificadas con ácidos grasos como el oléico, que es el más comúnmente encontrado formando ésteres con la astaxantina (Holtin *et al.*, 2009). Sin embargo, también se pueden encontrar de forma natural otros ésteres derivados de ácidos grasos como el palmítico, esteárico y linoleico, todo esto dependiendo de su origen, Figura 5 (Johnson & An, 1991; Santos-Sánchez *et al.*, 2020).

Por otra parte, los estereoisómeros encontrados en diferentes fuentes no son iguales, por ejemplo en *H. pluvialis* se encuentra principalmente el isómero 3*S*,3'*S* (**1**) mientras que la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* produce el isómero 3*R*,3'*R* (**2**) (Hussein *et al.*, 2006).





**Figura 4.** Enantiómeros (**1**:  $3S,3'S$ ), (**2**:  $3R,3'R$ ) y compuesto meso de astaxantina (**3**:  $3R,3'S$ )



**Figura 5.** Estructuras generales de monoésteres y diésteres de astaxantina

## 2.7 Fuentes naturales de astaxantina

La astaxantina es el pigmento responsable de impartir color a peces como el salmón y la trucha. Algunos organismos acuáticos presentan un contenido significativo de este compuesto como el cangrejo, camarón y salmón, Tabla 2 (Chew *et al.*, 1999). La astaxantina es el carotenoide más abundante en la mayoría de los crustáceos y salmónidos. Este compuesto proporciona el color rojizo-anaranjado característico de las especies acuáticas y se almacena principalmente en la piel, músculo de los peces, y en el exoesqueleto de los crustáceos (Yamada *et al.*, 1990).

**Tabla 2.** Especies acuáticas con astaxantina

Fuentes	Astaxantina total (mg/100g)	Referencias
Camarón boreal ( <i>Pandalus borealis</i> )	0.12 <sup>b</sup>	(Meyers & Bligh, 1981)
Camarón boreal ( <i>P. borealis</i> )	4.97 <sup>a</sup>	(Torrissen <i>et al.</i> , 1981)
Cangrejo de río ( <i>Procambarus clarkii</i> )	15.3 <sup>c</sup>	(Meyers & Bligh, 1981)
Cangrejo azul ( <i>Chionoecetes opilio</i> )	11.96 <sup>c</sup>	(Shahidi & Synowiecki, 1991)
Salmón rojo ( <i>Oncorhynchus nerka</i> )	8.1-11.8 <sup>b</sup>	(EFSA, 2005)
Salmón del atlántico ( <i>Salmo salar</i> )	1.8-2.5 <sup>b</sup>	(EFSA, 2005)
Salmón rosado ( <i>O. gorbuscha</i> )	1.2 <sup>b</sup>	(EFSA, 2005)
Trucha arcoíris ( <i>O. mykiss</i> )	0.054 <sup>b</sup>	(Sommer <i>et al.</i> , 1991)

<sup>a</sup>mg/100 g en base húmeda, <sup>b</sup>mg/100g en base seca, <sup>c</sup>mg/100g de desechos

En el caso de algunas microalgas, específicamente *H. pluviialis* acumula concentraciones altas de astaxantina esterificada (95% del total de astaxantina presente en la microalga) de la cual, un 70% corresponde a monoésteres y 25% a diésteres (Breithaupt, 2004). También existen otros tipos de microalgas que producen astaxantina, entre ellas *Chlorococcum*, *Chlorella zofingiensis*, *Neochloris wimmeri*, *Ulva lactuca* (macroalga) como se muestra en la Tabla 3 (Sarada *et al.*, 2012).

La astaxantina representa alrededor del 60-80% de los carotenoides totales presentes en los aglomerados de células de la microalga *H. pluvialis* (quistes). Sin embargo, la barrera celular de estos no es fácil fragmentarla de manera que pueda entrar un disolvente para facilitar la extracción de la astaxantina (Li *et al.*, 2012).

**Tabla 3.** Fuentes de astaxantina en clorofitas

Fuente	Astaxantina total (mg/100g en base seca)	Referencias
Microalga		
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3,800	(Ranga-Rao <i>et al.</i> , 2010)
<i>Chlorococcum</i>	200	(Zhang & Lee, 1997)
<i>Neochloris wimmeri</i>	600	(Orosa <i>et al.</i> , 2000)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	1	(Wang & Peng, 2008)
Macroalga		
<i>Ulva lactuca</i>	100	(Banerjee <i>et al.</i> , 2009)

## 2.8 Compuestos antioxidantes y su mecanismo

Los antioxidantes son sustancias que a concentraciones bajas reducen o retrasan la oxidación de un sustrato. Este mecanismo se lleva a cabo a través de transferencia de átomos de hidrógeno (TAH), transferencia de un solo electrón (TSE) y por la capacidad de quelar metales de transición. Con base en la estructura química del antioxidante es posible comprender el mecanismo de reacción. Algunos compuestos orgánicos que tienen actividad antioxidante destacan los polifenoles, carotenoides, vitamina C entre otros, que reaccionan principalmente con radicales libres. Existen métodos diversos para evaluar la actividad antioxidante, estos pueden ser *in vivo* e *in vitro*. Cabe mencionar que estas reacciones se llevan a cabo en pocos minutos (Santos-Sánchez *et al.*, 2019). Algunos de los métodos empleados se muestran en el Anexo 1.

## 2.9 Usos y aplicaciones

La astaxantina ha sido utilizada como suplemento alimenticio, además se considera que podría disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y desórdenes neurodegenerativos (Ranga-Rao *et al.*, 2014). El estudio de la astaxantina ha tomado interés recientemente debido a los posibles beneficios en la salud. Además, ha mostrado capacidad para reducir radicales libres, generados por las ROS (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006). En el mercado se encuentran productos derivados de este componente en forma de tabletas, cápsulas, aceites, geles, cremas y polvos granulados, Figura 6 (Ranga-Rao *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Productos comerciales derivados de astaxantina

Fuente: <https://productos.mercolamarket.com/astaxantina/>

[https://www.instyle.es/belleza/cara/colageno-japones-para-cara\\_43536](https://www.instyle.es/belleza/cara/colageno-japones-para-cara_43536)

En la sección siguiente se describirán con más detalle las propiedades antioxidantes de la astaxantina y sus ésteres provenientes de fuentes naturales.

## 2.10 Beneficios saludables de la astaxantina

La presencia de los grupos hidroxilo (OH) y ceto (C=O) en los anillos ionona de la astaxantina, explican las características de este compuesto, entre ellas una mayor actividad antioxidante. En los últimos años, se han realizado varios estudios *in vitro* e *in vivo* sobre su efecto como

antioxidante. Además de esto, diversas actividades se le atribuyen como anticancerígeno, anti-inflamatorio, antidiabético y neuroprotector (Dhankhar *et al.*, 2012).

En sistemas biológicos, el daño oxidativo es iniciado principalmente por ROS y condicionan a enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento acelerado, producto de un proceso inflamatorio crónico. El estrés oxidativo es provocado por un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante de las células, afectando también biomoléculas como los lípidos, proteínas y ADN (Ranga-Rao *et al.*, 2014; Montezano & Touyz, 2012).

La cadena poli-insaturada de la astaxantina atrapa los radicales libres cuando se encuentra en la membrana celular, mientras que los anillos terminales los eliminan en la parte externa e interna de la membrana. Además, la astaxantina puede inhibir la oxidación ocasionada por ROS, entre ellos los radicales libres. Cabe destacar que un exceso de ROS, provoca que biomoléculas como las proteínas, lípidos y ADN presentes en las células, se oxiden y consecuentemente generen diversos desórdenes que pueden conducir a enfermedades crónico-degenerativas (Naguib, 2000).

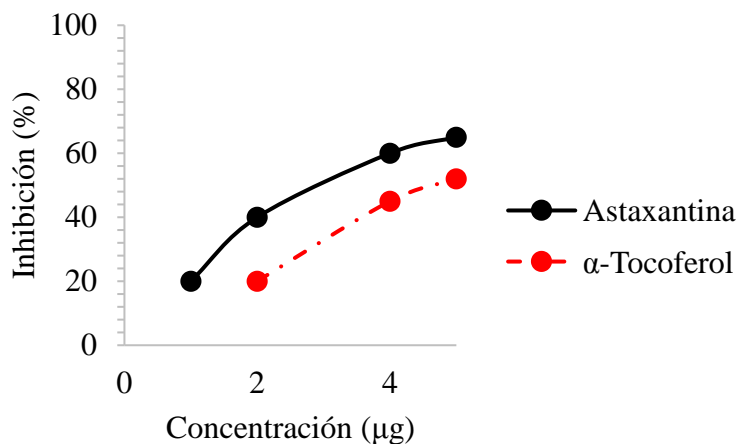
Miki (1991) menciona que la actividad antioxidante de la astaxantina es aproximadamente 10 veces mayor que cualquier otro carotenoide y hasta 100 veces mayor que  $\alpha$ -tocoferol. Esto fue determinado a partir de la evaluación de la actividad inhibitoria de la astaxantina sobre la peroxidación lipídica medida por radicales peroxilo. También observó una gran efectividad de carotenoides tales como luteína, zeaxantina, tunaxantina y cantaxantina. En este estudio, los radicales libres fueron producidos por la acción del ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en mitocondrias de ratas. Los resultados obtenidos a partir de la astaxantina indican que es el captador más eficiente de radicales libres, mostrando una dosis efectiva media ( $\text{ED}_{50}$ ) de 0.2  $\mu\text{M}$  (200 nM), mientras que la  $\text{ED}_{50}$  para el  $\alpha$ -tocoferol fue de aproximadamente 3  $\mu\text{M}$  (2,940 nM) Tabla 4. La Figura 7 representa en forma general que la astaxantina a menor concentración es capaz de inhibir un

porcentaje mayor de radicales libres comparado con  $\alpha$ -tocoferol. Estos resultados indican que los grupos carbonilos, hidroxilos y los dobles enlaces conjugados presentes en la astaxantina tienen una afinidad alta por los radicales libres.

**Tabla 4.** ED<sub>50</sub> de carotenoides como captadores de radicales libres

Compuesto	ED <sub>50</sub> (nM)
Astaxantina	200
Zeaxantina	400
Cantaxantina	450
Luteína	700
Tunaxantina	780
$\beta$ -Caroteno	960
$\alpha$ -Tocoferol	2,940

Fuente: (Miki, 1991)



**Figura 7.** Actividad inhibitoria de radicales libres con astaxantina y  $\alpha$ -tocoferol

Fuente: (Miki, 1991)

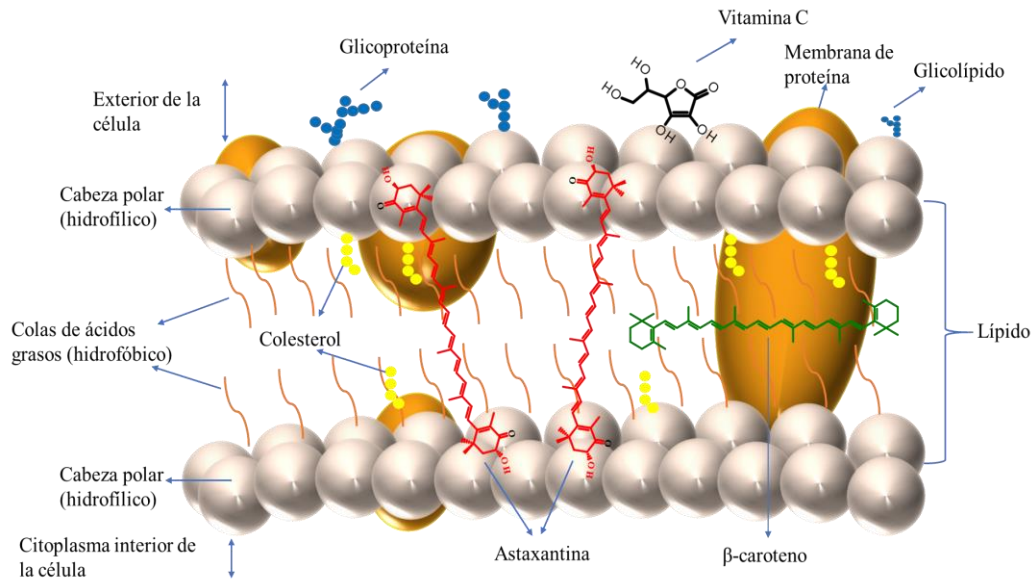
Cabe señalar que los antioxidantes durante el proceso de digestión pueden ser susceptibles a cambios estructurales que pueden alterar sus propiedades. Por lo tanto se vuelve importante

desarrollar formulaciones que estabilicen estos compuestos durante la digestión. Entre estas formulaciones se encuentran los micro- y nanoencapsulados. También son necesarios métodos que permitan evaluar su estabilidad durante la digestión. Por tal motivo, se han desarrollado métodos de evaluación de digestión *in vitro*. Estos permiten hacer reproducibles los resultados y tener buenas estimaciones de la estabilidad de los compuestos bioactivos.

En las secciones siguientes se hace una descripción breve de estudios relacionados con la estabilidad de la astaxantina y los modelos de digestión *in vitro* comúnmente empleados para evaluar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos.

## **2.11 Posición superior en la membrana celular**

La astaxantina es un antioxidante que ha tomado relevancia en los últimos años debido a que se considera potente, seguro y tiene una posición estratégica dentro de la membrana celular (Santos-Sánchez *et al.*, 2020), Figura 8. Los anillos de la astaxantina son capaces de eliminar radicales libres tanto en la superficie como en la parte interior (hidrofílica y lipofílica) de la membrana. Por otro lado, la vitamina C también actúa como antioxidante, y es eficaz altamente en la fase acuosa, es por eso que se sitúa en la parte hidrofílica de la membrana. Sin embargo, el  $\beta$ -caroteno se sitúa en la parte interna de la membrana (parte hidrofóbica) donde puede atrapar radicales libres. De esa manera se puede observar la gran capacidad que tiene la astaxantina comparada con otros antioxidantes (Yamashita, 2013).



**Figura 8.** Sitio de interacción de la astaxantina en la membrana celular  
Fuente: (Ranga-Rao *et al.*, 2014)

## 2.12 Almacenamiento y estabilidad de la astaxantina

La astaxantina derivada de *H. pluvialis* se ha demostrado que es estable en aceites comestibles como el de arroz o palma a temperaturas de 70-90°C, logrando retener un 84-90% del contenido de astaxantina. Mientras que a temperaturas entre 120-150°C se reduce la retención (Ranga-Rao *et al.*, 2014). La estabilidad de la astaxantina ha sido evaluada en condiciones de almacenamiento diferentes y sometida a procesos de micro- y nanoencapsulación (Ranga-Rao *et al.*, 2007). La estabilidad de la astaxantina varía en función del pH y se ha encontrado que es estable a un pH de 4 (Villalobos-Castillejos *et al.*, 2013).

## 2.13 Aceite de oliva extravirgen

La dieta mediterránea se asocia con una menor incidencia de padecer enfermedades crónico-degenerativas y mayor esperanza de vida. Estos beneficios para la salud se han atribuido en parte



al consumo de aceite de oliva extravirgen (AOEV), debido a que presenta compuestos fenólicos que tienen la función de actividad antioxidante (Cicerale *et al.*, 2012).

Este aceite es extraído mecánicamente del fruto del olivo (*Olea europaea* L.), se sabe que tiene concentraciones altas de ácido oleico, tocoferoles (vitamina E) y polifenoles como la oleuropeína. Este compuesto ha mostrado una actividad antioxidante alta y propiedades anti-inflamatorias (Mañas y Martínez de Victoria, 2004; Benavente-García *et al.*, 2000).

El período máximo de almacenamiento del AOEV es de 12 a 18 meses, y los compuestos bioactivos permanecen relativamente estables durante este período a temperaturas bajas y exposición reducida al oxígeno y a la luz (Morelló *et al.*, 2004).

La calidad del AOEV se puede diferenciar aún más en términos de oxidación, índices de hidrólisis, acidez, índice de peróxido e índices espectroscópicos en la región UV (Lavelli *et al.*, 2006).

Por otra parte, la astaxantina es soluble en aceites e incrementa su absorción cuando se consume con aceites dietéticos. La biodisponibilidad de la astaxantina en humanos mejora mediante formulaciones a base de lípidos; cantidades altas de carotenos solubilizados en la fase oleosa de la matriz alimentaria pueden conducir a una biodisponibilidad mayor (Ranga-Rao *et al.*, 2014).

## **2.14 Biodisponibilidad de la astaxantina**

La absorción de los carotenoides dependen principalmente de su estructura, por ejemplo, los carotenoides polares (astaxantina libre) tienden a ser de mayor biodisponibilidad que las especies apolares ( $\beta$ -caroteno y licopeno) (Dhankhar *et al.*, 2012). La astaxantina administrada se acumula en el hígado principalmente y se encuentra insignificamente en el corazón y los tejidos cerebrales en ratones. Al parecer, cuando la ingestión de astaxantina es frecuente, su

biodisponibilidad es mejor, siempre y cuando no sufra degradación durante su recorrido por las condiciones del cuerpo humano (Anuradha, 2018).

## **2.15 Formulados de astaxantina**

La astaxantina, como se ha comentado, es susceptible a la degradación química debido a las insaturaciones en su estructura, esto conduce a una pérdida de sus propiedades biológicas. Es por eso que es importante el desarrollo de formulados que permitan mejorar su estabilidad como la microencapsulación (Vakarelova *et al.*, 2017).

### **2.15.1 Encapsulación**

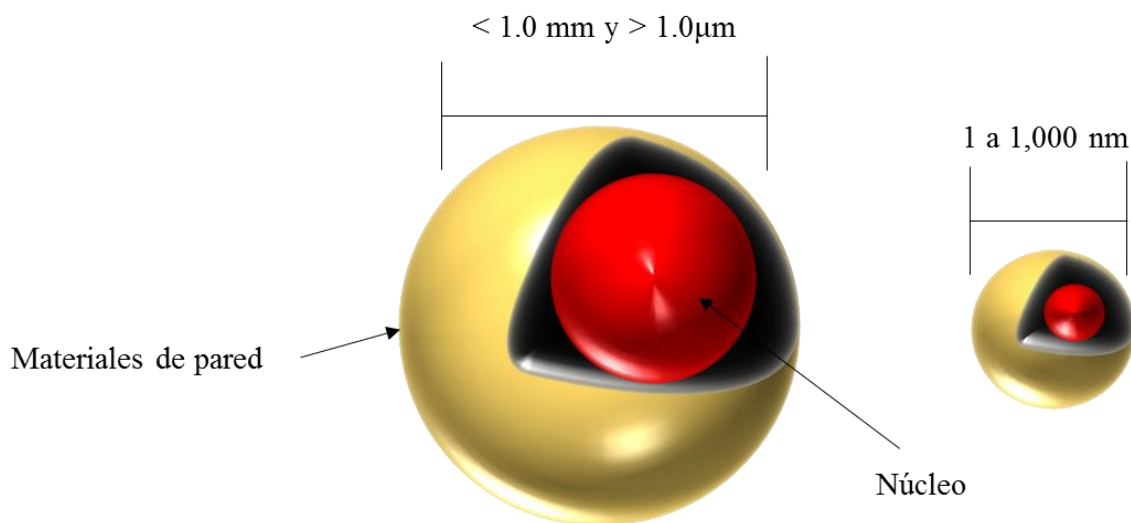
Esta tecnología permite la protección adecuada de compuestos bioactivos que están en contacto con factores ambientales. Existen métodos para la preparación de encapsulados, que dependen principalmente de las propiedades del material a encapsular, costo de materiales, reactivos empleados, tamaño de la cápsula y los mecanismos de liberación del o de los compuestos bioactivos (Pedroza-Islas *et al.*, 2002). Los factores como luz, humedad, temperatura, pH y oxidación, afectan la estabilidad de la astaxantina por lo tanto requiere de un método que permita prolongar su vida útil, tal como la encapsulación (Higuera-Ciapara *et al.*, 2004). Los métodos más empleados para la encapsulación de astaxantina son la micro- y nanoencapsulación (Vakarelova *et al.*, 2017).

### **2.15.2 Microencapsulación**

La microencapsulación puede proporcionar una barrera física para proteger los compuestos de factores ambientales, y mejorar la estabilidad del compuesto (Bansode *et al.*, 2010).

La finalidad de la microencapsulación es el recubrimiento de sustancias sólidas o líquidas, obteniendo así partículas de tamaño micrométrico. Las micropartículas, microcápsulas o

microesferas, se diferencian en su forma y estructura interna; sin embargo, todas presentan un tamaño de partícula  $<1.0 \text{ mm}$  y  $>1.0 \mu\text{m}$ , Figura 9. La microencapsulación ha adquirido en la industria alimentaria aplicaciones amplias para la protección de vitaminas, minerales y otros componentes sensibles a factores externos que generen su posterior degradación (Champagne & Fustier, 2007; Lopes *et al.*, 2016).



**Figura 9.** Micro- y nanocápsulas esféricas

### 2.15.3 Nanoencapsulación

Las nanocápsulas son partículas con nanodimensiones, en el intervalo de 1 a 1000 nm, Figura 9 (FDA, 2014). El beneficio principal es la homogeneidad inducida, que conduce a una buena eficiencia de encapsulación además de la mejora en la estabilidad de las propiedades físicas y químicas del agente a encapsular (Khare & Vasisht, 2014). La característica más importante de las nanocápsulas es su tamaño nanoscópico que proporciona una gran superficie. El área de superficie total es inversamente proporcional al diámetro de la cápsula. Esta gran área de

superficie es apropiada para incorporar especies de reconocimiento (funcionalización con péptidos, anticuerpos, polímeros orgánicos, entre otros), sitios de adsorción y desorción, reacciones químicas, dispersión de luz, entre otros. La industria alimentaria actual utiliza la nanoencapsulación para desarrollar alimentos funcionales con ingredientes que mejoran el contenido nutricional de los alimentos sin afectar el sabor, aroma y textura de los alimentos; además de la estabilidad del ingrediente y el producto alimenticio terminado (Augustin & Hemar, 2009).

La nanoencapsulación se ha utilizado para proteger ingredientes alimenticios sensibles, así como para proporcionar una textura viable, una liberación de aroma atractiva y un enmascaramiento del sabor, olor y color (Hanus & Harris, 2013).

#### **2.15.4 Micro y nano-encapsulación por coacervación**

El término "coacervación" es utilizado en química coloidal para denotar el proceso asociativo de separación de fases inducido por la modificación del medio (pH, fuerza iónica, temperatura, solubilidad) en condiciones controladas. Su nombre deriva de la palabra latina "*acervus*" que significa "montón" precedido por el sufijo "co" que indica un fenómeno asociativo entre dos reactivos (Timilsena *et al.*, 2019).

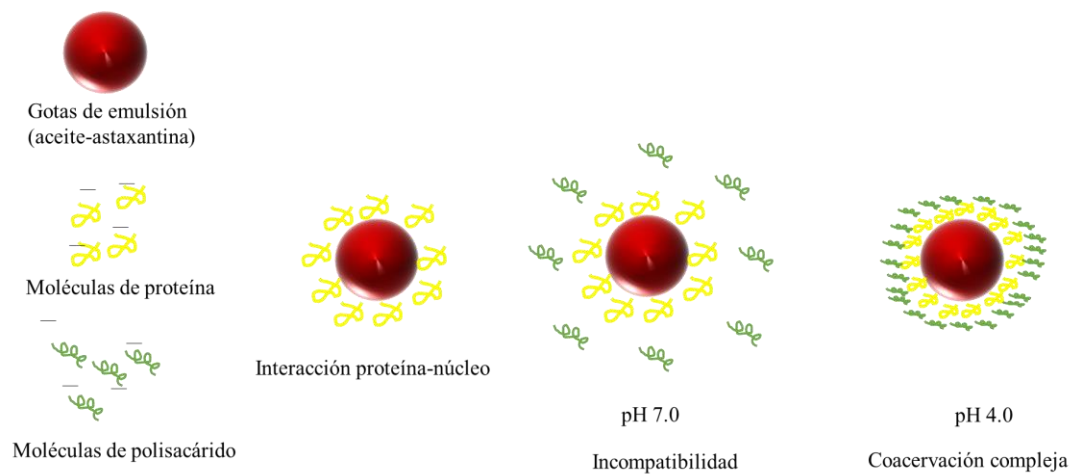
En este proceso, la fase rica en coloide se conoce como fase coacervada, mientras que la que contiene cantidades muy pequeñas de coloide se conoce como fase de equilibrio (Florence & Attwood, 1998).

