



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I
DEL MEDI NATURAL**

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



DESARROLLO DE UN SISTEMA DE MEDIDA DE LA LIBERACIÓN DE COMPUESTOS ENCAPSULADOS EN MATRIZ DE ALGINATO CÁLCICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE RADIOFRECUENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: Anna Villalba Gimeno

TUTORES: Dra. Marta Castro Giráldez

Dr. Pedro José Fito Suñer

DIR. EXPERIMENTAL: Juan Ángel Tomás Egea

Curso académico 2018/2019, Valencia



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I
DEL MEDI NATURAL**

Nombres y apellidos: Anna Villalba Gimeno

Título del TFG: Desarrollo de un sistema de medida de la liberación de compuestos encapsulados en matriz de alginato cálcico por espectrofotometría de radiofrecuencia

Lugar de realización: Instituto Universitario de Ingeniería de los Alimentos para el Desarrollo (IUIAD-UPV).

Titulación: Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Tutores: Dra. Marta Castro Giráldez y Dr. Pedro José Fito Suñer.

Director experimental: Juan Ángel Tomás Egea

Fecha lectura: septiembre 2019



Resumen

La creciente preocupación de la industria alimentaria de suministrar productos alimenticios que suplan las necesidades digestivas debido a los problemas existentes relacionados con la absorción, hace que la investigación y el empleo de otras técnicas como es la microencapsulación tengan una relevante importancia y jueguen un papel esencial. Se encapsuló hierro electrolítico con vitamina C en matriz de alginato cálcico mediante goteo controlado por gelatinización iónica. Con el fin de cuantificar la liberación de compuestos encapsulados se ha diseñado una cámara de medida de propiedades dieléctricas mediante espectrofotometría en radiofrecuencia. De esta manera es posible cuantificar la presencia de compuestos con elevada fuerza iónica en medio líquido (disolución de ácido clorhídrico y agua a pH de estómago y de duodeno), trabajando en el rango de la radiofrecuencia. Se han determinado las propiedades dieléctricas de la liberación del hierro cuando se simulan las condiciones gástricas en la cámara de determinación a temperatura controlada.

El sistema de monitorización ha sido capaz de determinar tanto los contenidos en vitamina C como de hierro electrolítico, además ha sido posible cuantificar la velocidad de liberación de encapsulaciones de hierro y vitamina C en matriz de alginato cálcico.

Palabras clave: Encapsulación, radiofrecuencia, digestión



Abstract

The growing concern of the food industry to produce new food products to supply products without digestive absorption problems, due to existing problems related to absorption of some electrolytes, makes the research and use of other techniques such as microencapsulation have a relevant importance and play an essential role in the design of new food products. Electrolytic iron was encapsulated with vitamin C in a calcium alginate matrix by dripping controlled by ionic gelation. In order to quantify the release of encapsulated compounds, a chamber for measuring dielectric properties has been designed by radiofrequency spectrophotometry. In this way it is possible to quantify the presence of compounds with high ionic strength in liquid medium (hydrochloric acid solution and water at stomach and duodenum pH), working in the radiofrequency range. The dielectric properties of iron release have been determined when gastric conditions are simulated in the chamber of determination in a temperature controlled chamber. The monitoring system has been able to determine both the contents of vitamin C and electrolytic iron, it has also been possible to quantify the rate of release of encapsulations of iron and vitamin C in a calcium alginate matrix.

Palabras clave: Encapsulation, radiofrequency, digestion.



Resum

La creixent preocupació de la indústria alimentària per subministrar productes alimentaris que reemplacen les necessitats digestives a causa dels problemes existents relacionats amb l'absorció, fa que la investigació i l'ocupació d'altres tècniques com és la microencapsulació tinguen una rellevant importància i juguen un paper essencial. Es va encapsular ferro electrolític amb vitamina C en una matriu d'alginat càlcic per mitjà de goteig controlat mitjançant la tècnica de gelatinització iònica. A fi de quantificar l'alliberament dels compostos encapsulats s'ha dissenyat una cambra de mesura de propietats dielèctriques per mitjà d'espectrofotometria en radiofreqüència. D'aquesta manera és possible quantificar la presència de compostos amb elevada força iònica al medi líquid (dissolució d'àcid clorhídric i aigua a pH d'estómac i de duodè) , treballant en el rang de la radiofreqüència. S'han determinat les propietats dielèctriques de l'alliberament del ferro quan se simulen les condicions gàstriques en la cambra de determinació a temperatura controlada. El sistema de monitorització ha sigut capaç de determinar tant els continguts en vitamina C com de ferro electrolític, a més ha sigut possible quantificar la velocitat d'alliberament de les encapsulacions de ferro i vitamina C en una matriu d'alginat càlcic

Paraules clau: Encapsulació, radiofreqüència, digestió



ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	1
1.2	ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DIGESTIVO	2
1.2.1	<i>PROBLEMAS DIGESTIVOS EN LA ACTUALIDAD</i>	3
1.3	COMPUESTOS ACTIVOS QUE SE UTILIZAN PARA SUPLIR DEFICIENCIAS DIGESTIVAS CONOCIDAS	3
1.3.1	<i>EL HIERRO</