Según los sistemas de polímeros implicados en la reacción y el mecanismo de separación de fases, existen dos tipos de procesos de coacervación: simple y compleja. En el proceso de coacervación simple, involucra sólo un polímero y se forman coacervados debido a un mecanismo de deshidratación causado por la adición de una sal o líquido de desolvatación,

también llamado agente de coacervación (AC) o agente inductor (AI), en el medio de reacción. Un buen ejemplo de un proceso de coacervación simple es la separación de fases cuando se adiciona una disolución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) a una disolución de alginato de sodio ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$ ). Por otra parte, en procesos de coacervación complejos, las interacciones iónicas entre dos o más biopolímeros con carga opuesta, generalmente proteínas y polisacáridos, conducen a la formación de coacervados y la separación de fases (Bachtsi & Kiparissides, 1996). El factor impulsor principal de la coacervación compleja es la interacción electrostática entre las macromoléculas cargadas presentes en el medio de reacción. Sin embargo, las fuerzas intermoleculares de van der Waals y las interacciones hidrofóbicas en las proteínas dipolares juegan un papel importante en el complejo (Schmitt & Turgeon, 2011).

Los biopolímeros tienen la finalidad de proteger mediante la formación de la cubiera y liberar ingredientes bioactivos o funcionales tales como lípidos, péptidos, proteínas, enzimas, fibra dietaria, minerales, vitaminas, antioxidantes e incluso fármacos (Salminen & Weiss, 2014; Weiss *et al.*, 2006). Cabe mencionar que las interacciones entre biopolímeros con cargas opuestas resultan ser atractivas entre ellas en función del pH del medio y de los grupos funcionales involucrados. Además, estas interacciones pueden ser repulsivas si los grupos presentan signos iguales (Lee & Hong, 2009). Debido a esto, regularmente se utiliza una combinación proteína-polisacárido, que al mezclarse este último tiende a adsorberse en la proteína que sella en su interior el agente encapsulante. El polisacárido a concentraciones bajas, promueve la unión de dos moléculas de proteína para crear agregados, a esto se le llama coacervación compleja. Estos agregados son tensoactivos y tienden a interactuar y depositarse en superficies hidrofóbicas, tales como gotas de emulsión.

La coacervación compleja es uno de los métodos más eficaces, además es conocida por su simplicidad, bajo costo y reproducibilidad en la encapsulación de ingredientes alimentarios y utilizada en la industria farmacéutica (Timilsena *et al.*, 2019; Dobetti & Pantaleo, 2002). Respecto a esto, Mendanha *et al.* (2009) argumentan que la coacervación compleja ha permitido obtener valores de eficiencias de microencapsulación de alrededor del 91%.



**Figura 10.** Etapas principales en el proceso de coacervación compleja

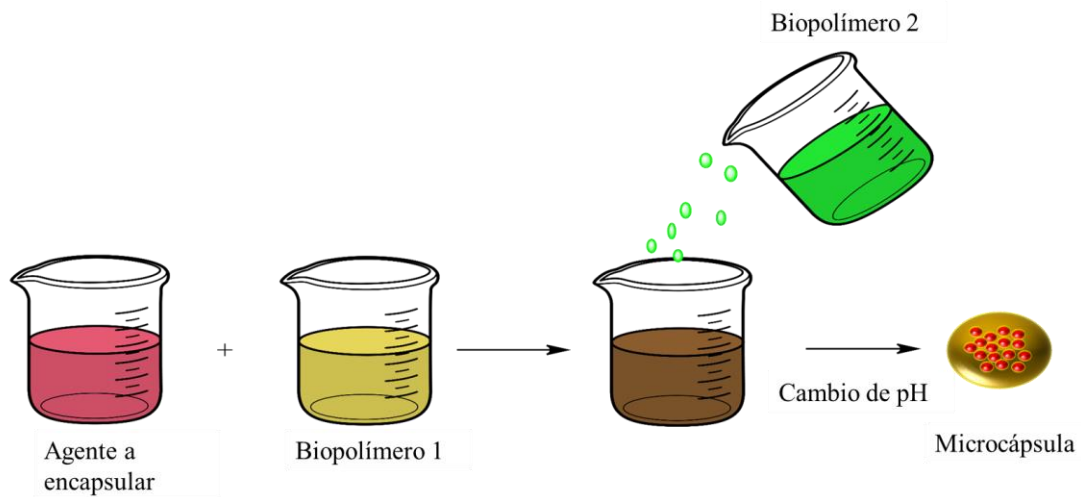
Fuente: (Zhou *et al.*, 2018)

La coacervación compleja depende, principalmente, de las características de los biopolímeros y del núcleo a recubrir. Este proceso puede ser inducido por la adición de un agente reticulante sobre el polímero formador de cubierta que contiene la muestra a encapsular, con la finalidad de endurecer las microcápsulas (Chiappetta, 2006).

Estudios han revelado que biopolímeros como la goma arábiga, alginato, carboximetilcelulosa entre otros, se han utilizado en la coacervación compleja para la formación de la cubierta o recubrimiento de microcápsulas (Bansode *et al.*, 2010).

### 2.15.5 Método de coacervación compleja

El proceso de coacervación compleja es un sistema que involucra un disolvente, el material activo y el material de recubrimiento. En general, este proceso implica cuatro pasos: (a) preparación de una disolución acuosa de dos o más biopolímeros. La disolución generalmente se prepara por encima del punto isoelectrico (pI) de la proteína; (b) mezclado de la fase hidrófoba con la disolución acuosa de un polímero, generalmente disolución de proteínas, y homogeneizando la mezcla resultante para que se produzca una emulsión estable; (c) cambio de pH y temperatura a un nivel requerido para inducir la coacervación y separación de fases; y (d) endurecimiento de las matrices de polímeros usando temperatura elevada, agente de desolvatación o reticulante (Timilsena *et al.*, 2019). La Figura 11 muestra una representación del proceso de coacervación compleja.



**Figura 11.** Fabricación de cápsulas por coacervación compleja

Esta técnica es superior a otros procesos de microencapsulación, por el manejo de temperaturas relativamente bajas, pérdidas reducidas por evaporación o degradación térmica, eficiencia de microencapsulación y compatibilidad con el control de liberación de los materiales bioactivos (de Souza Simões *et al.*, 2017; Taneja & Singh, 2012).

Zhou *et al.* (2018) encapsularon astaxantina esterificada por el método de coacervación compleja, utilizando proteína de suero lácteo y goma arábiga como biopolímeros catiónico y aniónico, respectivamente. Este método consistió en mezclar los ésteres de astaxantina con la proteína de suero lácteo, creando una emulsión y posteriormente adicionando la goma arábiga con agitación constante. Posteriormente, se ajustó el pH a 4.0 mediante la adición de una disolución de ácido clorhídrico, esto induce el proceso de coacervación, produciendo las microcápsulas que después se filtran y secan.

### **2.15.6 Biopolímeros empleados como recubrimientos de micro- y nanocápsulas**

Los biopolímeros son sin duda muy utilizados dentro de la industria alimentaria y farmacéutica, debido a que proporcionan propiedades funcionales tal como espesamiento, gelificación y formación de película. Este último ha sido muy utilizado para la protección de compuestos que son susceptibles a factores externos como ya se había mencionado anteriormente (Favaro-Trindade & Grosso, 2000); en la Tabla 5 se muestran algunos ejemplos de estos biopolímeros.



**Tabla 5.** Agentes encapsulantes

<b>Agentes encapsulantes solubles en agua</b>	<b>Agentes encapsulantes insolubles en agua</b>
Alginato	Etilcelulosa
Carragenina	Ácidos grasos
Caseinato	Resinas hidrocarbonadas
Quitosano	
Gelatina	
Goma xantana	
Goma arábica	

Fuente: (Favaro-Trindade & Grosso, 2000)

La elección correcta de un material de barrera está en función de la eficiencia que genere la encapsulación, así como la estabilidad que proporcione a la microcápsula. Un material de barrera ideal no debería reaccionar con el material del núcleo, debe tener la capacidad de sellar y mantener el núcleo dentro de las cápsulas y proporcionar la protección mayor del agente a encapsular (Anandharamakrishnan & Padma, 2015).

### **2.15.6.1 Polisacáridos**

El quitosano (QUI) es un biopolímero utilizado ampliamente en la generación de recubrimientos, debido a que tiene una actividad antimicrobiana alta, además, es biocompatible, biodegradable y no presenta toxicidad. Este polisacárido se ha utilizado en las industrias alimentarias y farmacéutica (Coates & Ayerza, 1996). Los recubrimientos de QUI son portadores excelentes de sustancias funcionales como los antioxidantes (Shabana *et al.*, 2008). Sin embargo, el QUI presenta solubilidad baja en agua y disolventes orgánicos, de esa manera se reduce su aprovechamiento. El proceso de protonación en un ambiente ácido mejora la solubilidad del QUI (Abdelkader *et al.*, 2018). La presencia de los grupos amino indican que el pH altera la carga y las propiedades del quitosano. A un pH bajo, los grupos amino se protonan y se cargan

positivamente y eso hace que el QUI sea un polielectrolito catiónico soluble en agua, formando sales de nitrógeno cuaternarias; mientras que a medida que el pH aumenta por encima de 6, los grupos amino del quitosano se desprotonan y el biopolímero pierde su carga y por lo tanto se vuelve insoluble (Pillai *et al.*, 2009).

Otro biopolímero muy utilizado es la goma arábiga (GA), conocido por su actividad como agente encapsulante muy eficaz, gracias a su funcionalidad coloidal actúa como protector del agente a encapsular; se ha visto también que produce emulsiones estables con la mayoría de los aceites (Glicksman, 1983). La GA está cargada negativamente por encima de su pI (2.2), la estabilidad de la emulsión formada es alta comparado con otros polisacáridos de masa molar similar (Zhou *et al.*, 2018). En un estudio realizado por Mosquera *et al.* (2012) evaluaron el estado de actividad de agua crítica y contenido de agua en polvos liofilizados de pulpa de fresa, preparados con maltodextrina y GA; los autores observaron un descenso de la higroscopicidad y determinaron que la GA es más eficaz que la maltodextrina en la preparación de los polvos.

Gonçalves *et al.* (2018) hicieron un estudio comparativo que implicó el uso de QUI y GA junto con gelatina (GE) como agentes encapsulantes de aceite esencial de tomillo, mediante el método de coacervación compleja. Estos autores señalan que la encapsulación fue más eficiente en el sistema que contenía GA/GE, mostrando un porcentaje de eficiencia de encapsulación de  $89.9 \pm 3.1$  (GA/GE), mientras que para QUI/GE fue de  $53.3 \pm 3.8$ .

### **2.15.6.2 Proteínas**

Las proteínas son moléculas anfifílicas con propiedades emulsificantes y de formación de biopelículas. Estas pueden adsorberse en la interfaz aceite en agua (O/W) y formar una película viscoelástica que proporciona estabilidad física durante la emulsión. Adicionalmente las proteínas

también exhiben propiedades antioxidantes por la quelación de metales y captación de radicales libres (Le Priol *et al.*, 2019).

Estas macromoléculas presentan una variedad de estructuras, tales como fibrosas y globulares. Además del costo, sus características fisicoquímicas deben considerarse al seleccionar proteínas para la tecnología de coacervación, particularmente sus características eléctricas, porque las interacciones electrostáticas atractivas son las principales fuerzas impulsoras de la coacervación compleja. Sus características eléctricas se pueden describir por su perfil de cambio de potencial en función del pH, donde la carga eléctrica en las proteínas cambia de positivo por debajo de su pI, a neutra en el pI y a negativo por encima del pI (Yan & Zhang, 2014).

Las semillas son la parte más estudiada de las plantas, dentro de estas se encuentran concentraciones importantes de proteínas (hasta 40% en peso seco). Algunas proteínas han sido utilizadas dentro de la industria alimentaria, debido a que pueden conferir propiedades como textura, retención de agua, emulsificación, viscosidad y gelación. Los estudios también sugieren que las proteínas vegetales procesadas adecuadamente, son comparativamente menos alergénicas en comparación con proteínas de origen animal como por ejemplo, proteínas de la leche y proteínas de huevo (Timilsena *et al.*, 2019).

*Cannabis sativa* L., es comúnmente conocido como cáñamo, es una planta cultivada con gran importancia industrial, debido a que se caracteriza por ser fuente de fibra. Su semilla ha sido consumida en los últimos años y normalmente contiene alrededor del 30% de aceite y un 25% de proteína (edestina y albúmina) (Tabla 6); estas son de fácil digestión para los humanos. Por lo tanto, estas proteínas tienen un gran potencial en ser aplicadas como una fuente importante para la nutrición (Callaway, 2004; Tang *et al.*, 2006). La harina de cáñamo se puede refinar mediante extracción alcalina seguida por precipitación de proteínas isoelectricas para obtener proteína

aislada que sirve como fuente de aminoácidos esenciales para la nutrición humana (Tang *et al.*, 2006). El pI de la proteína de cáñamo se encuentra entre 4.0 y 5.0, a medida que aumenta el pH en una disolución mejora la solubilización. Las fracciones de la proteína son 7S (vicilinas) y 11S (edestinas) las cuales son solubles en disoluciones salinas diluidas (Le Priol *et al.*, 2019; Malomo *et al.*, 2014).

El chícharo (*Pisum sativum* L.) es consumido ampliamente y por lo tanto tiene un gran impacto en el mercado; la semilla es rica en proteínas (18-30%), tiene concentraciones grandes de globulinas, además contiene niveles altos de lisina, de manera que ayuda en el equilibrio cuando se tiene deficiencias de este aminoácido (Adebiyi & Aluko, 2011). La proteína de chícharo en la industria alimentaria se ha utilizado para la formulación de productos alimenticios nuevos, es interesante por su característica no alergénica, con un valor nutritivo alto y propiedades funcionales buenas (Meng & Cloutier, 2014).

El pI de la proteína de chícharo es 4.5, a un pH mayor mejora la solubilidad. Dentro del porcentaje de proteínas también se encuentran las globulinas 7S (vicilinas) y 11S (leguminas) (Tabla 6) (Le Priol *et al.*, 2019; Sumner *et al.*, 1981).

Le Priol *et al.* (2019) realizaron un comparativo de cinco extractos de proteínas de plantas como agentes de barrera para encapsulación de aceite de girasol por el método de secado por aspersión, esto con la finalidad de mejorar la estabilidad oxidativa del aceite. Los extractos fueron proteína de soya, chícharo, cáñamo, girasol y arroz, de los cuales, el porcentaje de eficiencia de microencapsulación no indicó diferencias significativas para las proteínas de soya ( $91 \pm 1$ ), chícharo ( $88 \pm 2$ ) y cáñamo ( $89 \pm 3$ ); mientras que para los restantes fue inferior a estos. Sin embargo, cabe señalar que estas tres proteínas sí mostraron efectos significativos respecto a las otras dos estudiadas sobre la estabilidad del aceite encapsulado.

**Tabla 6.** Composición fraccional de proteínas extraídas de chícharo y cáñamo

Especies	2S albúminas	7S globulinas “vicilinas”	11S globulinas “leguminas”	Prolaminas	Glutelinas
Chícharo	+	++	++	-	+
Cáñamo	+	+	++ (edestina)	-	-

++ componentes principales, + componentes menores, - poco común o componentes ausentes.

Fuente: (Le Priol *et al.*, 2019)

### 2.15.6.2.1 Métodos para cuantificación y purificación de proteínas

La cuantificación de proteínas es un paso importante para el manejo de muestras para su aislamiento y caracterización. Existen métodos colorimétricos que permiten la detección y cuantificación de proteína total. Además se caracterizan por ser rápidos y sencillos, Tabla 7.

**Tabla 7.** Métodos colorimétricos para cuantificación de proteína total

Métodos	Características
Lowry	Este ensayo es similar al de Biuret. Adicionalmente se incorpora un reactivo de Lowry (fenol de Folin) para mejorar el desarrollo del color. La lectura de absorbanacia de este método se realiza a 750 nm.
Biuret	El enlace peptídico de los aminoácidos y dos iones de cobre pueden formar un complejo purpura en condición alcalina y la oscuridad del color es proporcional al contenido de proteína en la muestra. La lectura de absorbanacia de este método se realiza a 540 nm.

Fuente: (Krohn, 2002)

Adicionalmente, el método de Kjeldahl se ha utilizado para la determinación de nitrógeno total y posteriormente el calculo de proteína. Se realiza, principalmente, en alimentos, cereales, carnes, bebidas etc. Esta técnica implica tres pasos: digestión, donde el nitrógeno se convierte en  $\text{NH}_4^+$ ; destilación,  $\text{NH}_3$  es destilado y recuperado; valoración, se determina el nitrógeno (Pan, 2011).

Por otro lado, las técnicas de purificación de proteínas permiten mejorar las propiedades de la proteína para aplicaciones específicas. Para llevar a cabo una purificación de proteínas es importante considerar: tiempo, costos, reproducibilidad y rendimientos. Existen métodos de purificación que implica el uso de filtros y columnas de filtración en gel preparadas (Phillips, 2021). En la Tabla 8 se muestran algunas técnicas para aumentar la pureza de proteína.

**Tabla 8.** Métodos para mejorar la pureza de proteínas

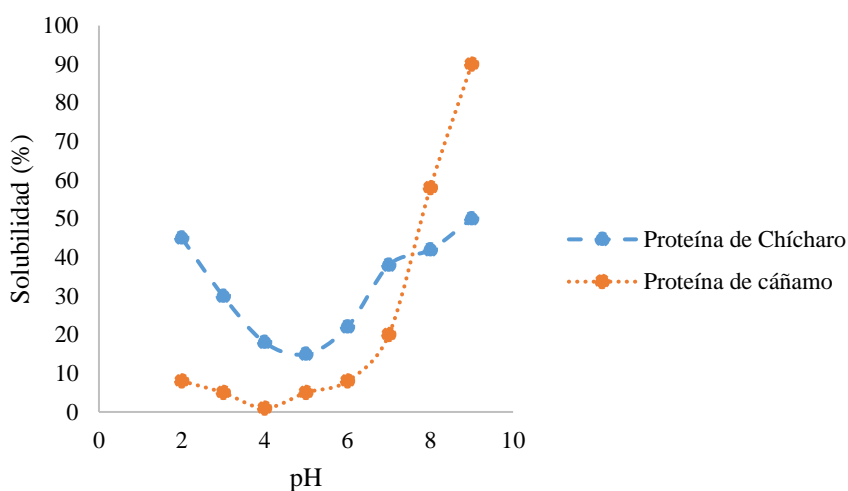
Métodos	Características
Intercambio iónico	Este tipo de purificación implica la separación de las proteínas basadas en su carga.
Intercambio catiónico y filtración en gel	El mecanismo es similar a la técnica de intercambio aniónico. En este caso atrae proteínas con carga positiva.
Cromatografía de afinidad y electroforesis SDS-PAGE (dodecilsulfato de sodio usado con electroforesis en gel de poliacrilamida)	Se une a las proteínas dándoles una gran carga neta negativa. Dado que las cargas de todas las proteínas son bastante iguales, este método las separa casi por completo en función del tamaño.
Precipitación isoelectrica	En el punto isoelectrico el efecto de las fuerzas electrostáticas entre las proteínas es casi nulo. En estas condiciones la solubilidad de la proteína es mínima, y en consecuencia las moléculas de proteína tienden a unirse y a precipitarse, separándose, principalmente, de carbohidratos.

Fuente: (Phillips, 2021)

### 2.15.6.2.2 Solubilidad de las proteínas

La solubilidad baja de las proteínas se observa en un intervalo de pH 4-5 debido al pI, Figura 12. Cuando se mueve de este punto, los grupos polares en las cadenas de las proteínas cambian y la solubilidad aumenta. Las diferencias entre la solubilidad de cada proteína puede explicarse de

acuerdo a su composición en las fracciones. Las semillas de plantas se dividen en 4 fracciones principales, diferenciadas por su solubilidad: albúminas, solubles en agua; globulinas, solubles en disoluciones salinas; prolaminas, solubles en disolventes hidroalcohólicos (60-70% v/v) y por último las glutelinas, solubles en disoluciones muy alcalinas ( $\text{pH} > 10$ ) (Le Priol *et al.*, 2019).



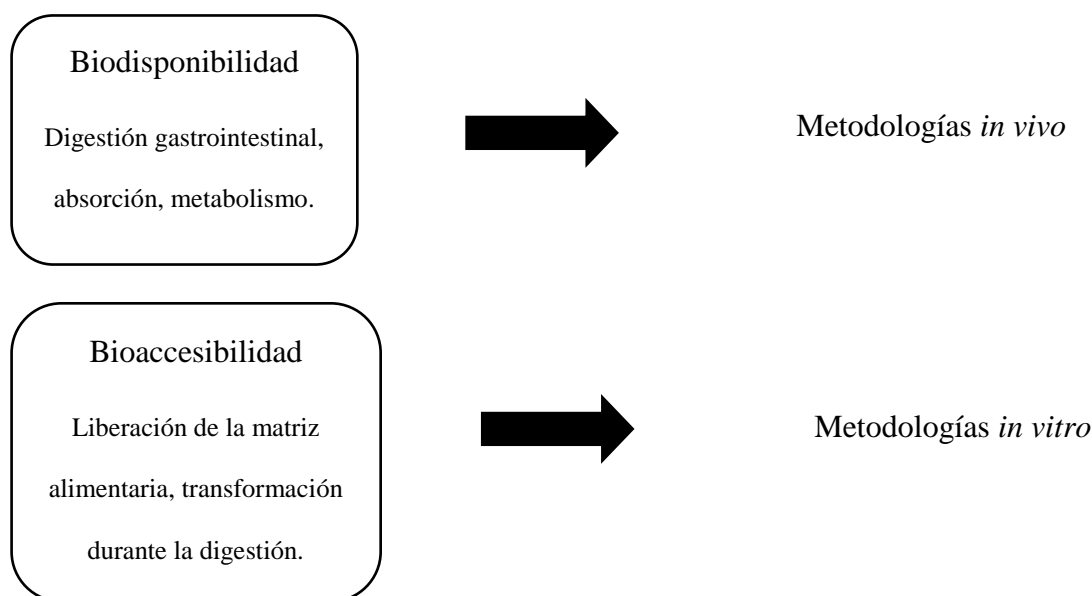
**Figura 12.** Perfiles de solubilidad de la proteína de chícharo y cáñamo en función del pH  
Fuente: (Le Priol *et al.*, 2019)

## 2.16 Importancia de la bioccesibilidad y biodisponibilidad

Actualmente, los consumidores son cada vez más conscientes de los beneficios que adquieren a través de los alimentos. Entre estos, los alimentos vegetales que incluyen frutas y verduras se ha demostrado que presenta múltiples beneficios para la salud humana, estrechamente relacionados con su contenido alto en vitaminas y otros compuestos bioactivos (vitamina C, carotenoides, compuestos fenólicos, vitamina E, glucosinolatos) con propiedades antioxidantes. Sin embargo, al estudiar el papel de los compuestos bioactivos en la salud humana, su biodisponibilidad no siempre es bien conocida. Antes de ser biodisponibles, deben liberarse de la matriz después de ser modificados en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, es importante analizar si el proceso de

digestión afecta los compuestos bioactivos y su estabilidad, ya que esto, a su vez, afectará su biodisponibilidad y sus posibles efectos beneficiosos (Carbonell-Capella *et al.*, 2014).

La comparación entre los procedimientos *in vivo* e *in vitro* utilizados para determinar la biodisponibilidad y bioaccesibilidad respectivamente, se lleva a cabo teniendo en cuenta las fortalezas y limitaciones de cada técnica experimental, Figura 13 (Carbonell-Capella *et al.*, 2014).



**Figura 13.** Metodologías de evaluación de biodisponibilidad y bioaccesibilidad

### **2.16.1 Bioaccesibilidad y digestión *in vitro***

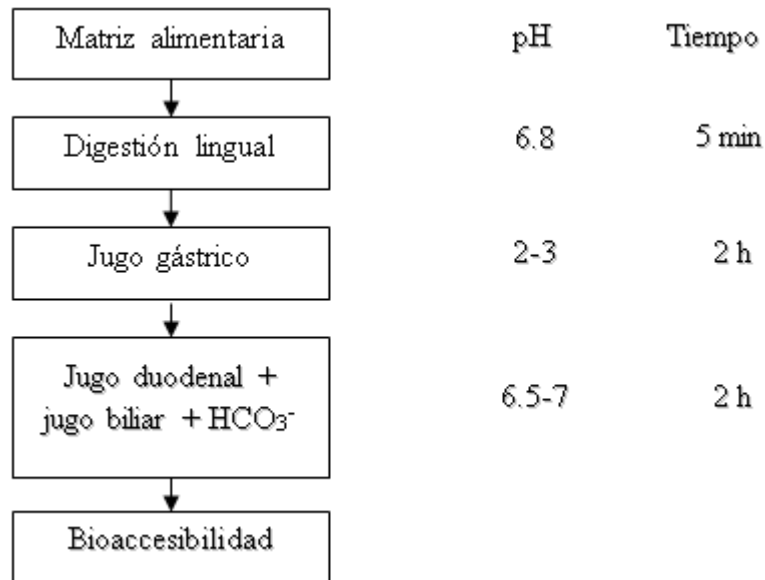
La bioaccesibilidad es la cantidad de un compuesto determinado que se libera de una matriz que está disponible para ser absorbida después de someterse al proceso de digestión. Por lo tanto, es necesario garantizar que los componentes de interés de una matriz alimentaria se liberen y estén disponibles para su absorción en el torrente sanguíneo. Esta actividad está asociada con la



digestión del tracto gastrointestinal, en el cual se liberan los componentes de la matriz principal, con la finalidad de una buena absorción en el intestino delgado (Gorusupudi & Bernstein, 2016).

La biodisponibilidad y la bioaccesibilidad a menudo son conceptos que se malinterpretan; aunque están relacionados, tienen diferentes definiciones. A diferencia de la bioaccesibilidad, la biodisponibilidad consiste en la cantidad de un compuesto que alcanza la circulación sistémica y ejerce su efecto después de ser metabolizado y distribuido por los tejidos. Por lo tanto, es necesario asegurar que los componentes de interés de una matriz alimentaria sean liberados y que estén disponibles para su absorción y de esa manera lograr acceder al torrente sanguíneo (Gonçalves *et al.*, 2019).

Existen principalmente tres métodos *in vitro* para medir la bioaccesibilidad, esos son 1) evaluación de solubilidad, 2) dialización o 3) un modelo gastrointestinal. Este último es el más empleado para evaluar la bioaccesibilidad. En cada uno de estos métodos, se realiza una digestión *in vitro* para simular el sistema digestivo humano a través de una digestión que se realiza en tres pasos e incluye una digestión lingual, digestión gástrica e intestinal. El primer paso consiste en una digestión con  $\alpha$ -amilasa, que rompe los enlaces glucosídicos de las moléculas de almidón, es decir, amilosa y amilopectina. Para la digestión gástrica, se agrega pepsina antes de la acidificación de las muestras a pH 2 (para simular el pH gástrico de un adulto) o pH 4 (para simular el pH gástrico de un bebé). La acidificación de las muestras a pH 2 o 4 es importante, porque la pepsina comienza a desnaturalizarse y, por lo tanto, perderá su actividad a  $\text{pH} \geq 5$ . Antes del inicio de la digestión intestinal, las muestras se llevan a un pH 5.5-6.0 antes de la adición de pancreatina (que consiste en un cóctel de enzimas pancreáticas como la  $\alpha$ -amilasa pancreática, lipasa, y las proteasas como la tripsina) y las sales biliares, y finalmente el pH se reajusta a 6.5-7 (Courraud *et al.*, 2013).

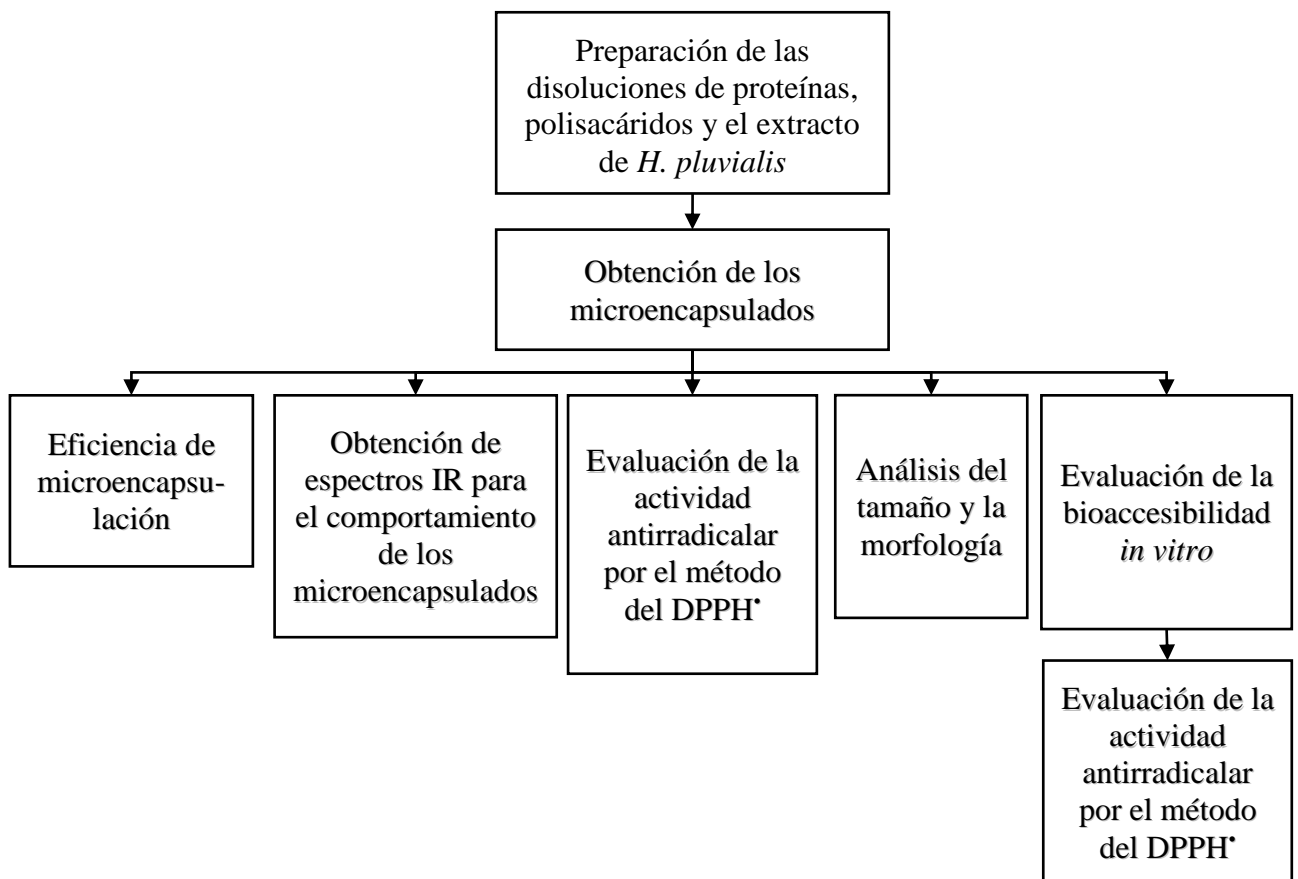


**Figura 14.** Representación esquemática de un modelo de digestión *in vitro*  
Fuente: (Courraud *et al.*, 2013)

Los modelos de digestión *in vitro* desarrollados son basados en la fisiología de un humano y se caracterizan por ser simples, económicos y reproducibles. Además tienen la función de investigar la modificación estructural, digestibilidad y liberación de componentes de los alimentos, bajo la simulación de las condiciones gastrointestinales (Oomen *et al.*, 2002).

## Capítulo 3. Metodología Experimental

En esta sección se describen los equipos, reactivos y disolventes utilizados durante el desarrollo experimental de este proyecto. Así mismo, se describen las técnicas empleadas para la obtención de los microencapsulados, determinación de la eficiencia de microencapsulación, adquisición de las micrografías, espectros FTIR, evaluación de la bioaccesibilidad y determinación de la actividad antirradicalar. En la Figura 15, se muestra el esquema de la metodología general llevada a cabo en el presente proyecto.



**Figura 15.** Esquema general de la metodología

El trabajo experimental se desarrolló en los laboratorios de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca. A continuación se enlistan los equipos, reactivos y disolventes utilizados en este proyecto.

### **3.1 Reactivos, disolventes y materiales**

Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH<sup>\*</sup>) (lote STBB0447A0); HCl (lote SZBF0880V con pureza de  $\geq 37\%$ ); D-(+)-glucosa (lote 127K0077 con pureza de 99.5%); D-(+)- ácido galacturónico monohidratado (lote BCBS0769V con pureza de 97%); Mucina de estómago porcino tipo II (lote SLCD8300), todos adquiridos de Sigma-Aldrich.

Fosfato de potasio dibásico anhidro (lote M0416167, con pureza de  $\geq 98\%$ ); cloroformo (lote UO615279, con pureza de  $\geq 99.8\%$ ), ambos marca Meyer.

Sulfato de sodio anhidro (lote T21C06, con pureza de  $\geq 99.8\%$ ); cloruro de magnesio hexahidratado (lote G02332, con pureza de 99.4%); cloruro de amonio granular (lote M-35068, con pureza de 99.5%); cloruro de calcio anhidro (lote H13633, con pureza de 99.7%); cloruro de potasio (con pureza de 99.6%); fosfato de sodio tetrahidratado (lote M-30924, con pureza de 100.2%); bicarbonato de sodio (lote 0000139638, con pureza de 100.2%), todos marca J.T. Baker.

Tartrato de Na y K (lote 1717-T2356, con pureza de 99-102%); tiocianato de potasio (lote 1721-T2362, con pureza de 103%); azida de sodio (lote 2120-A2075 con pureza de 99.7%); albúmina de huevo (lote 2321-A2056 con pureza de 99.8%), todos marca FAGA<sup>LAB</sup>.

Fosfato de potasio monobásico (Wako Pure Chemical industries, lote ECF1977, pureza de 99%); sulfato cúprico (Baker Analyzed, lote 314908, pureza de 99%); hidróxido de sodio (pureza de 98%); cloruro de sodio anhidro (Merck, lote K47006104602, pureza de  $\geq 99.5\%$ ); glucosamina (Encapsuladoras México, lote K1907014); urea (Wako Pure Chemical Industries, lote ECJ6450,

pureza de 99%); albúmina de huevo (Food Technologies Trading, lote VPT5125, pureza de 86%); ácido ascórbico (marca Reasol); etanol (Química Rique S.A de C.V., lote 122006-CQM, pureza de  $\geq 99.5\%$ ); hexano (Reasol, lote 211, pureza de  $\geq 98.5$ ); proteína de chícharo (lote 040119, pureza de 80%); proteína de cáñamo (Prescribed For Life, lote OHPI215AF, pureza de 50%); goma arábiga (Quial, pureza 100%); quitosano (Alzar Biotechnologies, lote 20190518); biomasa de *H. pluvialis* (Encapsuladoras México, lote ASTX18010012); aceite de oliva extravirgen (Carbonell, lote LO5269).

Enzimas digestivas (formulados): pancreatina (NaturesPlus, lote 1352390, cantidad por tableta amilasa 25,000 unidades USP, proteasa 25,000 unidades USP (tripsina y quimotripsina), lipasa 2,000 unidades USP; ácidos biliares (Jarrow Formulas, lote 2012003, cantidad por porción ácidos biliares conjugados: ácido glicólico, ácido taurocólico, ácido glicidesoxicólico, ácido taurodesoxicólico, ácido glicoquenodesoxicólico, ácido tauroquenodesoxicólico; pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich, lote SLCD7424, 3,200-4,500 unidades/mg de proteína);  $\alpha$ -amilasa tipo VI-B (Sigma-Aldrich, lote SLCG0041,  $\geq 5$  unidades/mg sólido).

### **3.2 Equipos**

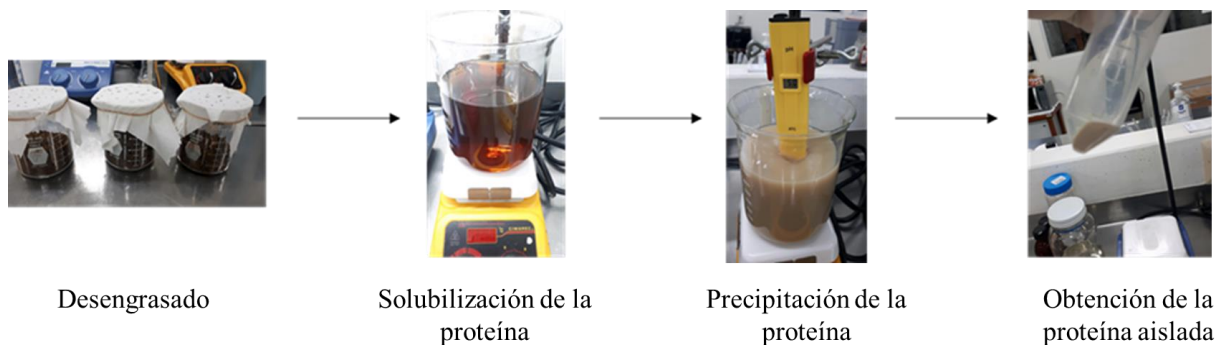
Espectrofotómetro de IR (marca Bruker, modelo Alpha platinum ATR); lector de microplacas (marca BioTek, modelo Sinergy HTX); espectrofotómetro (marca Hach, modelo DR 5000); balanza analítica (marca Sartorius, modelo BL 210 S); microscopio biológico petrográfico (marca Iroscope, modelo MX-T); centrífuga (marca Zenith, modelo 800D); parrilla de agitación (marca Thermolyne, modelo SP-131325); sonicador (marca Ultrasonic Cleaner, modelo SB-3200 DTN); rotavapor con bomba de vacío (marca IKA, modelo RU10; marca BUCHI, modelo R-3 HB; marca Heidolph, modelo Heizbad HB digit); mini-agitador (marca Norpro, modelo 2273); vórtex (marca IKA, modelo V3S001); estufa (marca TECSA, modelo TOHD433); potenciómetro

digital (marca LF, modelo 009(I)A); potenciómetro de mesa (marca OHAUS, modelo STARTER 3100).

Materiales en general: barras de agitación magnética, microplacas de polipropileno de 96 pozos de fondo plano con evaporación lenta, cubetas de cuarzo de 1 cm, micropipetas de volumen ajustable, puntas para micropipetas (100 y 1000  $\mu$ L), material de vidrio.

### **3.3 Preparación de proteína aislada de cáñamo**

La primera etapa para obtener proteína aislada de harina de semilla de cáñamo comercial al 50% consiste en un desengrasado. Para llevar a cabo esta etapa, se pesaron 50 g de harina y se realizaron tres extracciones con 250 mL de hexano destilado en baño ultrasónico durante 30 min en cada extracción. Posteriormente, se separaron las fases y la harina se secó a temperatura ambiente ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Después, la harina desengrasada se llevó a una etapa de precipitación isoeléctrica de proteínas. Esta etapa inició con la combinación de la harina previamente desengrasada con 1 L de agua desionizada, formándose una suspensión. Esta, se ajustó a pH 10.0 con NaOH 2 N para solubilizar la proteína mediante agitación a  $35^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Posteriormente, esta muestra se centrifugó a 1,790 g durante 30 min. El precipitado, constituido principalmente de polisacáridos, se descartó y el sobrenadante se ajustó a un pH de 5.0 con HCl 2 N. La reducción del pH a 5.0 de la disolución indujo la precipitación de la proteína; la cual se recuperó por centrifugación (1,790 g por 10 min). Para evaluar la composición de los sólidos ricos en proteínas se adquirió un espectro FTIR (Tang *et al.*, 2006). El sólido se combinó con 300 mL de buffer de fosfatos, pH 7.3, y se dejó en agitación por 24 h para mejorar la solubilización de la proteína. La concentración del aislado proteico de cáñamo fue determinada a partir de UV/vis y espectros de FTIR para la construcción de curvas de calibración.



**Figura 16.** Obtención de la proteína aislada de cáñamo

### 3.3.1 Determinación de la pureza de la proteína aislada de harina de cáñamo

La pureza de la muestra de proteína aislada de harina de cáñamo se determinó empleando dos métodos. El primero fue el método de Biuret, basado en la medición espectrofotométrica de un complejo formado por la reacción del reactivo de Biuret con la proteína (Krohn, 2002). El segundo método implicó el uso de IR con estándares, muestras y control positivo preparados en fase sólida. Las diluciones se llevaron a cabo con goma arábiga. Los estándares se prepararon con caseína y el control fue la proteína de chícharo con pureza del 80%. Las mediciones se llevaron a cabo por espectrofotometría de IR por reflectancia total atenuada. La determinación de las concentraciones de proteínas se llevó a cabo a partir de cocientes de absorbancia del polisacárido/proteína (absorbancia a  $1,020\text{ cm}^{-1}$ /absorbancia a  $1,611\text{ cm}^{-1}$ ). Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

#### *Preparación de los estándares*

***Preparación de estándares de albúmina de huevo al 99.8%.*** Se pesaron 0.5 g de albúmina y se le adicionaron 20 mL de NaOH 6 N. Posteriormente, se dejó en agitación constante a temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ) durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo se logró observar la completa

solubilización de la albúmina. A partir de esta disolución se prepararon cinco estándares a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/mL.

***Preparación de disolución de albúmina de huevo al 86% utilizado como control positivo.*** Se pesaron 15 mg de albúmina en un tubo para microcentrífuga y se solubilizó con 1 mL de NaOH 6 N en vórtex por 1.5 h.

***Preparación de la disolución de la proteína aislada de cáñamo.*** Se pesaron 15 mg del polvo en un tubo para microcentrífuga y se solubilizaron en 1 mL de NaOH 6 N con agitación en vórtex durante 1.5 h.

***Determinación de la pureza de la proteína aislada de cáñamo por el método de Biuret (Krohn, 2002).*** La reacción de las disoluciones, antes mencionadas, con el reactivo de Biuret se llevó a cabo en una microplaca de 96 pozos con capacidad de 320-360  $\mu$ L cada pozo. En la microplaca se adicionaron 30  $\mu$ L de cada uno de los estándares de albúmina de huevo al 99.8% por triplicado y 120  $\mu$ L del reactivo de Biuret. El blanco del estándar se preparó con 30  $\mu$ L de un estándar y 120  $\mu$ L de tartrato de sodio alcalino con la finalidad de minimizar la posible interferencia de la matriz de la muestra. Asimismo, se colocaron 30  $\mu$ L de la disolución del aislado de cáñamo por triplicado y se combinó con 120  $\mu$ L del reactivo de Biuret. El blanco de la muestra fue preparado con tartrato de sodio alcalino. Después, la microplaca se colocó dentro del lector y se dejó reposar durante 1 min, transcurrido este tiempo se hizo una agitación orbital rápida durante 5 min. Por último se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Las concentraciones de proteína se expresaron en mg/mL y con base en estos resultados se calculó la pureza del aislado de proteína de cáñamo. Estas determinaciones se realizaron por triplicado.



***Determinación de la pureza de la proteína aislada de cáñamo por cocientes de absorbancia.*** Se prepararon seis estándares de 38.25, 46.75, 55.25, 63.75, 72.25 y 85% de caseína al combinar caseína al 85% en diferentes proporciones con goma arábiga. La muestra de proteína de chícharo al 80% comercial se utilizó como control. Todas las mezclas se homogenizaron en un vórtex durante 1 min. Posteriormente, se obtuvieron sus espectros en un espectrofotómetro de FTIR-ATR. Los espectros fueron adquiridos con 64 barridos con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup> en una ventana espectral de 4,000-400 cm<sup>-1</sup> utilizando el programa OPUS versión 7.2. A través de la intensidad de dos bandas características de la proteína (1,611 cm<sup>-1</sup>) y del polisacárido (1,020 cm<sup>-1</sup>) se calcularon los cocientes de absorbancia para la construcción del modelo de calibración de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$\text{Cocientes de absorbancias} = \frac{\text{Absorbancia de la banda del polisacárido}}{\text{Absorbancia de la banda de la proteína}}$$

Este cociente se correlacionó con las concentraciones correspondientes de los estándares, a partir de un modelo de regresión exponencial de orden dos. A partir de esta regresión se obtuvo la ecuación de calibración que permitió cuantificar la proteína en la muestra y el control. Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

### **3.4 Preparación de las disoluciones de proteínas, polisacáridos y aceite rico en astaxantina**

***Preparación de las disoluciones de biopolímeros.*** Estas disoluciones se prepararon en una disolución amortiguadora de fosfatos 0.2 N pH 7.3 para estabilizar el pH durante la solubilización de los biopolímeros.

***Obtención de las disoluciones de proteínas.*** La disolución de la proteína de chícharo al 4.0% (p/v) se preparó por dispersión del polvo en una disolución amortiguadora de fosfatos 0.2 N (pH

7.3) con una posterior agitación constante durante 24 h. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 1,790 g por 30 min para obtener la proteína solubilizada. Para el caso de la proteína de cáñamo se utilizó la disolución que se preparó en la sección 3.3.

**Obtención de las disoluciones de polisacáridos.** La disolución de quitosano al 2.0% (p/v) se preparó dispersando el polvo comercial en medio ácido a un pH de 3.0 y agitando la mezcla durante 24 h para promover su solubilización. Transcurrido este tiempo, la recuperación del sobrenadante se realizó después de centrifugar la mezcla a 1,790 g por 30 min. La disolución de goma arábiga, se llevó a cabo dispersando 2.0% (p/v) del polvo en una disolución de fosfatos 0.2 N (pH 7.3) con agitación constante por 24 h y la disolución se recuperó por centrifugación.

**Obtención del extracto de *H. pluvialis* en aceite de oliva extravirgen.** Esta disolución se preparó a partir de una suspensión al 5% (p/p) de la biomasa de *H. pluvialis* en aceite y se sometió a una extracción asistida por ultrasonido durante 30 min a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ . Posteriormente, la mezcla se sometió a una centrifugación a 1,790 g y el aceite rico en astaxantina se decantó, Apéndice 1 (Zhou *et al.*, 2018). A las disoluciones de los biopolímeros se les adicionó azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) para tener una concentración del 0.01%. Este compuesto tiene la función de conservar las disoluciones al evitar la presencia de microorganismos (Aghbashlo *et al.*, 2013).

### **3.5 Obtención de los microencapsulados**

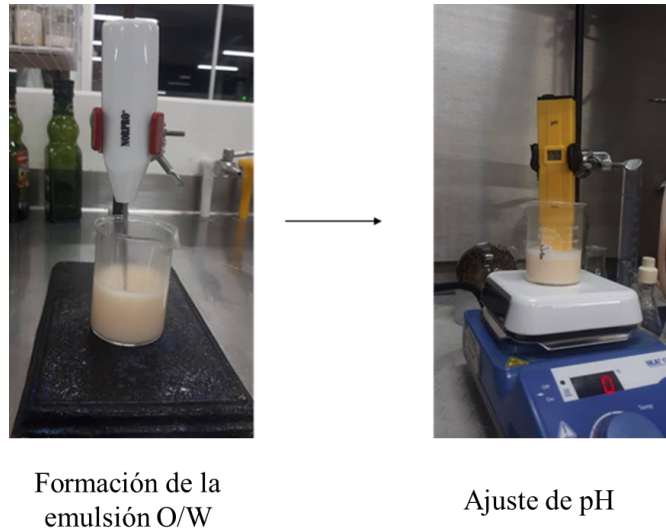
La obtención de las microcápsulas se llevó a cabo en tres etapas, la primera consistió en una emulsión del extracto de astaxantina en la disolución de proteína, después una segunda etapa que involucró la formación de la cubierta de las microcápsulas en presencia del polisacárido correspondiente y finalmente una tercera etapa que implicó el endurecimiento de la cubierta de la microcápsula y su separación de la disolución, Apéndice 2. A continuación se describen brevemente cada una de estas etapas.

***Etapa 1. Formación de la emulsión de la proteína con el aceite rico en astaxantina.*** Esta etapa consistió en la formación de una emulsión aceite en agua (O/W). En un vaso de precipitado se colocaron 25 mL de la disolución de proteína (chícharo o cáñamo) a una velocidad de agitación de 14,000 rpm. Posteriormente, se adicionaron 1.5 mL del aceite rico en astaxantina y se dispersaron para la formación de la emulsión. Esta se mantuvo en agitación constante por 1.5 h.

***Etapa 2. Formación de la cubierta de las microcápsulas.*** Para promover la formación de la cubierta, a la emulsión se le adicionaron 12.5 mL del polisacárido (goma arábiga o quitosano) conservando la misma velocidad de agitación y durante un periodo de tiempo igual al de la Etapa 1.

***Etapa 3. Endurecimiento de la cubierta de la microcápsula.*** Esta etapa se promueve a partir de una coacervación compleja. Este proceso se llevó a cabo por un ajuste del pH del medio a 4.0 con la adición de HCl 1 N gota a gota para los tratamientos que involucraron a la goma arábiga. Mientras que los tratamientos con quitosano el pH se ajustó a 6.0 con NaOH 2 N. El seguimiento del pH se realizó con un potenciómetro. La mezcla se agitó con una barra magnética en parrilla por 30 min para homogenizar y promover eficiente la separación de fases, Figura 17.

En la Tabla 9 se muestran las condiciones utilizadas para la formación de los microencapsulados. Las suspensiones de microcápsulas se almacenaron en refrigeración a 4°C por 24 h hasta su uso posterior (Zhou *et al.*, 2018).



Formación de la emulsión O/W

Ajuste de pH

**Figura 17.** Obtención de microcápsulas suspendidas en medio acuoso.

**Tabla 9.** Condiciones para la formación de los microencapsulados

Tratamientos	Relación de biopolímeros	pH de ajuste	Velocidad de agitación
AA-GA-CHI	1:2	4.0	14,000 rpm
AA-GA-CAÑ	1:2	4.0	
AA-QUI-CHI	1:2	6.0	
AA-QUI-CAÑ	1:2	6.0	

Abreviaciones: AA: aceite-astaxantina; GA: goma arábica; CHI: chícharo; QUI: quitosano; CAÑ: cáñamo

### 3.6 Cuantificación de astaxantina

La concentración de astaxantina en la biomasa de *H. pluvialis*, encapsulada y sin encapsular, se determinó por un método espectrofotométrico de UV/vis utilizando la absorbancia a una longitud de onda a 485 nm y una absortividad molar de 2,100 ( $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) m/v (Li *et al.*, 2012). Estas determinaciones también permitieron calcular la eficiencia de microencapsulación de astaxantina.

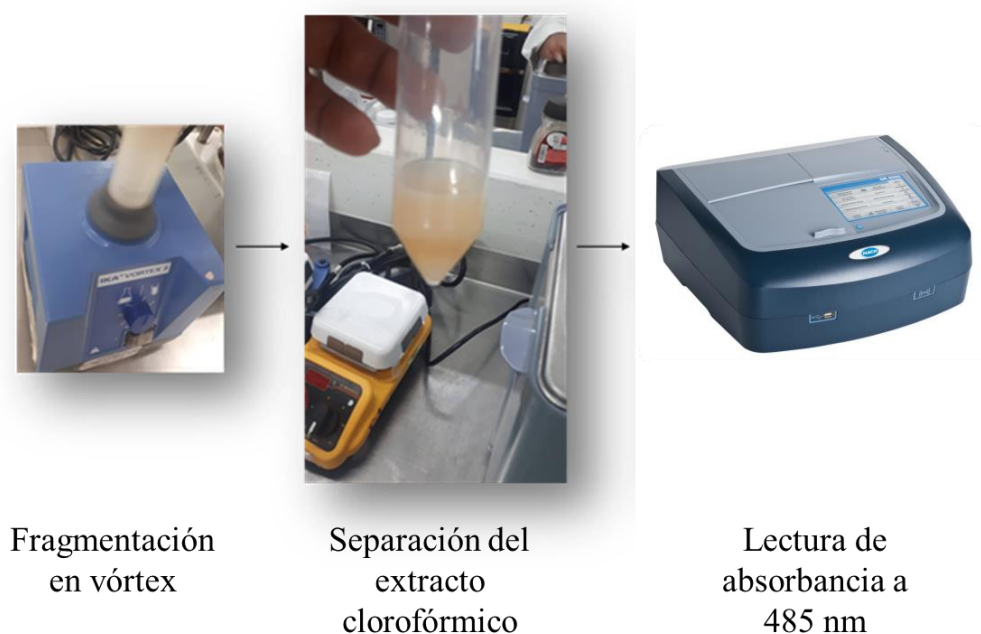
**Determinación de la concentración de astaxantina en la biomasa de *H. pluvialis*.** Se tomaron aproximadamente 10 mg del polvo en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL, a ese tubo se le adicionó 1 mL de cloroformo con BHT al 1%. Esta mezcla se llevó a una extracción asistida por

ultrasonido a una potencia máxima de 50 watts durante 15 min a temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ). El sobrenadante se transfirió a un vial y los sólidos sedimentados se trataron tres veces por este procedimiento. En la última extracción, el sobrenadante se tornó incoloro indicando la recuperación total de la astaxantina en la disolución. Los sobrenadantes de cada tratamiento se combinaron en un mismo vial. Posteriormente, se colocaron aproximadamente 3.5 mL de la disolución en una cubeta de cuarzo con un camino de haz de 1 cm y se midió la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro de UV/vis marca Hach a una longitud de onda de 485 nm. Para la cuantificación de astaxantina se empleó la Ley de Lambert-Beer y una absorptividad molar de  $2100 (\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%}) \text{ m/v}$ .

***Cuantificación de astaxantina sin encapsular.*** La concentración de astaxantina no encapsulada se llevó a cabo adicionando en un tubo Falcon 4 mL de microcápsulas combinados con 6 mL de cloroformo con BHT al 1%. Posteriormente, se llevó a una agitación manual suave y enseguida con la ayuda de una pipeta pasteur se realizó la separación de la fase clorofórmica. Esta disolución se llevó a la toma de lectura de absorbancia de acuerdo a lo descrito en la sección anterior usando el coeficiente de absorptividad molar.

***Cuantificación de astaxantina encapsulada.*** Las microcápsulas se sometieron a un proceso de ruptura para la liberación de la astaxantina, Figura 18. Para esto, los tratamientos con GA y QUI se sometieron a pequeños cambios en la etapa de mezclado. Para los tratamientos con GA, se tomaron 4 mL de las microcápsulas y se combinaron con 6 mL de cloroformo en un tubo Falcon. Posteriormente, se llevaron a una agitación en vórtex por 2 min y después a una extracción asistida por ultrasonido durante 2 min para mejorar la ruptura de las microcápsulas. La separación de la fase clorofórmica se realizó con la ayuda de una pipeta pasteur. Esta disolución se llevó a la lectura de absorbancia. Mientras que para los tratamientos con QUI, se utilizó 1 mL de las

microcápsulas y se combinaron con 6 mL de cloroformo en tubo Falcon. Posteriormente, se realizó una agitación en vórtex y ultrasonido, cada una de estas operaciones durante 2 min. Este proceso, se realizó en otras cuatro ocasiones, para asegurar la separación de la astaxantina total presente en las muestras de microencapsulados. El procedimiento minimizó la formación de una emulsión y facilitó la separación de la fase clorofórmica. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 485 nm.



**Figura 18.** Procedimiento para la ruptura de los microencapsulados

### **3.7 Determinación de la eficiencia de microencapsulación (EMA)**

A partir de la cuantificación de la astaxantina total en las microcápsulas (ATM) y la astaxantina sin encapsular (ASE) se procedió a calcular la eficiencia de microencapsulación (EMA) a partir de la ecuación siguiente (Zhou *et al.*, 2018).

$$EMA = 100 * \left( \frac{ATM - ASE}{ATM} \right)$$

### **3.8 Determinación de humedad de los microencapsulados**

La determinación de humedad se realizó por el método de la AOAC 934.06. Para esto, se pesaron 5 g de microcápsulas y se colocaron en crisoles previamente llevados a peso constante. Posteriormente, se llevaron a secar en estufa a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$ , realizando la medición del peso cada 6 h hasta lograr obtener un peso constante. Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

El contenido de humedad de la muestra se expresó en términos de porcentaje de acuerdo a la ecuación siguiente.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{P_1 - P_2}{P_0} \times 100$$

Donde:

$P_0$  = Peso de la muestra

$P_1$  = Peso del crisol más muestra húmeda

$P_2$  = Peso del crisol más muestra seca

### **3.9 Análisis de la morfología y tamaño de las microcápsulas por microscopía óptica petrográfica**

La morfología de las microcápsulas se evaluaron mediante microscopía óptica petrográfica. Las muestras húmedas se colocaron en un portaobjetos y se llevaron a observar en un microscopio biológico petrográfico (IROSCOPE, Mod PT-3LIT) con un objetivo 20x, previamente calibrado,

utilizando una cámara LABOMED y el programa Digipro versión 4.0 para la adquisición de las micrografías y determinación del tamaño de las microcápsulas.

### **3.10 Adquisición de espectros de IR**

Se adquirieron espectros de los materiales de pared (proteínas y polisacáridos) y de las microcápsulas con las condiciones descritas en la sección 3.3.1.

### **3.11 Evaluación de la actividad antirradicalar de los extractos de los microencapsulados frente al radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)**

*Preparación de las disoluciones.* Estas disoluciones se prepararon en etanol recién destilado y desgasificado.

*Disolución patrón de DPPH<sup>•</sup> al 0.004% (p/v).* En un matraz volumétrico de 10 mL se pesaron 10 mg de DPPH<sup>•</sup> y se aforó con etanol destilado desgasificado. A partir de esta disolución se preparó el DPPH<sup>•</sup> al 0.004%. Para esto, se tomaron 400 µL de esta disolución y se aforó con 10 mL de etanol destilado desgasificado. Las disoluciones se mantuvieron resguardadas de la luz y en refrigeración a 4°C durante un período no mayor a una semana.

*Preparación de estándares de ácido ascórbico.* Se pesaron 10 mg de ácido ascórbico y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y éste se aforó con etanol acuoso al 90% (v/v). A partir de esta, se preparó una disolución patrón de 200 µg/mL la cual permitió la preparación de los estándares de: 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL .

*Preparación de estándares de ácido gálico.* Primero, se preparó una disolución de 1000 µg/mL a partir de 10 mg de ácido gálico disueltos con etanol acuoso al 90% (v/v) en un matraz volumétrico de 10 mL hasta alcanzar la línea aforé. Después, a partir de esta, se preparó una



disolución patrón de 200 µg/mL y posteriormente una disolución de 20 µg/mL. Esta última disolución permitió la preparación de los estándares de ácido gálico de 1, 2, 3, 4 y 5 µg/mL.

***Obtención de los extractos etanólicos de los microencapsulados.*** En un matraz bola de 100 mL previamente pesado se colocaron 5 mL de microcápsulas. Posteriormente, se llevaron a sequedad en rotavapor para remover el agua y promover la ruptura de los microencapsulados. Para los microencapsulados con GA, el extracto seco se pesó y se llevó a una extracción en un baño ultrasónico con 10 mL de etanol previamente destilado por 40 min. Mientras que para los microencapsulados con QUI, la extracción se llevó a cabo con 5 mL de etanol destilado. Esto tuvo la finalidad de incrementar la concentración de los extractos y de esa manera alcanzar el valor del IC<sub>50</sub>. Los extractos etanólicos se recuperaron por centrifugación a 1,790 g por 10 min. Estas disoluciones se utilizaron para la etapa de reacción frente al radical DPPH<sup>•</sup>.

***Evaluación de la actividad antirradicalar frente al DPPH<sup>•</sup>*** (Julián-Loeza *et al.*, 2011). 100 µL de extractos etanólicos de los microencapsulados preparados a diferentes concentraciones se mezclaron con 100 µL de la disolución etanólica de DPPH<sup>•</sup> (0.004% p/v) en una microplaca de evaporación lenta a temperatura ambiente (25 ± 3°C) y en ausencia de luz. Después, la microplaca se colocó dentro del lector, se agitó durante 1 min y se dejó en reposo por 30 min para llevar a cabo la reacción. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 580 nm (Anarjan *et al.*, 2012). El control negativo fue la mezcla de 100 µL del DPPH<sup>•</sup> al 0.004% y 100 µL de etanol. La capacidad antirradicalar se expresó como porcentaje de inhibición  $[(A_{DPPH} - A_{extract})/A_{DPPH}] * 100$ . El gráfico del % de inhibición vs concentración permitió conocer el valor del IC<sub>50</sub> y a partir de la ecuación de calibración, se calculó la concentración de extracto necesaria para inhibir en un 50% al radical DPPH<sup>•</sup>. El valor de IC<sub>50</sub>, se reportó en mg de muestra seca/mL de disolución. Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

**Cinética de eficiencia antirradicalar.** Para la obtención de las cinéticas se utilizaron los extractos a la concentración del IC<sub>50</sub> y a dos concentraciones adicionales en torno a ese valor. Se realizaron lecturas de absorbancias en intervalos de 2 min durante 2 h. El DPPH\* remanente se calculó a partir de los valores de absorbancia. Estos porcentajes se utilizaron para construir una curva % DPPH\* remanente *versus* tiempo. A partir de las curvas se identificó el T<sub>EC50</sub> (tiempo donde inició el estado estable). A partir de los valores de IC<sub>50</sub> y T<sub>EC50</sub> se calcularon las eficiencias antirradicalar (AE), que fueron expresadas como µg DPPH\*/(mg muestra seca\*min). Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\% \text{ DPPH}^* \text{ remanente} = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \times 100$$

$$AE = \frac{1}{IC_{50} \times T_{EC50}}$$

### 3.12 Simulación *in vitro* del proceso de digestión humana

La simulación de la digestión *in vitro* de las microcápsulas se llevó a cabo en un proceso de tres etapas. La primera consistió en simular la digestión con fluido salival (FSS), la segunda con fluido gástrico (FGS) y la última con una mezcla de fluidos duodenal (LDS) y biliar (LBS) para simular la digestión a nivel intestinal. Las condiciones empleadas, tales como el pH, temperatura y tiempo de digestión se ajustan a las condiciones promedio de una digestión para un humano adulto (Courraud *et al.*, 2013). Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

**Preparación de las disoluciones digestoras.** Las disoluciones se prepararon con agua tipo 1 y se almacenaron en refrigeración por no más de una semana previo a su uso en los experimentos de digestión. En la Tabla 10 se muestra la composición de las cuatro disoluciones digestoras

utilizadas en el presente estudio (Versantvoort *et al.*, 2005). Las disoluciones se calentaron a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , previo al proceso de digestión.

***Proceso de digestión in vitro.*** En un matraz bola de 100 mL se colocaron 10 mL de microcápsulas. Posteriormente, se adicionaron 6 mL de FSS ajustando el pH  $6.7 \pm 0.2$ . La mezcla se mantuvo a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  en un baño maria durante 5 min a 2,000 rpm. Después, se adicionaron 12 mL de FGS (pH  $1.6 \pm 0.2$ ) conservando la misma temperatura durante 2 h en agitación constante. Finalmente, se incorporó 12 mL de LDS, 6 mL de LBS y 2 mL de la disolución de bicarbonato de sodio 1 N ajustando el pH a  $8.1 \pm 0.2$  y agitando durante 2 h. El volumen final se dividió en dos partes para la cuantificación de astaxantina por UV/vis y actividad antirradicalar. En todo el proceso digestivo, se monitoreó el pH, conservando el valor fisiológico. El volumen para la cuantificación de la astaxantina se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 3.6.

El volumen restante del digerido se utilizó para evaluar la actividad antirradicalar frente al DPPH<sup>•</sup>, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 3.11.

**Tabla 10.** Constituyentes y concentraciones de los fluidos sintéticos que se emplearon en la simulación de la digestión de las microcápsulas

	FSS	FGS	LDS	LBS
Disolución inorgánica	4 mL de KCl (89.6 g/L)	6.28 mL de NaCl (175.3 g/L)	16 mL de NaCl (175.3 g/L)	12 mL de NaCl (175.3 g/L)
	4 ml de KSCN (20 g/L)	1.2 mL de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (88.8 g/L)	16 mL de NaHCO <sub>3</sub> (84.7 g/L)	27.32 mL de NaHCO <sub>3</sub> (84.7 g/L)
	4 mL de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (88.8 g/L)	3.68 mL de KCl (89.6 g/L)	4 mL de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (8 g/L)	1.68 mL de KCl (89.6 g/L)
	4 mL de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (57 g/L)	7.2 mL de CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O (22.2 g/L)	2.52 mL de KCl (89.6 g/L)	60 µL de HCl (37% p/p)
	0.68 mL de NaCl (175.3 g/L)	4 mL de NH <sub>4</sub> Cl (30.6 g/L)	4 mL de MgCl <sub>2</sub> (5 g/L)	
	8 mL de NaHCO <sub>3</sub> (84.7 g/L)	2.6 mL de HCl (37% p/p)	72 µL de HCl (37% p/p)	
Disolución orgánica	3.2 mL de urea (25 g/L)	1.36 mL de urea (25 g/L)	1.6 mL de urea (25 g/L)	1.6 mL de urea (25 g/L)
		4 mL de glucosa (65 g/L)		
		4 mL de ácido galacturónico (2 g/L)		
		4 mL de clorhidrato de glucosamina (33 g/L)		
Añadir a la mezcla de las disoluciones orgánica + inorgánica	116 mg de α-amilasa	0.4 g Albúmina de huevo 25 mg de pepsina	0.4 g Albúmina de huevo 3.6 mL de CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O (22.2 g/L)	0.72 g Albúmina de huevo 4 mL de CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O (22.2 g/L)
	10 mg de mucina	1.2 g de mucina	4 g de pancreatina	12 g de bilis
pH	7.18	1.23	8.23	8.4

Fuente: De acuerdo a Versantvoort *et al.*, 2005, con algunas modificaciones.

Las disoluciones inorgánicas y orgánicas se llevan a un volumen de 200 mL con agua desionizada. Después de mezclar las disoluciones inorgánicas y orgánicas, se agregan los componentes adicionales y se disuelven. Si es necesario, el pH de los jugos se ajusta al intervalo apropiado de cada fluido. FSS = Fluido salival simulado, FGS = Fluido gástrico simulado, LDS = Líquido duodenal simulado, LBS = Líquido biliar simulado.

### **3.13 Análisis estadístico**

Se realizó un ANOVA utilizando el software Minitab versión 17. A partir de las tres réplicas de de las diferentes pruebas se obtuvieron los promedios con su desviación estándar. Además, se analizaron mediante un comparativo de medias con un  $p < 0.05$ , utilizando la prueba de Tukey. La finalidad de este análisis consistió en determinar la posible diferencia significativa entre los valores obtenidos para cada tratamiento. Los gráficos de frecuencias y pruebas de normalidad se obtuvieron por el ambiente de desarrollo Rstudio versión 4.1.1.

## Capítulo 4. Resultados y discusiones

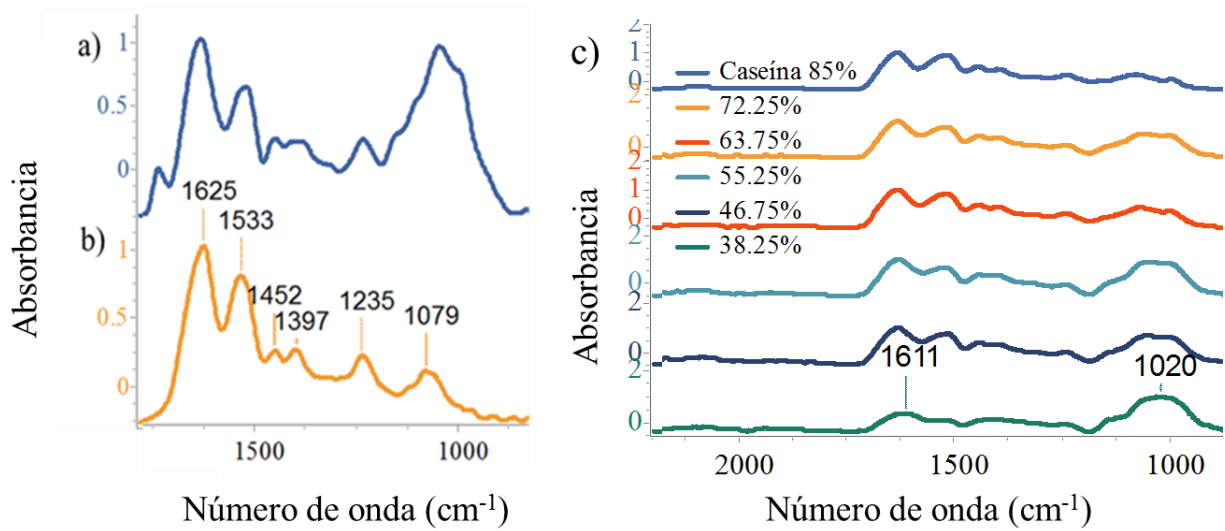
En la presente sección se muestran los resultados y discusiones de la obtención de proteína aislada de cáñamo, los microencapsulados de los cuatro tratamientos, adquisición de espectros de FTIR, actividad antirradicalar y determinación de la bioaccesibilidad de los microencapsulados. También se presentan los resultados de los estudios de la morfología y tamaño de las microcápsulas obtenidos a partir de microscopía petrográfica.

### 4.1 Purificación de la proteína de cáñamo

En el Apéndice 3 se muestran las curvas de calibración que permitieron determinar la pureza del aislado proteico de cáñamo seco, empleando el método de Biuret y un método de FTIR medio. Las dos técnicas para la determinación de la pureza del aislado proteico de cáñamo generaron resultados estadísticamente iguales empleando la prueba de Tukey para el comparativo de pares de medias ( $\alpha = 0.05$ ). Utilizando la ecuación de calibración obtenida a partir de las absorbancias ajustadas de los estándares de albúmina de huevo al 99.8%, se obtuvo la concentración de proteína en mg/mL del control y del aislado de cáñamo. Con base en la concentración se determinó que el aislado de la proteína de cáñamo tenía una pureza del  $93.3 \pm 2.4\%$ . Por otro lado, la ecuación de calibración obtenida a partir de los cocientes de absorbancia de los estándares caseína-goma arábica indicaron una pureza del aislado de cáñamo del  $91.3 \pm 2.8\%$ . En la Figura 19a y 19b se muestran los espectros de IR de la harina de cáñamo comercial y el aislado proteico de cáñamo seco, respectivamente. En el espectro del aislado de proteína de cáñamo se observa que después de la limpieza predominan las bandas características de la proteína. Sin embargo, las bandas para grasa y los polisacáridos disminuyen drásticamente. En la Figura 19c se muestran los espectros IR de los estándares de la caseína-goma arábica que permitieron la construcción de la curva de calibración de IR, donde se observa que conforme aumenta la

concentración de la proteína a  $1,611\text{ cm}^{-1}$  o el polisacárido a  $1,020\text{ cm}^{-1}$ , se intensifica su banda característica. Estas bandas se utilizaron para construir el modelo de calibración. También se generaron cocientes de absorbancia a partir de la banda de amida I debida de la proteína (tensión C=O). Mientras que para polisacáridos se utilizó de referencia la banda debida por la tensión C-O-C. Los cocientes de absorbancia empleados para proteínas y polisacáridos se calcularon a partir de la ecuación siguiente  $\text{Absorbancia a } 1,020\text{ cm}^{-1} / \text{Absorbancia a } 1,611\text{ cm}^{-1}$ .

Malomo *et al.* (2014) reportaron que después de la limpieza de una harina de cáñamo desengrasada con una pureza del 44.32%, obtuvieron un aislado de proteína con una pureza del 84.15%. También, en este mismo estudio se menciona que el contenido de proteína en la harina comercial de cáñamo se encuentra en el intervalo de 31 a 53.3%. En otro estudio, reportado por Tang *et al.* (2006) reportaron un aislado de proteína con una pureza del 86.9% a partir de una harina de cáñamo con un contenido de proteína del 50.2%. En ambos estudios se empleó el método de aislamiento por precipitación isoelectrica, análogo al método empleado en el presente estudio. En general, los resultados anteriores prueban que el procedimiento usado para la purificación de la proteína de cáñamo es eficiente.



**Figura 19.** Espectros FTIR de a) harina de cáñamo comercial; b) aislado proteico de cáñamo; c) estándares de caseína-goma arábica

Este aislado de proteína, junto con la proteína de chícharo comercial al 80% de pureza y los polisacáridos correspondientes se utilizaron para producir las paredes de las microcápsulas.

## 4.2 Caracterización de las microcápsulas

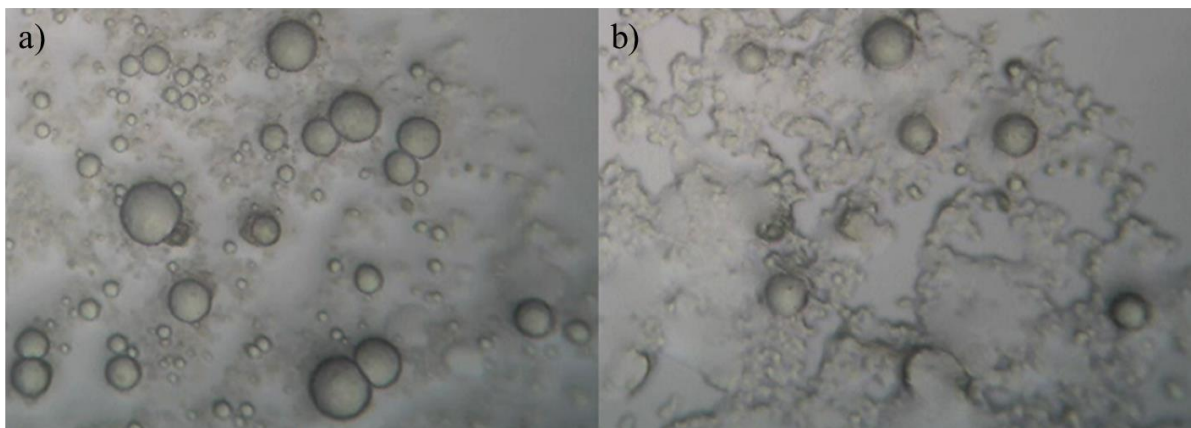
Durante la etapa de almacenamiento a 4°C se observó la presencia de un sobrenadante color naranja, Figura 20. Este sobrenadante se analizó por microscopía óptica petrográfica para determinar el tamaño y la morfología de los microencapsulados.





**Figura 20.** Formación de microcápsulas suspendidas en medio acuoso almacenadas a 4°C

Sin embargo, cuando las microcápsulas se retiraron de la disolución se fragmentaron y se liberó el aceite rico en astaxantina. Este comportamiento se presentó en todos los tratamientos. En la Figura 21 se observa el comportamiento de los microencapsulados al remover el mayor contenido de agua. Por lo tanto, las microcápsulas se conservaron en disolución hasta su posterior análisis.

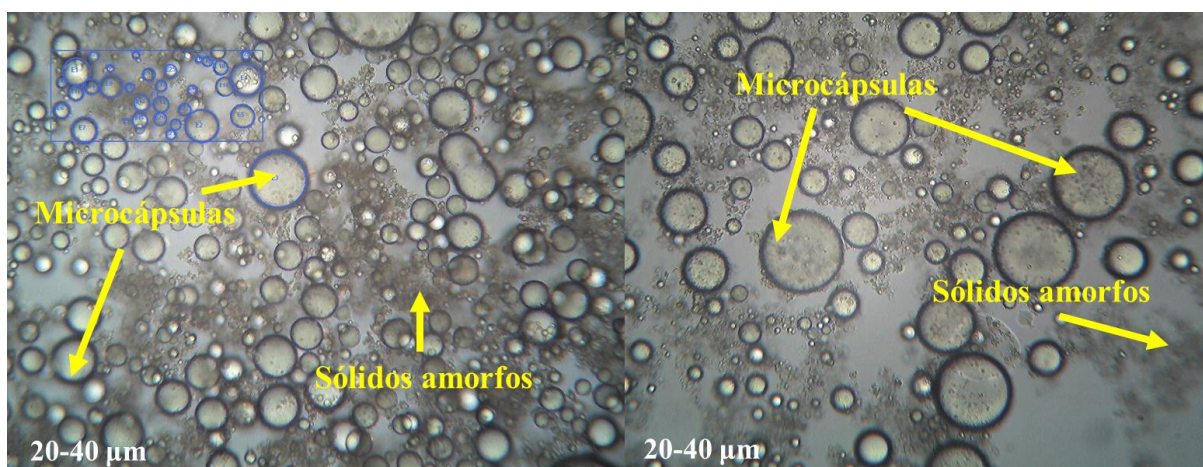


**Figura 21.** Microencapsulados a) en medio acuoso; b) Remoción de agua  
Observados por microscopía óptica petrográfica

Yan & Zhang (2014) reportaron que las microcápsulas formadas a partir de esta técnica suelen ser inestables y de baja resistencia mecánica, debido a la naturaleza iónica de la interacción entre

las capas de los biopolímeros. Por lo tanto, para obtener microcápsulas secas se necesita una reticulación más fuerte para estabilizar y reforzar los microencapsulados antes de secarlos. Generalmente, para la reticulación covalente se han utilizado aldehídos a través de la unión de residuos de los grupos hidroxilo de los polisacáridos y/o residuos de amina de las proteínas (Farris *et al.*, 2010). Sin embargo este tipo de reticulación covalente inducida afecta la evaluación de la bioaccesibilidad de los microencapsulados. Es decir durante el tránsito gastrointestinal la liberación de la matriz es más lenta, de acuerdo a estudios que se discuten en la sección 4.2.5.

Por otra parte, los productos de la microencapsulación con proteína de cáñamo, presentaron residuos insolubles, Figura 22. Estos se identificaron por microscopía óptica petrográfica. Los resultados de eficiencia de microencapsulación, confirmaron estas observaciones, *vide infra*, sección 4.2.3. Esto posiblemente se debió a que la proteína de cáñamo no se solubilizó completamente en la disolución amortiguadora (pH = 7.3). En el caso de los microencapsulados obtenidos a partir de la proteína de chícharo no se presentan estos residuos insolubles.



**Figura 22.** Presencia de residuos insolubles de la proteína de cáñamo  
Observados por microscopía óptica petrográfica

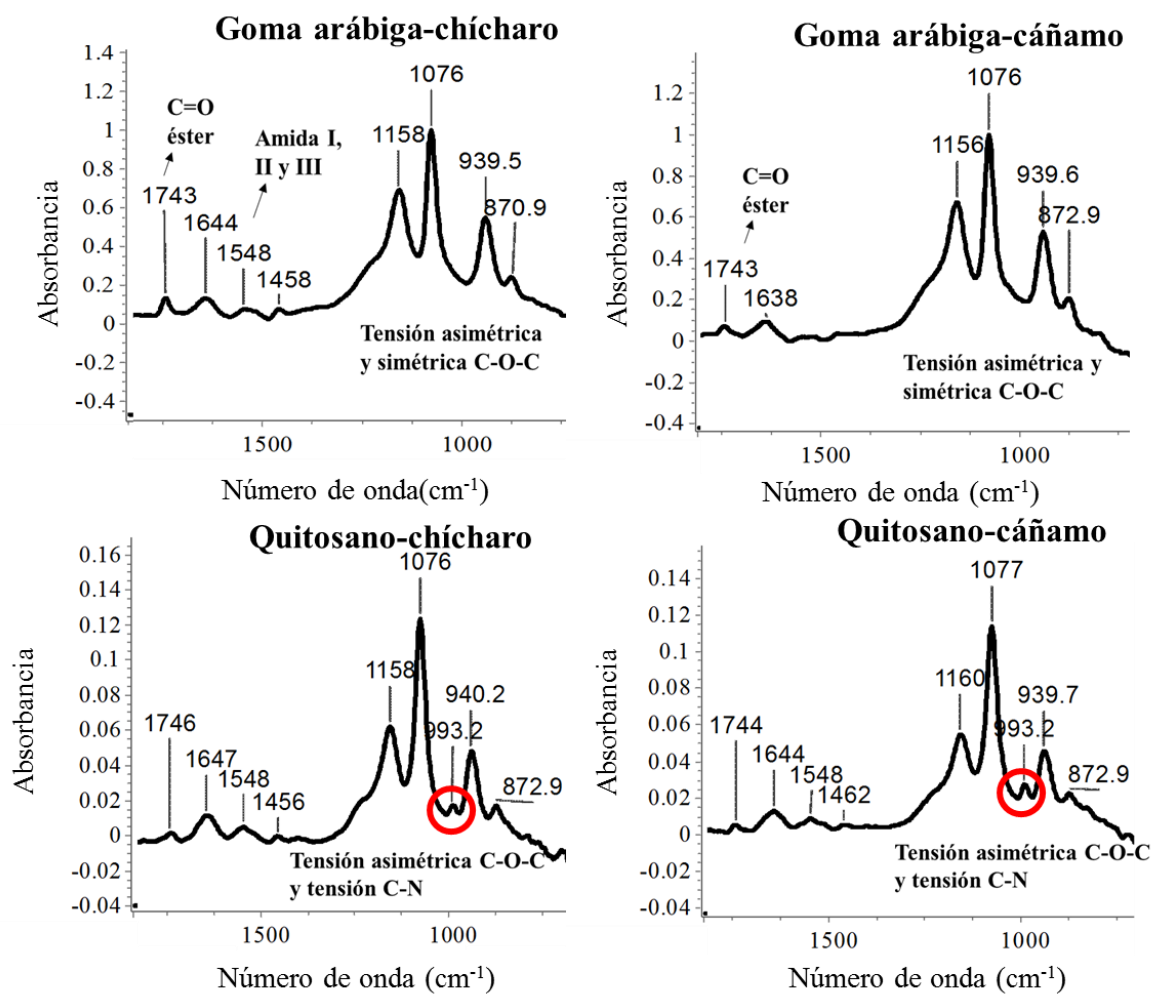
Respecto a lo anterior, Le Priol *et al.* (2019) encapsularon aceite de girasol por secado por aspersión para mejorar la estabilidad oxidativa, utilizando disoluciones de cinco extractos de proteínas (pH 7.8), entre ellas de chícharo y cáñamo. Las micrografías de los microencapsulados a partir de la proteína de cáñamo indican la presencia de residuos insolubles. Sin embargo, los tratamientos con chícharo no mostraron ese comportamiento. Esto se debe a que la proteína de chícharo contiene una gran cantidad de vicilinas también llamadas globulinas 7S (Tabla 6). Las cuales se caracterizan por tener mejor solubilidad y propiedades emulsificantes en disoluciones salinas.

#### **4.2.1 Espectros FTIR de las microcápsulas**

Los espectros FTIR permitieron identificar bandas de los grupos funcionales característicos de los materiales de pared (proteínas y polisacáridos) y del aceite. En la Figura 23 se muestran los espectros IR de los microencapsulados, donde se pueden observar las bandas de los polisacáridos en mayor intensidad. Esto indica que la luz infrarroja absorbida por la muestra se debe principalmente a la cubierta más externa de la microcápsula observadas a  $1,000-1,200\text{ cm}^{-1}$ . Adicionalmente, los espectros de IR permiten diferenciar la composición en polisacáridos de las microcápsulas con base en la banda localizada en  $993.2\text{ cm}^{-1}$ , característica del quitosano (QUI) y por lo tanto, ausente en las microcápsulas preparadas con goma arábica (GA). Esta banda corresponde a la tensión C-N del grupo amino presente en la estructura del quitosano. En los espectros, también se pueden observar, en menor intensidad, algunas bandas relacionadas con la proteína ( $1,700-1,300\text{ cm}^{-1}$ ) y los ácidos grasos del aceite de oliva extravirgen ( $1,744\text{ cm}^{-1}$ ).

Los resultados anteriores concuerdan con los reportados por Feng *et al.* (2018), quienes encapsularon astaxantina de *Phaffia rhodozyma* con carboximetilcelulosa sódica y celulosa microcristalina por liofilización. En este estudio hacen la comparación de las bandas iniciales de

los materiales de pared y el núcleo e indican que después de llevar a cabo el microencapsulado las bandas para el núcleo son atenuadas, y los espectros de IR proporcionan únicamente información de la cubierta. Por lo tanto, los resultados obtenidos a partir de los espectros de IR en el presente estudio confirman la formación de los microencapsulados.



**Figura 23.** Espectros IR de las microcápsulas

## 4.2.2 Tamaño y distribución de las microcápsulas

La variación del tamaño de los microencapsulados se debe principalmente a los cambios de factores durante el proceso de formación. Estos factores son pH, velocidad de agitación, relación de biopolímeros y concentración de proteína.

En general, el diámetro de las microcápsulas se encuentra en un intervalo de 6.62 a 26.91  $\mu\text{m}$ , Figura 24. El tamaño de las microcápsulas varió notablemente en función de la proteína empleada. Las microcápsulas elaboradas con proteína de cáñamo presentaron un mayor diámetro respecto a las de chícharo.

Los resultados anteriores concuerdan con Plati *et al.* (2021) quienes evaluaron la formación de coacervados a partir de proteína aislada de cáñamo-goma arábica. Estos microencapsulados presentaron un diámetro entre 21.7-36.5  $\mu\text{m}$ . También mencionan que el tamaño se vio afectado por la concentración de proteína

Todos los tratamientos en este estudio mostraron formas esféricas y con apariencia rugosa. Sin embargo, cuando se deshidratan hay fragmentación y liberación del aceite.

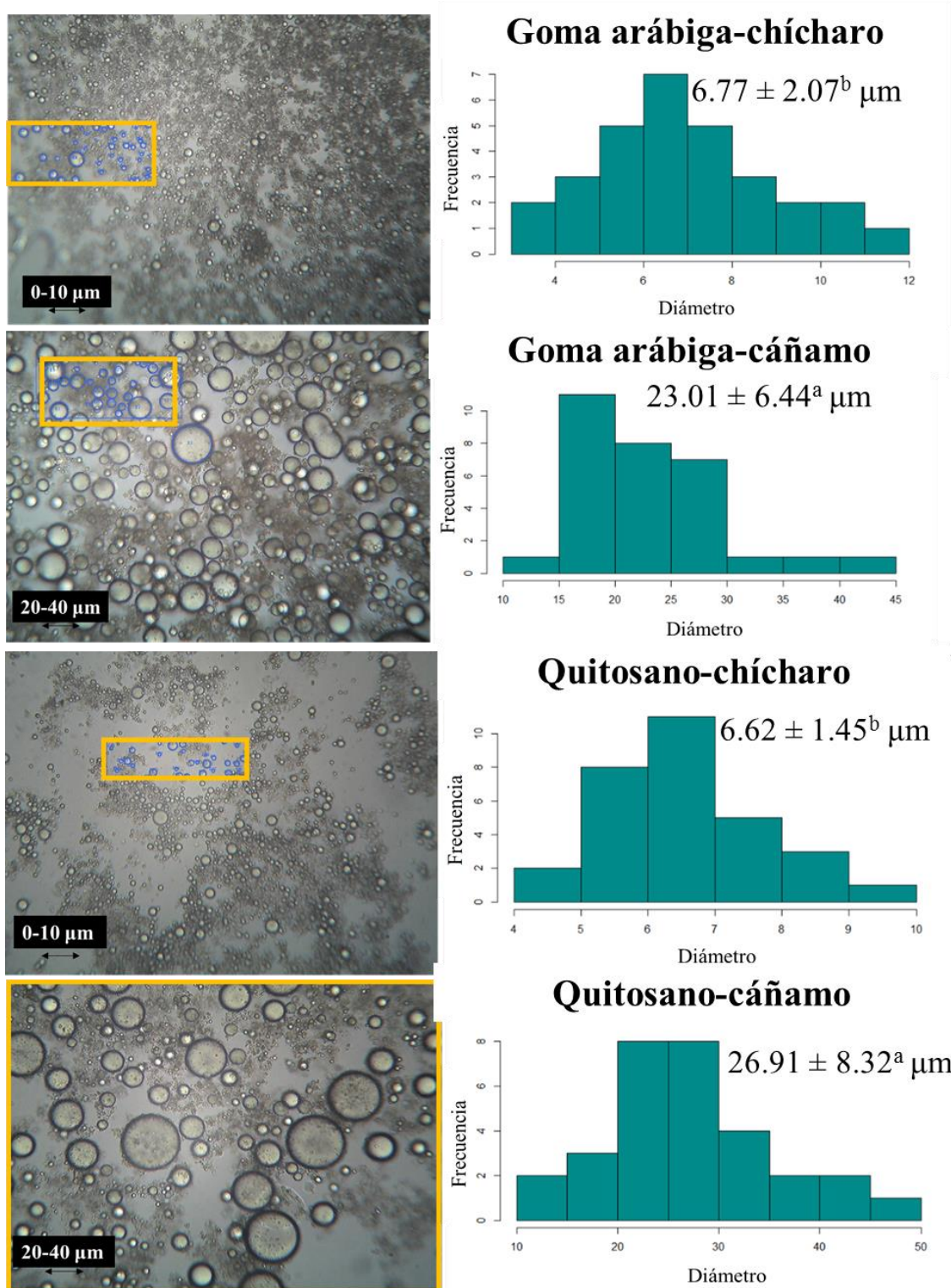
La variabilidad en el tamaño de las microcápsulas obtenidas en el presente trabajo es menor al reportado por Rocha-Selmi *et al.* (2013), quienes encapsularon licopeno por coacervación compleja, utilizando como agentes de pared gelatina-goma arábica. El tamaño de las microcápsulas fue entre 61-144  $\mu\text{m}$ . Esto hace evidente que una de las variables que influye de manera importante sobre la variación del tamaño de las microcápsulas es la proteína empleada como material de pared.

Otra variable importante que influye sobre la variabilidad en el tamaño de la microcápsula es el pH final del coacervado. Respecto a esto, Zhou *et al.* (2018) encapsularon astaxantina evaluando el tamaño en función del pH de los coacervados. En este estudio utilizaron proteína de suero

lácteo-goma arábiga, y sus resultados mostraron que a un pH final de 4.0 el diámetro de las microcápsulas fue de  $15.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$ . Este pH es igual al empleado en el presente estudio, por lo tanto se asume que el pH no influyó de manera determinante en la variabilidad reportada.

Por lo tanto, los resultados del presente estudio indican que el factor proteína influyó en el tamaño de los microencapsulados.

A continuación se muestran gráficos de los porcentajes de frecuencia de los microencapsulados.

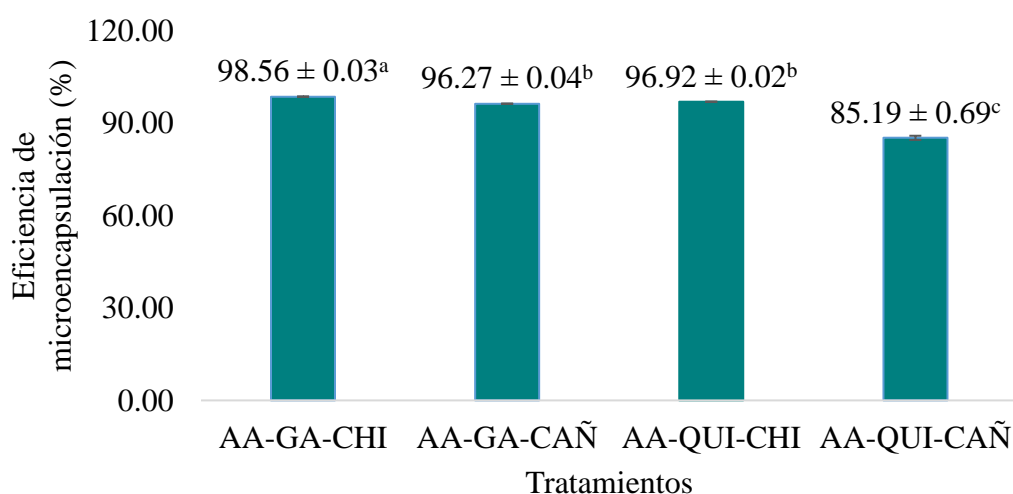


**Figura 24.** Micrografías y gráficos de frecuencia de distribución de diámetro de los microencapsulados  
 El cuadro amarillo indica la región utilizada para realizar la cuantificación del número de microcápsulas y su tamaño respectivo

### 4.2.3 Eficiencia de microencapsulación

Las eficiencias de microencapsulación del presente estudio resultaron ser superiores al 80% y concuerdan con los valores reportados en la literatura para esta técnica. Las microcápsulas que mostraron mejores eficiencias involucraron el uso de GA al igual que la combinación QUI-CHI, Figura 25.

Las eficiencias antes mencionadas son cercanas a las reportadas por Rocha-Selmi *et al.* (2013), quienes encapsularon licopeno disperso en aceite, utilizando como agentes de barrera gelatina-goma arábica con eficiencias en un intervalo de 90-99%. En otro estudio realizado por Qv *et al.* (2011), reportaron el uso de los mismos agentes de pared reportados en el estudio anterior para encapsular luteína con una eficiencia de 85-86%. Ambos métodos utilizaron espectrofotometría de UV/vis para la cuantificación de licopeno y luteína a 470 y 446 nm, respectivamente, para evaluar la eficiencia de microencapsulación. Métodos análogos al empleado en el presente estudio para cuantificar astaxantina total.



**Figura 25.** Eficiencias de microencapsulación

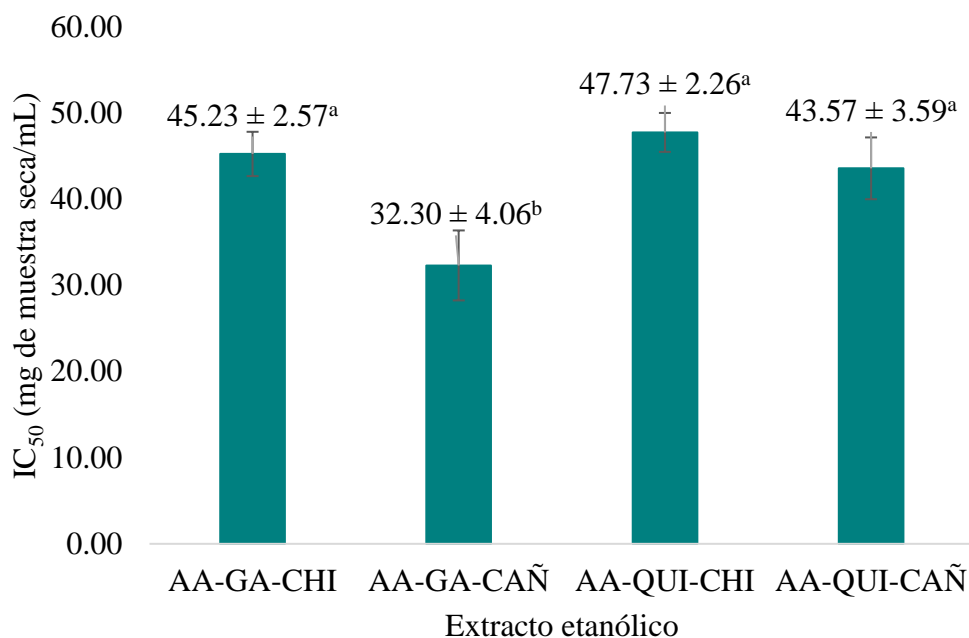
Se indican promedio de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes como superíndice indican datos estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Se realizó un ANOVA y la prueba de Tukey para el comparativo de pares de medias. Abreviaciones: AA: aceite-astaxantina; GA: goma arábica; CHI: chícharo; QUI: quitosano; CAÑ: cáñamo.



#### 4.2.4 Evaluación de la actividad antirradicalar

La determinación del  $IC_{50}$  indica la concentración necesaria para inhibir el 50% del radical DPPH<sup>\*</sup> con los extractos etanólicos obtenidos a partir de los microencapsulados. El tratamiento AA-GA-CAÑ mostró el valor más bajo de  $IC_{50}$ ,  $32.30 \pm 4.06$  mg de muestra seca/mL de disolución, Figura 26. Esto indica que de los cuatro microencapsulados, AA-GA-CAÑ presentó la capacidad antirradicalar más alta. Mientras que los otros tres tratamientos mostraron una capacidad antirradicalar estadísticamente igual a un valor de  $\alpha = 0.05$ . Posiblemente, la capacidad antirradicalar relativamente alta de las microcápsulas AA-GA-CAÑ se deba a la presencia de péptidos antioxidantes, con una capacidad antirradicalar importante. Este resultado no se mostró en el tratamiento AA-QUI-CAÑ, debido a que este último se obtuvo con un rendimiento bajo de microencapsulación, que dio origen a una disminución de astaxantina en el producto y como consecuencia una menor capacidad antirradicalar.

Respecto a lo anterior, Girgih *et al*, (2011) mencionan que la presencia de ciertos aminoácidos como histidina, tirosina, metionina, lisina, triptófano y prolina incrementa la capacidad antioxidante de péptidos derivados de estos aminoácidos. En este estudio emplearon el método de DPPH<sup>\*</sup> para evaluar la capacidad antirradicalar de la proteína hidrolizada de cáñamo. Estos autores indican que los péptidos presentes tienen la capacidad para atrapar radicales. En este estudio, los autores mencionan que la proteína de cáñamo es prometedora para la formulación de alimentos funcionales con propiedades bioactivas.

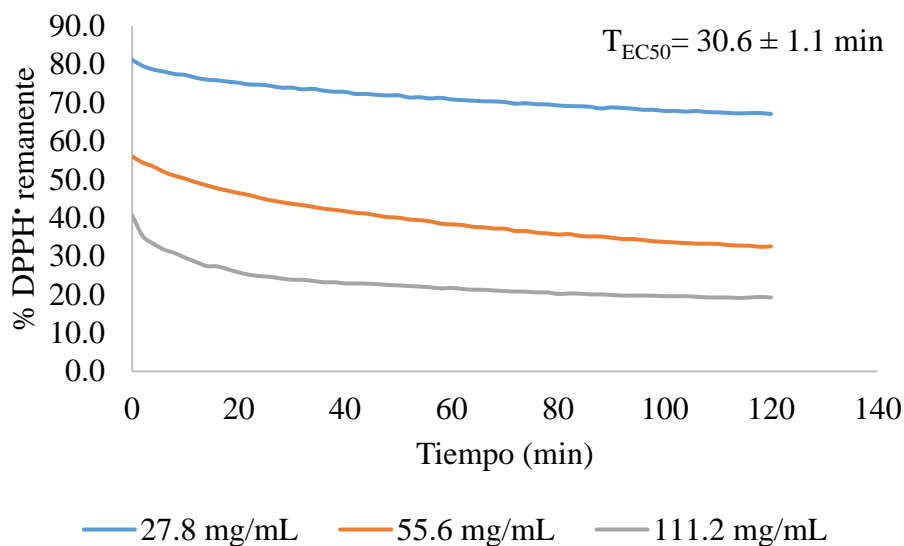


**Figura 26.** IC<sub>50</sub> de los extractos obtenidos de los cuatro tratamientos

Se indican promedio de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes como superíndice indican datos estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Se realizó un ANOVA y la prueba de Tukey para el comparativo de pares de medias. Abreviaciones: AA: aceite-astaxantina; GA: goma arábica; CHI: chícharo; QUI: quitosano; CAÑ: cáñamo.

Para calcular la eficiencia antirradicalar se llevaron a cabo cinéticas que permitieron conocer el tiempo necesario para alcanzar el estado estable ( $T_{EC50}$ ) para cada uno de los extractos obtenidos, Apéndice 5. La cinética para el tratamiento AA-GA-CHI mostró un estado estable a un tiempo de  $54 \pm 2$  min, estos valores fueron superiores al ácido gálico, 42 min, utilizado como control. El  $T_{EC50}$  para el tratamiento AA-GA-CAÑ alcanzó el estado estable en  $44.66 \pm 2.30$  min. El tratamiento AA-QUI-CAÑ presentó el menor  $T_{EC50}$ ,  $30.6 \pm 1.1$  min, Figura 27. Un  $T_{EC50}$  relativamente corto, tal como se observa para el tratamiento AA-QUI-CAÑ, está asociado con una reactividad alta de los antioxidantes presentes en los extractos de los microencapsulados. Esto se puede explicar por la presencia de efectos sinérgicos entre el quitosano y los antioxidantes, que promueven un aumento en la velocidad de reacción del DPPH $\cdot$ . Por último el tratamiento AA-QUI-CHI fue el que presentó el mayor tiempo,  $78 \pm 2$ . Los tratamientos con la proteína de cáñamo fueron los que alcanzaron el estado estable en menor tiempo. Además, esto

puede indicar que existen constituyentes en la proteína de cáñamo que promueven la reducción del radical DPPH<sup>\*</sup>.



**Figura 27.** T<sub>EC50</sub> del extracto AA-QUI-CAÑ

En la Tabla 11 se muestran los valores de T<sub>EC50</sub> para cada uno de los extractos, así como su eficiencia antirradicalar (AE) expresada en  $\mu\text{g DPPH}^*/\text{mg muestra seca} \cdot \text{min}$ . De acuerdo a la clasificación reportada por Gramza *et al.* (2005) para la eficiencia antirradicalar, los extractos con la proteína de cáñamo presentaron una AE muy alta y significativamente superior a los tratamientos con goma arábica.

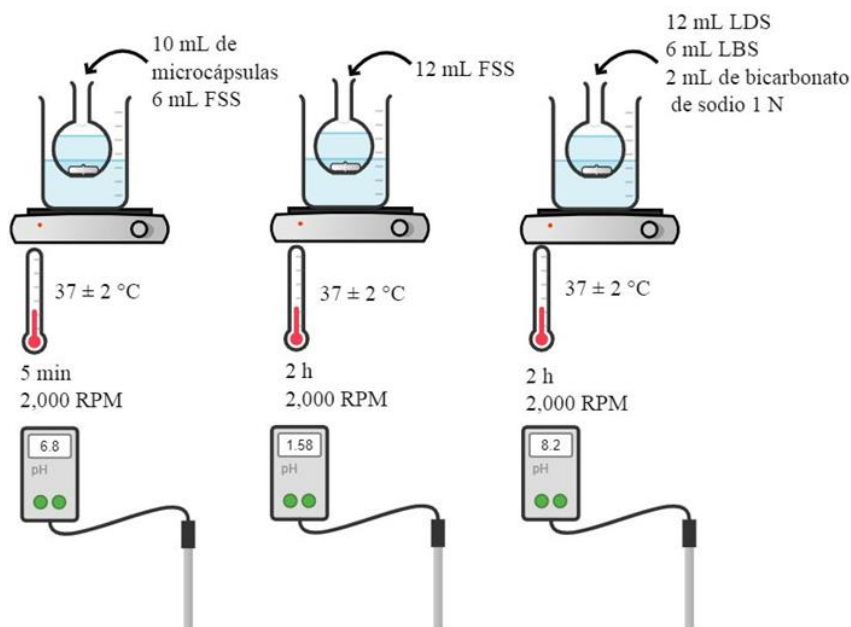
**Tabla 11.**  $T_{EC50}$  y eficiencia antirradicalar (AE) de los extractos de los cuatro tratamientos

Extracto	$IC_{50}$ (mg de muestra seca/ $\mu$ g DPPH')	$T_{EC50}$ (min)	AE ( $10^{-3}$ ) ( $\mu$ g DPPH'/mg muestra seca*min)	Clasificación de eficiencia antirradicalar
AA-GA-CHI	$2.26 \pm 0.13^a$	$54 \pm 2.0^b$	$8.21 \pm 0.19^b$	Alta
AA-GA-CAÑ	$1.61 \pm 0.21^b$	$44.6 \pm 2.3^c$	$14.00 \pm 0.01^a$	Muy alta
AA-QUI-CHI	$2.38 \pm 0.11^a$	$78 \pm 2.0^a$	$5.39 \pm 0.34^b$	Alta
AA-QUI-CAÑ	$2.17 \pm 0.18^a$	$30.6 \pm 1.1^d$	$15.00 \pm 0.01^a$	Muy alta

Se indican promedio de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes como superíndice indican datos estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Se realizó un ANOVA y la prueba de Tukey para el comparativo de pares de medias. Abreviaciones: AA: aceite-astaxantina; GA: goma arábica; CHI: chícharo; QUI: quitosano; CAÑ: cáñamo.

#### 4.2.5 Bioaccesibilidad de los microencapsulados

En la Figura 28 se observa el sistema de digestión *in vitro* que permitió evaluar la bioaccesibilidad de los microencapsulados. En todos los tratamientos se monitoreó el tiempo, pH y temperatura. Las disoluciones digestoras fueron calentadas a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  previo a su posterior uso.



**Figura 28.** Sistema de digestión *in vitro* para la evaluación de la bioaccesibilidad de los microencapsulados

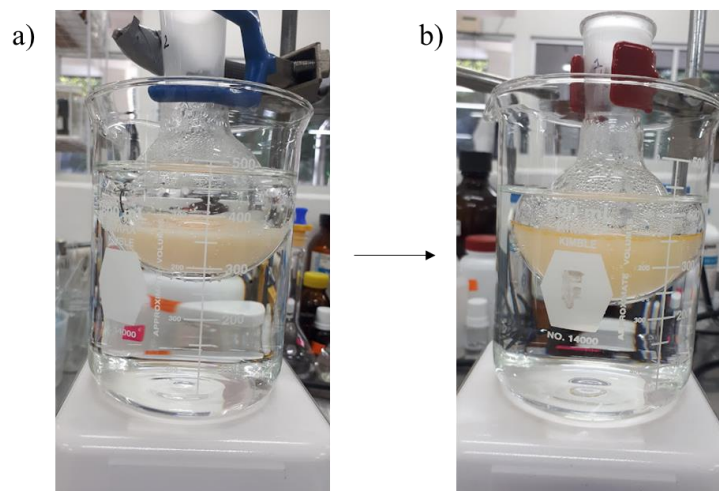
Durante la digestión de los microencapsulados con goma arábica (GA) con los fluidos salival y gástrico no se observó la fragmentación. Sin embargo, en la última etapa (intestinal) se observó la liberación del aceite rico en astaxantina como se observa en la Figura 29. Los microencapsulados no se fragmentaron en la etapa gástrica debido a que las interacciones electrostáticas atractivas entre los materiales de pared (proteína y polisacárido) se conservaron. Sin embargo, durante la etapa de digestión intestinal el aceite se liberó. Esto se favoreció por el incremento del pH de la disolución digestora. Situación que promovió el incremento de las cargas negativas en las proteínas con un consecuente incremento en las fuerzas de repulsión entre proteínas y polisacáridos, promoviendo la fragmentación de la microcápsula, Figura 29b. Además, el fluido intestinal contenía enzimas, específicamente proteasas que provocaron la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Este comportamiento fue muy marcado en los tratamientos con GA.

Respecto a lo anterior, Zhou *et al.* (2018) encapsularon astaxantina esterificada por coacervación compleja, utilizando proteína de suero lácteo-goma arábica. La bioaccesibilidad de los microencapsulados se evaluó mediante un sistema de digestión *in vitro*. Estos autores indican que la liberación de la astaxantina ocurrió en la etapa gástrica e intestinal. La ruptura de las microcápsulas se debe a los cambios de las interacciones electrostáticas y la acción enzimática a pH cercano a la neutralidad en el fluido salival e intestinal. Asimismo, las moléculas de proteína y polisacárido poseen carga negativa y como consecuencia, existirá una repulsión entre ellas. Sin embargo, las moléculas de proteína pueden ser digeridas por proteasas lo que provocaría la ruptura de las microcápsulas.

Por otro lado, los tratamientos con quitosano (QUI) mostraron una bioaccesibilidad limitada por exposición a los distintos fluidos digestivos. Esto se debió a que estos microencapsulados involucran grupos amino que favorecen la generación de enlaces iónicos, los cuales resistieron el

proceso de digestión, con una bioaccesibilidad del 15.2 y 48.6% en los tratamientos QUI-CHI y QUI-CAÑ, respectivamente. Además, el tamaño de las microcápsulas influyó en la liberación del aceite durante la digestión *in vitro*. Las microcápsulas de mayor tamaño, formuladas con proteína de cáñamo tuvieron un mayor porcentaje de bioaccesibilidad que las microcápsulas de proteína de chícharo, Tabla 12.

Respecto a lo anterior, un estudio realizado por Luo *et al.* (2011) quienes encapsularon  $\alpha$ -tocoferol (TOC) utilizando zeína-quitosano. Estos autores evaluaron el efecto del fluido simulado gástrico e intestinal sobre los microencapsulados y la posible liberación de TOC. El proceso de estas dos etapas fue de 6.5 h e indican que en la etapa gástrica el QUI se solubiliza fácilmente, y por consiguiente la ruptura de las microcápsulas por la acción enzimática de la pepsina. Además, mencionan que cuando incrementa la concentración de proteína y disminuye la relación proteína-polisacárido la liberación de  $\alpha$ -tocoferol en la etapa gástrica reduce hasta un 30%. Asimismo, la baja liberación puede también ser atribuida a el tamaño, debido a que entre menor sea la relación proteína-polisacárido tiene mayor diámetro los microencapsulados. Por otro lado, estos autores también mencionan que con una capa de QUI más gruesa o el aumento de la concentración de este, la pepsina tardó más en hidrolizar la zeína. Por lo tanto, el TOC encapsulado se liberó del complejo más lentamente, es decir se muestra una mejor protección en la simulación gástrica.



**Figura 29.** a) simulación gástrica de GA-CHI; b) simulación intestinal de GA-CHI

**Tabla 12.** Concentración de astaxantina antes y después del proceso de digestión

Tratamientos	Concentración de astaxantina antes de la digestión ( $\mu\text{g/g}$ de microcápsulas secas)	Concentración de astaxantina después de la digestión ( $\mu\text{g/g}$ de microcápsulas secas)	Bioaccesibilidad (%)
AA-GA-CHI	$34.86 \pm 0.76^a$	$37.95 \pm 4.68^a$	100.0 <sup>a</sup>
AA-GA-CAÑ	$22.80 \pm 0.27^b$	$23.76 \pm 0.33^b$	100.0 <sup>a</sup>
AA-QUI-CHI	$19.01 \pm 0.15^c$	$2.90 \pm 0.35^d$	15.2 <sup>b</sup>
AA-QUI-CAÑ	$20.26 \pm 0.96^c$	$9.85 \pm 0.65^d$	48.6 <sup>c</sup>

Se indican promedio de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes como superíndice indican datos estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Se realizó un ANOVA y la prueba de Tukey para el comparativo de pares de medias. Abreviaciones: AA: aceite-astaxantina; GA: goma arábica; CHI: chícharo; QUI: quitosano; CAÑ: cáñamo.

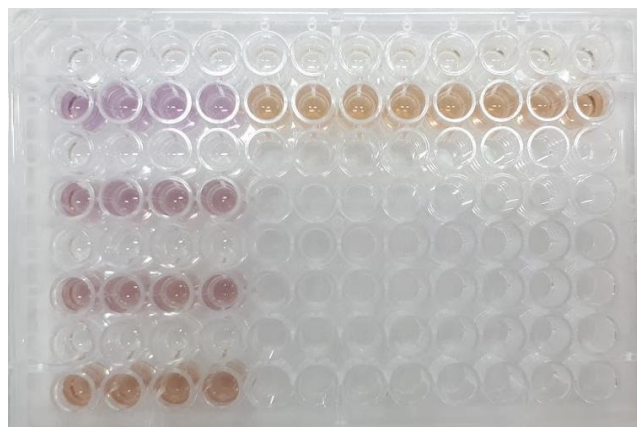
Finalmente, los extractos etanólicos obtenidos a partir de los digeridos mostraron interferencias a 580 nm durante la reacción con el DPPH<sup>•</sup>. Esto se debe a la formación de un complejo color amarillo intenso, Figura 30. Esto posiblemente se debió a que durante la etapa de digestión intestinal se favoreció la hidrólisis de los ésteres de astaxantina produciendo astaxantina libre, la cual presenta una coloración rojiza más intensa que sus ésteres correspondientes. Respecto a esto, Zhou *et al.* (2018), mencionan que ésteres de astaxantina son hidrolizados por lipasas en un

sistema de digestión *in vitro*. Cabe señalar que la astaxantina presenta una mayor eficiencia antirradicalar que sus ésteres correspondientes.

Con base a lo anterior, Kobayashi & Sakamoto (1999) evaluaron la capacidad antioxidante de  $\beta$ -caroteno, astaxantina libre y sus ésteres (monoéster y diéster) contra  $^1\text{O}_2$  quien generaba la oxidación del ácido linoleico; utilizando un sistema de disolventes hidrofóbico/hidrofílico (hexano/etanol). Estos autores mencionan que las actividades de extinción de  $^1\text{O}_2$  dependen de la hidrofobicidad del disolvente para  $\beta$ -caroteno y astaxantina libre. Mientras que para los ésteres de astaxantina son independientes de la hidrofobicidad. En presencia de  $\beta$ -caroteno, el nivel de oxidación del ácido linoleico fue más alto en disolución de etanol al 100%. No obstante, la oxidación decrece con mayor concentración de hexano en etanol. Por el contrario, en presencia de astaxantina libre, el nivel de oxidación fue baja en etanol al 100% y aumentó en presencia de concentraciones más altas de hexano. Sin embargo, los perfiles de los ésteres de astaxantina fueron iguales. Las actividades de extinción de  $^1\text{O}_2$  de los carotenoides fueron determinados como la concentración necesaria para inhibir la oxidación del ácido linoleico ( $\text{IC}_{50}$ ), Tabla 13. Estos resultados indican que las actividades antioxidantes del  $\beta$ -caroteno y la astaxantina libre dependían de la polaridad del disolvente.

En general la astaxantina libre es mucho más activa que los ésteres en condiciones hidrofílicas de acuerdo a lo descrito anteriormente.





**Figura 30.** Etapa de reacción en microplaca de los extractos etanólicos de los digeridos con el radical DPPH\*

**Tabla 13.** Valores de IC<sub>50</sub> de los carotenoides para la actividad de extinción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en dos disolventes

Carotenoides	100% etanol		Hexano en etanol 50% (v/v)	
	(µg/mL)	µM	(µg/mL)	µM
β-caroteno	21.5	40.1	7.7	14.3
Monoéster de astaxantina	11.1	10.0	7.4	6.5
Diéster de astaxantina	8.0	9.3	8.6	10.0
Astaxantina libre	5.0	8.3	9.4	15.7

Fuente: (Kobayashi & Sakamoto, 1999)

## Conclusiones

A partir de la técnica de coacervación compleja se obtuvieron microencapsulados de astaxantina utilizando proteína de chícharo y cáñamo combinados con goma arábica y quitosano. La formación de estos microencapsulados se confirmó a partir de microscopía óptica petrográfica. El tamaño de estos fue variable, indicando que los tratamientos con la proteína de cáñamo fueron los que presentaron mayor diámetro ( $6.62 \pm 1.45$  a  $26.91 \pm 8.32 \mu\text{m}$ ). Los espectros FTIR permitieron identificar que la superficie de los microencapsulados está constituida principalmente por los polisacáridos. También se identificaron bandas en menor intensidad de fragmentos de proteína y aceite sin encapsular en QUI-CAÑ.

Tres tratamientos presentaron eficiencias de microencapsulación superiores al 95%, GA-CHI, GA-CAÑ y QUI-CHI. Mientras que los tratamientos a partir de la proteína de cáñamo mostraron la eficiencia antirradicalar más alta.

Por otra parte, las microcápsulas con GA resultaron ser las más bioaccesibles comparados con los tratamientos con QUI. Por lo cual, estos microencapsulados resultaron ser resistentes logrando obtener una bioaccesibilidad baja.

## Perspectivas

En esta sección se dan a conocer las perspectivas de la presente investigación.

1. Los microencapsulados obtenidos fueron inestables después de someterlos a un proceso de secado o lavado con etanol. Por lo tanto, se sugiere que en futuros estudios se realice una reticulación covalente que involucre una reacción enzimática de las proteínas que forman la pared de la microcápsula con transglutaminasa, durante el proceso de microencapsulado.
2. Después del proceso de digestión se recomienda cuantificar astaxantina libre para evaluar la hidrólisis de los ésteres de astaxantina en presencia de las lipasas, las cuales son componentes del fluido intestinal.
3. En los digeridos de los microencapsulados no se logró medir la capacidad y actividad antioxidante debido a la posible interferencia de la astaxantina libre durante la medición de la absorbancia del DPPH<sup>•</sup> remanente a 580 nm. Por tal motivo se sugiere utilizar otro método de evaluación de la capacidad antioxidante de los digeridos, tal como el poder reductor férrico.

## Referencias

- Abdelkader, H., Hussain, S. A., Abdullah, N., & Kmaruddin, S. (2018). Review on micro-encapsulation with chitosan for pharmaceuticals applications. *MOJ Current Research & Reviews*, *1*(2), 77–84. <https://doi.org/10.15406/mojcrr.2018.01.00013>
- Adebiyi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry*, *128*(4), 902–908.
- Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A., & Rafiee, S. (2013). Fish oil microencapsulation as influenced by spray dryer operational variables. *International Journal of Food Science and Technology*, *48*(8), 1707–1713. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12141>
- Alminger, M., Aura, A. M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S. Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T., & Santos, C. N. (2014). *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(4), 413–436.
- Anandharamakrishnan, C., & Padma, I. S. (2015). Selection of wall material for encapsulation by spray drying. UK: Oxford.
- Anarjan, N., Tan, C. P., Nehdi, I. A., & Ling, T. C. (2012). Colloidal astaxanthin: Preparation, characterisation and bioavailability evaluation. *Food Chemistry*, *135*(3), 1303–1309. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.091>
- Anuradha, C. V. (2018). Astaxanthin, a marine carotenoid against hepatic oxidative stress: a systematic review. In *The Liver* (pp. 211–228). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803951-9/00018-5>
- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, *38*(4), 902–912. <https://doi.org/10.1039/b801739p>
- Bachtsi, A. R., & Kiparissides, C. (1996). Synthesis and release studies of oil-containing poly (vinyl alcohol) microcapsules prepared by coacervation. *Journal of Controlled Release*, *38*(1), 49–58. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00099-2)
- Banerjee, K., Ghosh, R., Homechaudhuri, S., & Mitra, A. (2009). Biochemical composition of marine macroalgae from gangetic delta at the apex of bay of bengal. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, *1*(5–6), 96–104.e
- Bansode, S. S., Banarjee, S. K., Gaikwad, D. D., Jadhav, S. L., & Thorat, R. M. (2010). Microencapsulation: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *1*(2), 38–43.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., & Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, *68*(4), 457–462. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00221-6)
- Breithaupt, D. E. (2004). Identification and quantification of astaxanthin esters in shrimp (*Pandalus borealis*) and in a microalga (*Haematococcus pluvialis*) by liquid chromatography-mass spectrometry using negative ion atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 3870–3875.
- Bustamante, A., Masson, L., Velasco, J., Del Valle, J. M., & Robert, P. (2016). Microencapsulation of *H. pluvialis* oleoresins with different fatty acid composition: Kinetic

- stability of astaxanthin and alpha-tocopherol. *Food Chemistry*, 190, 1013–1021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.062>
- Callaway, J. C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140(1–2), 65–72. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4811-6>
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049>
- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001>
- Chew, B. P., Park, J. S., & Wong, M. W. (1999). A comparasion of the anticancer activities of dietary beta-carotene canthaxanthin and astaxanthin in mice *in vivo*. *Anticancer research*, 1849-1853.
- Chiappetta, D. (2006). Microencapsulación de medicamentos. Cátedra de Farmacotecnia I, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Cicerale, S., Lucas, L. J., & Keast, R. S. J. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.006>
- Coates, W., & Ayerza, R. (1996). Production potential of chia in northwestern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 5(3), 229–233. [https://doi.org/10.1016/0926-6690\(96\)89454-4](https://doi.org/10.1016/0926-6690(96)89454-4)
- Córdoba-Castro, N. M., Acero-Reyes, N. L., Duque-Buitrago, L. F., Jiménez-Aguilar, L. J., & Serna-Jiménez, J. A. (2015). Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *UGCiencia*, 21, 73–82. <https://doi.org/10.18634/ugcj.21v.1i.426>
- Courraud, J., Berger, J., Cristol, J.-P., & Avallone, S. (2013). Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, 136(2), 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.076>
- de Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Ramos, Ó. L. (2017). Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: *In vitro* behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243, 23–45. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.02.010>
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products* (2nd ed., Vol. 5).
- Dhankhar, J., Kadian, S. S., & Sharma, A. (2012). Astaxanthin: A potential carotenoid. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(5), 1246–1259.
- Dobetti, L., & Pantaleo, V. (2002). Application of a hydrodynamic model to microencapsulation by coacervation. *Journal of Microencapsulation*, 19 (2), 139-151.
- EFSA (European Food Safety Authority. (2005). Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the request from the European commission on the safety of use of colouring agents in animal human nutrition. *EFSA Journal*, 291, 1-40.
- Farris, S., Song, J., & Huang, Q. (2010). Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 998–1003. <https://doi.org/10.1021/jf9031603>

- Favaro Trindade, C. S., & Grosso, C. R. (2000). The effect of the immobilization of *L. acidophilus* y *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. *Milchwissenschaft kempten*, 55 (9), 496-499.
- FDA, 2014. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology, Food and Drug Administration. Available from: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>
- Feng, Z.-Z., Li, M.-Y., Wang, Y.-T., & Zhu, M.-J. (2018). Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*: Microencapsulation with carboxymethyl cellulose sodium and microcrystalline cellulose and effects of microencapsulated astaxanthin on yogurt properties. *Food Science and Technology*, 96, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.084>
- Fernández-Lozano, J., Guillén-Oterino, A., Gutiérrez-Alonso, G., Abel-Flores, J., & Pérez-Turrado, J. (2015). Presencia de *Haematococcus pluvialis* (Flotow, 1844) en la provincia de Zamora (*Haematococcaceae*). *Boletín de La Real Sociedad Española de Historia Natural. Sección Biológica*, 109, 101–107.
- Florence, A., & Attwood, D. (1998). Physicochemical principles of pharmacy. Great Britain: Bristol: MacMillan Press.
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 381–389. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1686-7>
- Glicksman, M. (1983). Gum arabic. In *Food Hydrocolloids*. Florida: CRC Press.
- Gonçalves, J., Ramos, R., Luís, Â., Rocha, S., Rosado, T., Gallardo, E., & Duarte, A. P. (2019). Assessment of the bioaccessibility and bioavailability of the phenolic compounds of *Prunus avium* L. by *in vitro* digestion and cell model. *ACS Omega*, 4(4), 7605–7613. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03499>
- Gonçalves, N. D., Grosso, C. R. F., Rabelo, R. S., Hubinger, M. D., & Prata, A. S. (2018). Comparison of microparticles produced with combinations of gelatin, chitosan and gum Arabic. *Carbohydrate Polymers*, 196, 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.027>
- Gorusupudi, A., & Bernstein, P. S. (2016). Macular carotenoids: Human health aspects. En A. Kaczor, *Carotenoids: Nutrition, analysis, and technology* (págs. 59-74). Utah, USA: John Wiley & Sons, Ltd.
- Gramza, A., Pawlak-Lemańska, K., Korczak, J., Wasowicz, E., & Rudzinska, M. (2005). Tea extracts as free radical scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(6), 861–867.
- Guerin, M., Huntley, M. E., & Olaizola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 210–216.
- Hanus, M. J., & Harris, A. T. (2013). Nanotechnology innovations for the construction industry. *Progress in Materials Science*, 58(7), 1056–1102. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2013.04.001>
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 185–196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F. M., & Argüelles-Monal, W. (2004). Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*, 56(1), 41–

45. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.11.012>
- Holtin, K., Kuehnle, M., Rehbein, J., Schuler, P., Nicholson, G., & Albert, K. (2009). Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(6), 1613–1622. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2837-2>
- Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (2006). Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, 69(3), 443–449. <https://doi.org/10.1021/np050354+>
- Johnson, E. A., & An, G. H. (1991). Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(4), 297–326. <https://doi.org/10.3109/07388559109040622>
- Julián-Loeza, A. P., Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., Sánchez-Guzmán, B. S., & Salas-Coronado, R. (2011). Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1262–1268. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.012>
- Khare, A. R., & Vasisht, N. (2014). Nanoencapsulation in the food industry: technology of the future. In *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 151–155). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-404568-2.00014-5>
- Kobayashi, M., & Sakamoto, Y. (1999). Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*, 21(4), 265–269. <https://doi.org/10.1023/A:1005445927433>
- Krohn, R. I. (2002). The colorimetric detection and quantitation of total protein. *Current Protocols in Cell Biology*, 15(1), 1–28. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cba03hs15>
- Lavelli, V., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2006). Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 3002–3007. <https://doi.org/10.1021/jf052918l>
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., & Grøndahl, L. (2007). Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8(8), 2533–2541. <https://doi.org/10.1021/bm070014y>
- Le Priol, L., Dagmey, A., Morandat, S., Saleh, K., El Kirat, K., & Nesterenko, A. (2019). Comparative study of plant protein extracts as wall materials for the improvement of the oxidative stability of sunflower oil by microencapsulation. *Food Hydrocolloids*, 95(1), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.026>
- Lee, A.-C., & Hong, Y.-H. (2009). Coacervate formation of  $\alpha$ -lactalbumin-chitosan and  $\beta$ -lactoglobulin-chitosan complexes. *Food Research International*, 42(5–6), 733–738. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.022>
- Li, Y., Miao, F., Geng, Y., Lu, D., Zhang, C., & Zeng, M. (2012). Accurate quantification of astaxanthin from *Haematococcus* crude extract spectrophotometrically. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 30(4), 627–637. <https://doi.org/10.1007/s00343-012-1217-5>
- Lopes, D. B., Speranza, P., & Alves Macedo, G. (2016). A new approach for flavor and aroma encapsulation. In *Novel Approaches of Nanotechnology in Food* (pp. 623–661). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804308-0.00018-2>
- Lorenz, R. T., & Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18, 160–167.

- Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. L., & Wang, Q. (2011). Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.020>
- Lv, H., Xia, F., Liu, M., Cui, X., Wahid, F., & Jia, S. (2016). Metabolomic profiling of the astaxanthin accumulation process induced by high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 20, 35–43.
- Mallamace, D., Corsaro, C., Vasi, C., Vasi, S., Dugo, G., & Mallamace, F. (2014). The protein irreversible denaturation studied by means of the bending vibrational mode. *Physica A*, 412, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2014.06.007>
- Malomo, S. A., He, R., & Aluko, R. E. (2014). Structural and functional properties of hemp seed protein products. *Journal of Food Science*, 79(8), 1512–1521. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12537>
- Mañas, M., & Martínez de Victoria, E. (2004). El aceite de oliva en la dieta y salud humana. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Mendanha, D. V., Molina Ortiz, S. E., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42(8), 1099–1104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007>
- Meng, Y., & Cloutier, S. (2014). Gelatin and other proteins for microencapsulation. In *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 227–239). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-404568-2.00020-0>
- Meyers, S. P., & Bligh, D. (1981). Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(3), 505–508. <https://doi.org/10.1021/jf00105a017>
- Meyers, J. (1993). *The biological role of astaxathin in salmonids and other aquatic species*. USA: Amherst.
- Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 63(1), 141–146. <https://doi.org/10.1351/pac199163010141>
- Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2012). Molecular mechanisms of hypertension-reactive oxygen species and antioxidants: A basic science update for the clinician. *Canadian Journal of Cardiology*, 28(3), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2012.01.017>
- Morelló, J. R., Motilva, M. J., Tovar, M. J., & Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85(3), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.012>
- Mosquera, L. H., Moraga, G., & Martínez-Navarrete, N. (2012). Critical water activity and critical water content of freeze-dried strawberry powder as affected by maltodextrin and arabic gum. *Food Research International*, 47(2), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.019>
- Naguib, Y. M. A. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1150–1154. <https://doi.org/10.1021/jf991106k>
- Oomen, A. G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., ... Van Wijnen, J. H. (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science and Technology*, 36(15), 3326–3334.



- <https://doi.org/10.1021/es010204v>
- Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P., & Abalde, J. (2000). Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), 553–556. <https://doi.org/10.1023/A:1008173807143>
- Pan, R. (2011). Determinación de nitrógeno por el Método Kjeldahl. *ITW Reagents*, 12. Retrieved from [https://www.itwreagents.com/uploads/20180122/A173\\_ES.pdf](https://www.itwreagents.com/uploads/20180122/A173_ES.pdf).
- Pedroza-Islas, R., Macías-Bravo, S., & Vernon-Carter, E. J. (2002). Oil thermo-oxidative stability and surface oil determination of biopolymer microcapsules. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 1, 37–44.
- Phillips, Theresa. (2021). Methods for Protein Purification in Biotechnology. Retrieved from <https://www.thoughtco.com/methods-for-protein-purification-375683>
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
- Plati, F., Ritzoulis, C., Pavlidou, E., & Paraskevopoulou, A. (2021). Complex coacervate formation between hemp protein isolate and gum Arabic: Formulation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.003>
- Qv, X. Y., Zeng, Z. P., & Jiang, J. G. (2011). Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1596–1603. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.006>
- Ranga-Rao, A., Phang, S. M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Marine Drugs*, 12(1), 128–152.
- Ranga-Rao, A., Raghunath Reddy, R. L., Baskaran, V., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2010). Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8553–8559. <https://doi.org/10.1021/jf101187k>
- Ranga-Rao, A., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2007). Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 957–965. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Rocha-Selmi, G. A., Favaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2013). Morphology, stability, and application of lycopene microcapsules produced by complex coacervation. *Journal of Chemistry*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/982603>
- Roche, F. (1987). Astaxanthin: Human food safety summary. In astaxanthin as a pigment in salmon feed, color additive petition. *Hoffman-La Roche*, 43.
- Salminen, H., & Weiss, J. (2014). Effect of pectin type on association and pH stability of whey protein-pectin complexes. *Food Biophysics*, 9(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s11483-013-9314-3>
- Santos-Sánchez, N. F., Hernández-Carlos, B., Torres-Ariño, A., & Salas-Coronado, R. (2020). Astaxanthin and its formulations as potent oxidative stress inhibitors. *Pharmacognosy Reviews*, 14(27), 8–15.
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In E. Shalaby (Ed.),

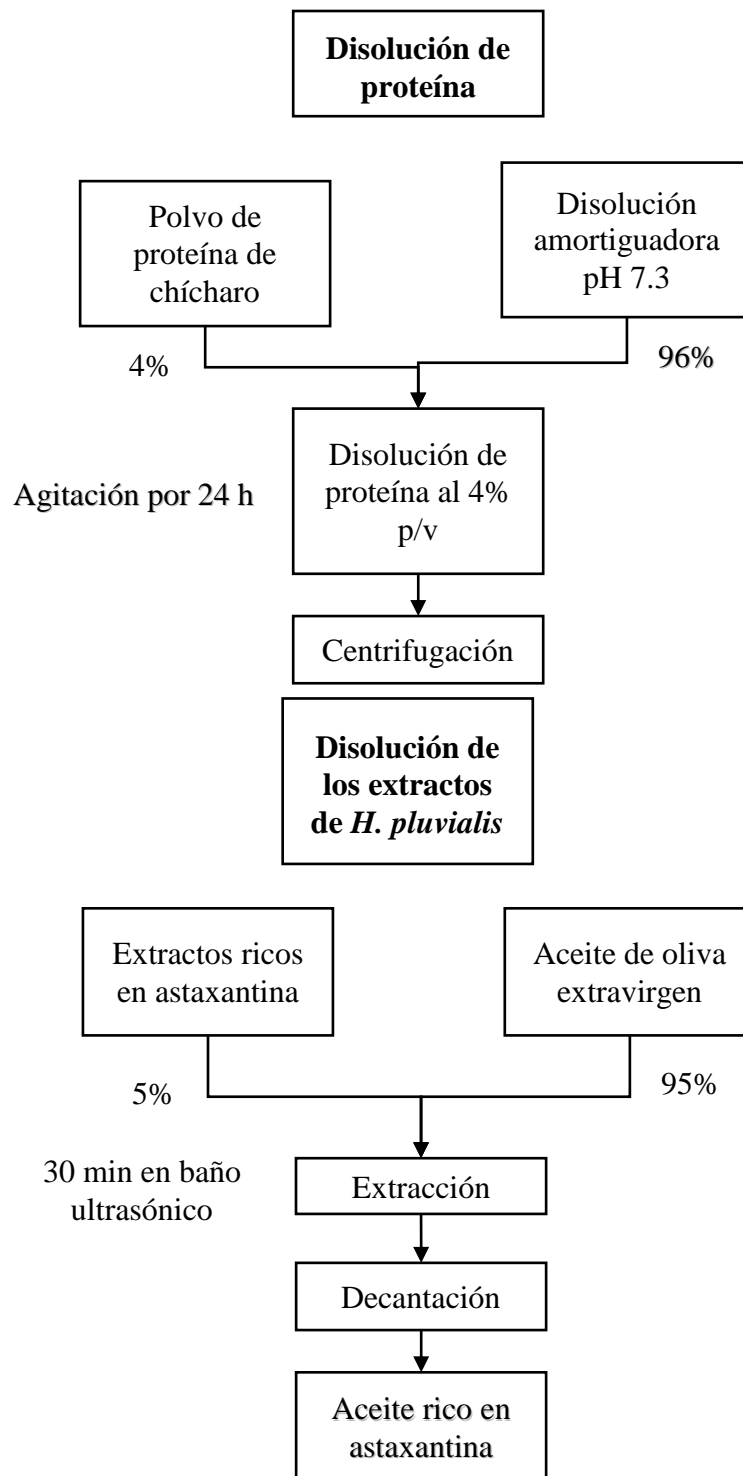
- Antioxidants* (p. 13). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>
- Sarada, R., Ranga Rao, A., Sandesh, B. K., Dayananda, C., Anila, N., Chauhan, V. S., & Ravishankar, G. A. (2012). Influence of different culture conditions on yield of biomass and value added products in microalgae. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology, and Molecular Biology*, 6(2), 77–85.
- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>
- Shabana, Y. M., Abdel-Fattah, G. M., Ismail, A. E., & Rashad, Y. M. (2008). Control of brown spot pathogen of rice (*Bipolaris oryzae*) using some phenolic antioxidants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 438–444.
- Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 7(APR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- Shahidi, F., & Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(8), 1527–1532. <https://doi.org/10.1021/jf00008a032>
- Sommer, T. R., Potts, W. T., & Morrissy, N. M. (1991). Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 94(1), 79–88. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90130-Y](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90130-Y)
- Squeo, G., Grassi, S., Paradiso, V. M., Alamprese, C., & Caponio, F. (2019). FT-IR extra virgin olive oil classification based on ethyl ester content. *Food Control*, 102, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.027>
- Steinbrenner, J., & Linden, H. (2001). Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology*, 125(2), 810–817. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.810>
- Sumner, A. K., Nielsen, M. A., & Youngs, C. G. (1981). Production and evaluation of pea protein isolate. *Journal of Food Science*, 46(2), 364–366. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04862.x>
- Taneja, A., & Singh, H. (2012). Challenges for the delivery of L long-chain n-3 fatty acids in functional foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 105–123. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101130>
- Tang, C. H., Ten, Z., Wang, X. S., & Yang, X. Q. (2006). Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8945–8950. <https://doi.org/10.1021/jf0619176>
- Timilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1276–1286.
- Torrissen, O., Tidemann, E., Hansen, F., & Raa, J. (1981). Ensiling in acid - A method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by-products and improve uptake of this pigment by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 26(1–2), 77–83. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(81\)90111-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(81)90111-3)

- Vakarelova, M., Zanoni, F., Lardo, P., Rossin, G., Mainente, F., Chignola, R., Menin, A., Rizzi, C. & Zoccatelli, G. (2017). Production of stable food-grade microencapsulated astaxanthin by vibrating nozzle technology. *Food Chemistry*, 221, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.085>
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van De Kamp, E., Rompelberg, C. J. M., & Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.08.007>
- Vershinin, A. (1999). Biological functions of carotenoids-diversity and evolution. *BioFactors*, 10(2–3), 99–104. <https://doi.org/10.1002/biof.5520100203>
- Villalobos-Castillejos, F., Cerezal-Mezquita, P., Hernández-De Jesús, M. L., & Barragán-Huerta, B. E. (2013). Production and stability of water-dispersible astaxanthin oleoresin from *Phaffia rhodozyma*. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(6), 1243–1251. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12083>
- Wang, Y., & Peng, J. (2008). Growth-associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1915–1922. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9692-8>
- Weiss, J., Takhistov, P., & McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71(9), 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x>
- Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M., & Ito, Y. (1990). Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids. I. Effect of dietary astaxanthin,  $\beta$ -carotene and canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture*, 87(3–4), 323–330. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90069-Y](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90069-Y)
- Yamashita, E. (2013). Astaxanthin as a medical food. *Functional Foods in Health and Disease*, 3(7), 254–258.
- Yan, C., & Zhang, W. (2014). Coacervation processes. In *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 125–137).
- Yuan, C., Jin, Z., & Xu, X. (2012). Inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: UV, FTIR,  $^1\text{H}$  NMR and molecular modeling studies. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 492–496. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.033>
- Zhang, D. H., & Lee, Y. K. (1997). Enhanced accumulation of secondary carotenoids in a mutant of the green alga, *Chlorococcum* sp. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 459–463. <https://doi.org/10.1023/A:1007902103419>
- Zhou, Q., Yang, L., Xu, J., Qiao, X., Li, Z., Wang, Y., & Xue, C. (2018). Evaluation of the physicochemical stability and digestibility of microencapsulated esterified astaxanthins using *in vitro* and *in vivo* models. *Food Chemistry*, 260(5), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.046>

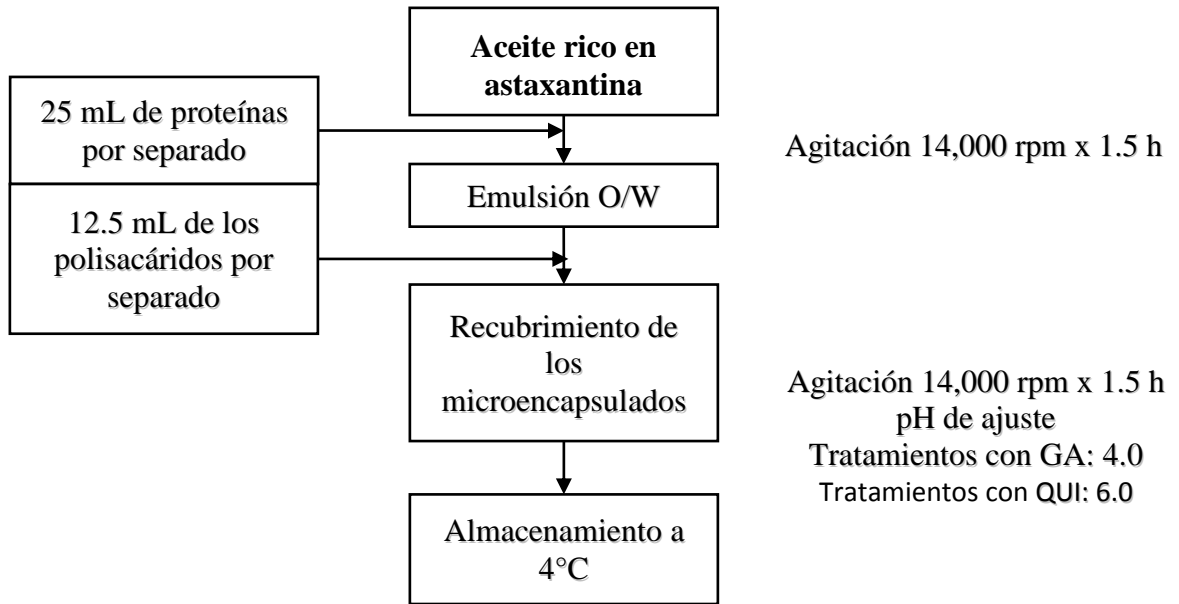
# Apéndices

Apéndice 1. Esquema para la preparación de las disoluciones de biopolímeros y el extracto de *H.*

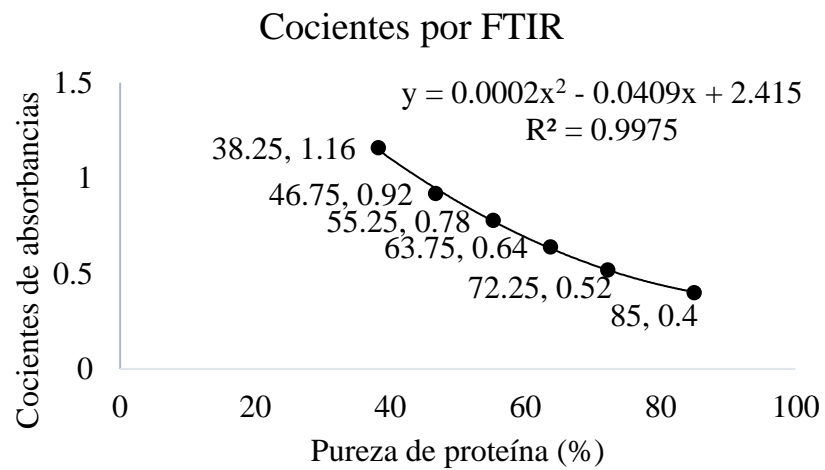
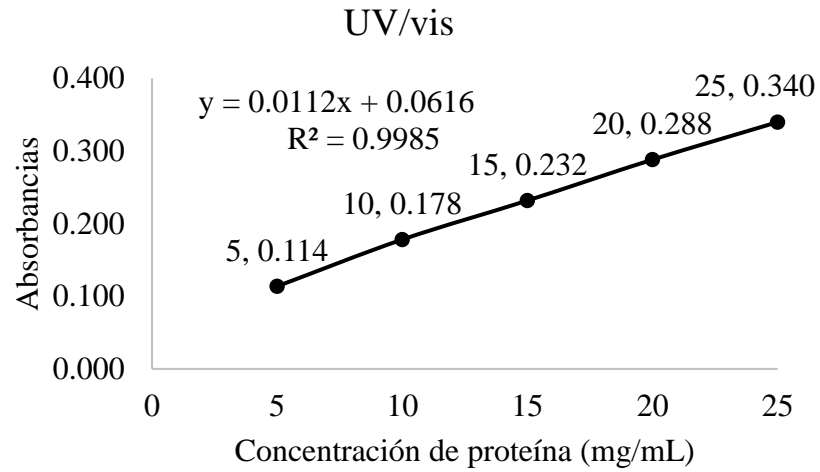
*pluvialis*



**Apéndice 2.** Esquema general para la obtención de las microcápsulas

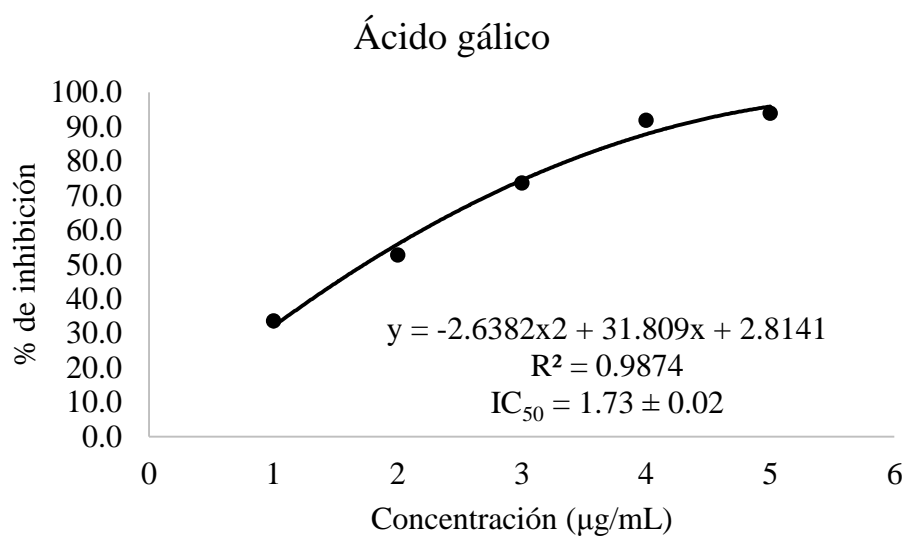
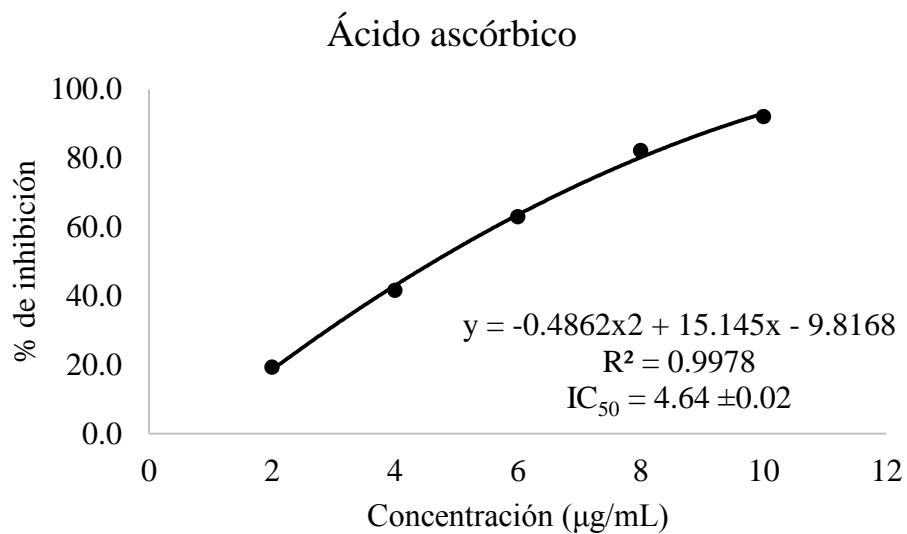


**Apéndice 3.** Curvas de calibración obtenidas por UV/vis e IR

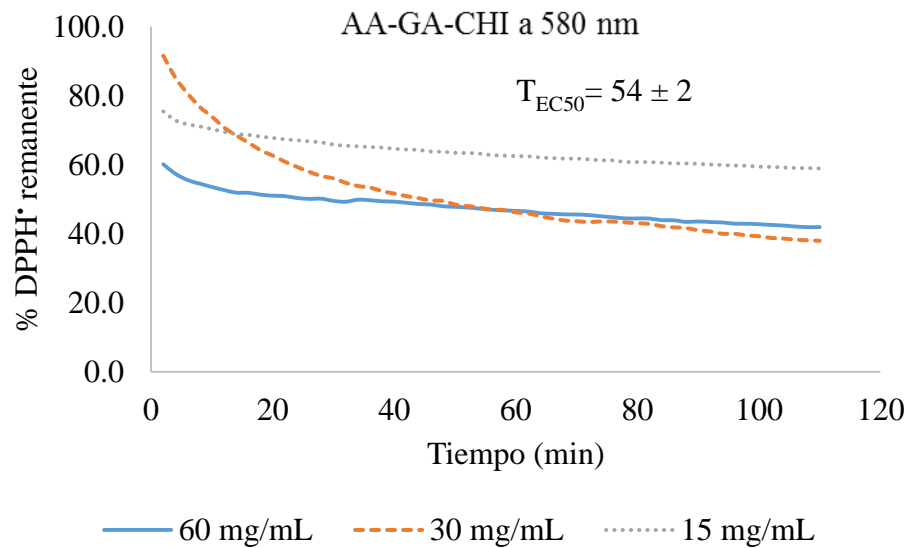
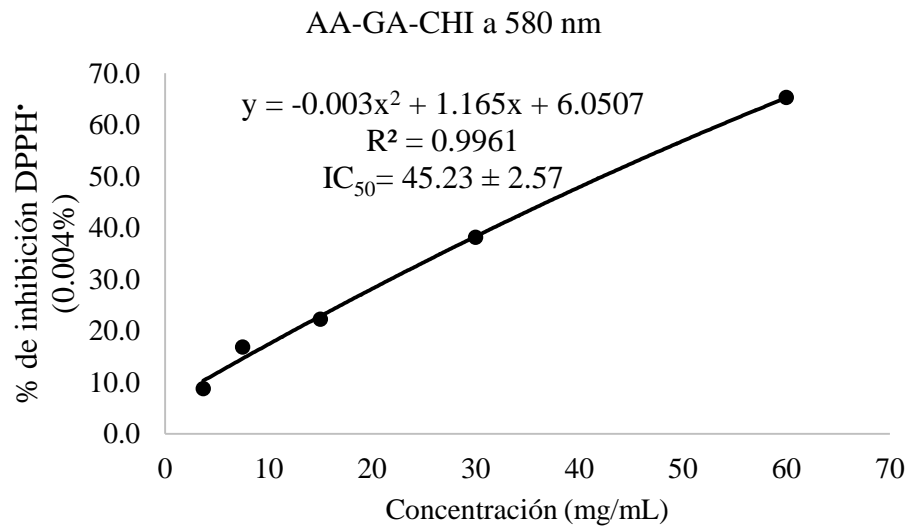


Estándares y muestra	% de proteína	Cocientes de absorbancia
Caseína-goma arábica	38.25	1.16
Caseína-goma arábica	46.75	0.92
Caseína-goma arábica	55.25	0.78
Caseína-goma arábica	63.75	0.64
Caseína-goma arábica	72.25	0.52
Caseína	85	0.4
Aislado proteico de cáñamo	94.3	0.33

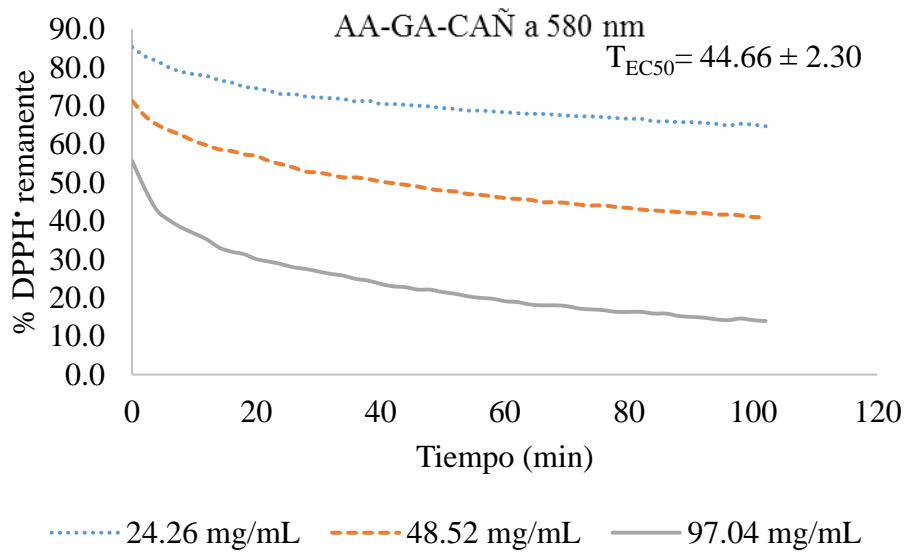
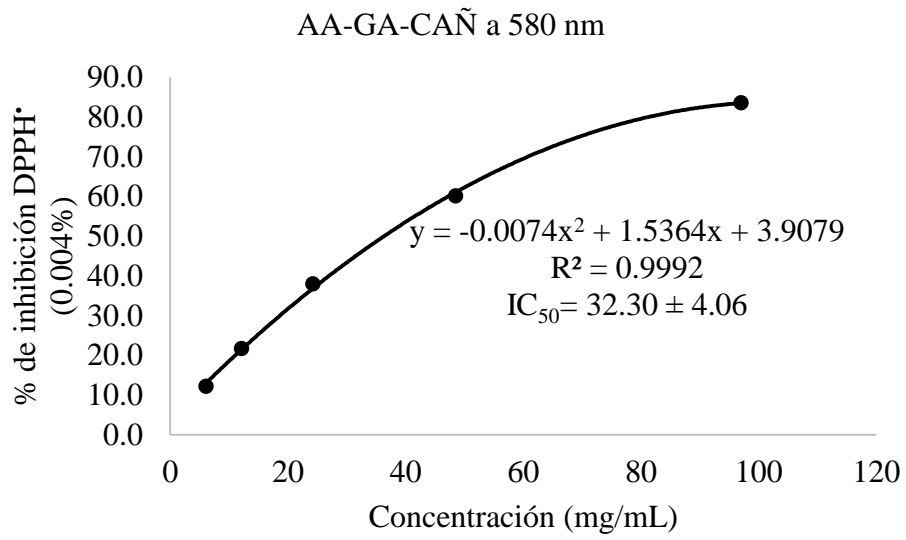
**Apéndice 4.** Curvas de calibración del ácido ascórbico y ácido gálico utilizados como controles para la determinación de la capacidad antioxidante frente al radical DPPH\*

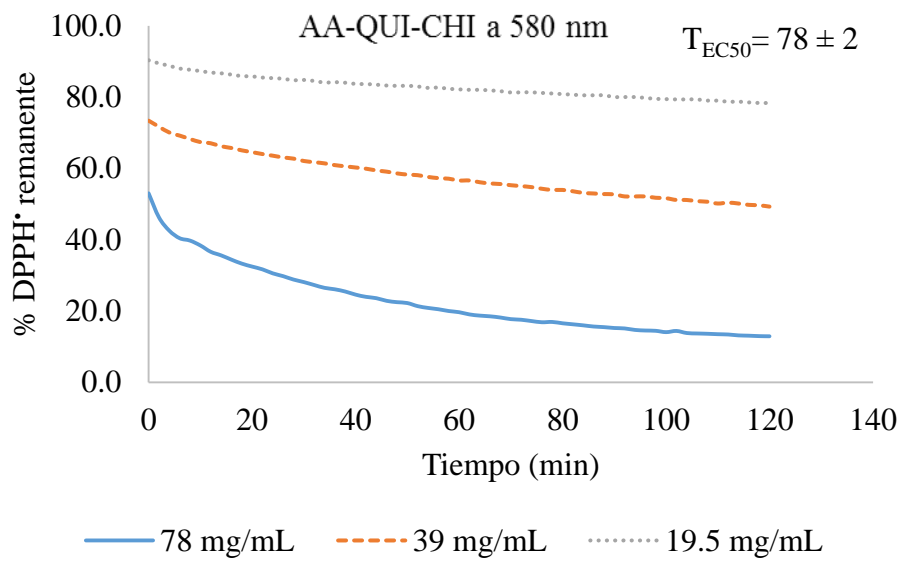
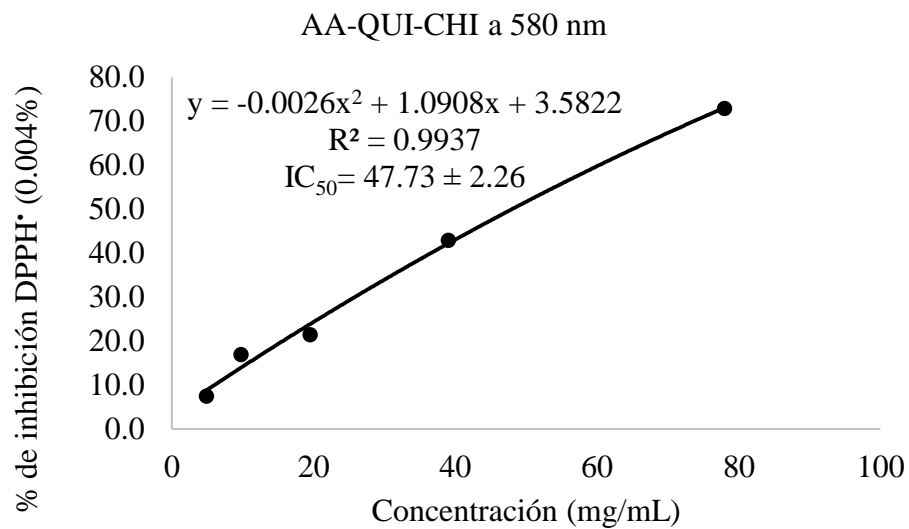


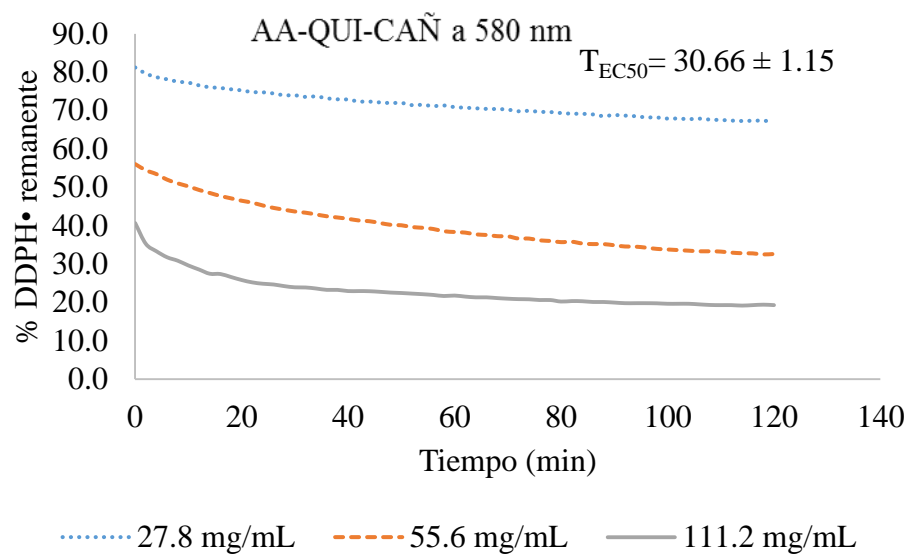
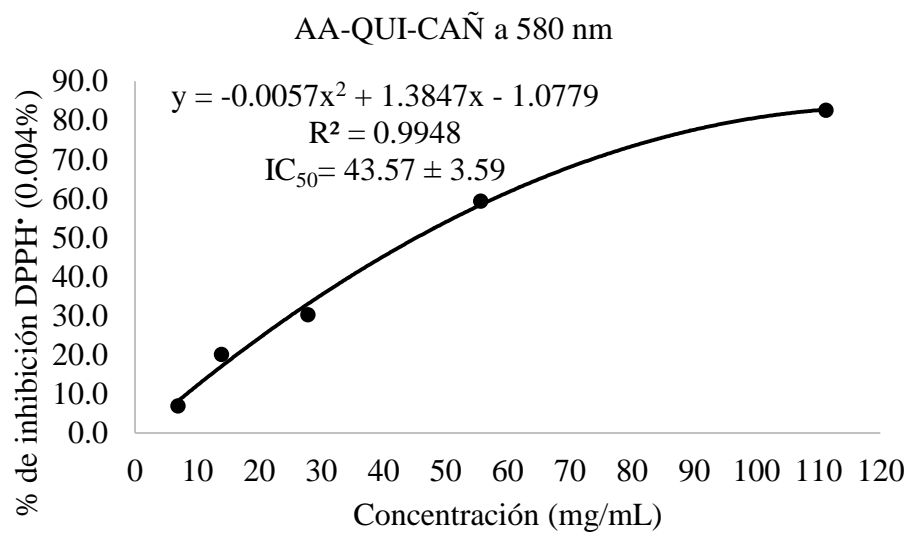
**Apéndice 5.** IC<sub>50</sub> y T<sub>EC50</sub> de los extractos obtenidos de los microencapsulados para la evaluación de la actividad antirradicalar frente al DPPH<sup>•</sup>











## Anexos

### Anexo 1. Métodos utilizados comúnmente para evaluar la capacidad/actividad antioxidante *in vitro*

Método	Mecanismo de reacción	Características
Poder de captación de radicales totales (TRAP)	TAH	El ensayo de TRAP implica el inicio de la peroxidación de lípidos, generando ROO• soluble en agua y es sensible a todos los antioxidantes conocidos que rompen la cadena.
Ensayo de la capacidad total de captación oxirradical (TOSCA)	TAH	Evalúa la inhibición oxidación de $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -ácido metiolbutírico (KMBA) por ROS. La actividad antioxidante se mide a través de la concentración de etileno, generada durante la descomposición de KMBA, relativo a una reacción de control monitoreada por cromatografía de gases por headspace (HS-GC).
Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)	TAH	El ensayo ORAC se basa en la inhibición del radical peroxilo iniciada por la descomposición térmica de compuestos azo como el AAPH.
Inhibición del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•)	TSE o TAH	Método colorimétrico basado en la medición de la capacidad antioxidante de captura del radical DPPH•.
Poder reductor férrico (FRAP)	TSE	Método colorimétrico que evalúa la reducción del complejo Fe <sup>3+</sup> a Fe <sup>2+</sup> .
Inhibición del catión radical 2, 2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS <sup>•+</sup> )	TSE o THA	Método colorimétrico para evaluar la descomposición de ABTS <sup>•+</sup> en presencia de un agente antioxidante.

Fuente: (Santos-Sánchez *et al.*, 2019)

**Anexo 2.** Bandas características de los materiales de barrera, aceite de oliva y astaxantina

<b>Asignación</b>		
<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Referencias</b>
1,600-1,700	Amida I (tensión C=O)	
1,480-1,580	Amida II (flexión N-H y tensión C-N)	(Mallamace <i>et al.</i> , 2014)
1,300-1,450	Amida III (modos vibratorios más complejos)	
	<b>Polisacáridos</b>	
1,000-1,200	Huella dactilar de carbohidratos	(Lawrie <i>et al.</i> , 2007)
	<b>Aceite de oliva extravirgen</b>	
1,748	Esteres	
3,005	Tensión del doble enlace Z	
2,924-2,853	Tensión simétrica y asimétrica de los grupos CH <sub>2</sub>	(Squeo <i>et al.</i> , 2019)
1,400-1,200	Flexión CH <sub>2</sub> y CH <sub>3</sub>	
	<b>Astaxantina</b>	
1,654	Tensión C=O	(Yuan <i>et al.</i> , 2012)
1,552	Tensión C=C	
974	Tensión C-C y C-H del sistema conjugado	



## Universidad Tecnológica de la Mixteca División de Estudios de Posgrado

### Declaración de Autenticidad y de No Plagio

Por el presente documento, yo Jerzain Guillermo Martínez Gómez identificado/a con el número de matrícula de estudiante 2019180002, egresado del posgrado **MAESTRÍA EN CIENCIAS: PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS** y autor de la tesis titulada: Bioaccesibilidad de microencapsulados de extractos de *Haematococcus pluvialis* ricos en astaxantina.

#### DECLARO QUE:

1. El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado íntegramente por el/la autor/a que lo suscribe, siendo resultado de mi trabajo personal, el cual no he copiado de otro trabajo, ni utilizado fórmulas, ni citas completas; así como ilustraciones sacadas de cualquier tesis, obra, artículo, etc. en versión digital o impresa. Caso contrario, menciono de forma clara y exacta su origen o autoría, tanto en el cuerpo del texto, figuras, cuadros, tablas u otros que tengan derechos de autor.
2. Declaro que el trabajo de investigación que pongo en consideración para evaluación no ha sido presentado anteriormente para obtener algún grado académico o título, ni ha sido publicado en sitio alguno.

Asimismo, me hago responsable ante la universidad o terceros, de cualquier irregularidad o daño que pudiera ocasionar por el incumplimiento de lo declarado. Sé que este compromiso de autenticidad y no plagio puede tener connotaciones éticas y legales. Por ello, en caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a lo dispuesto en las normas académicas que dictamine la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

Huajuapán de León, Oaxaca, 05 de noviembre de 2021.

Jerzain Guillermo Martínez Gómez  
Nombre

plag.es

CARGAR

Documentos

Mis órdenes

Corrección de pruebas

Eliminación de plagio

Tesis Jerzain.docx  
hace 8 minutos

Similitud

0%-9% 10%-20% 21% 100%

Desbloquee el informe completo e inspeccione las fuentes de plagio.

Ver Informe

Tesis Jerzain.docx  
hace 2 horas

Similitud

0%-9% 10%-20% 21% 100%

Desbloquee el informe completo e inspeccione las fuentes de plagio.

Ver Informe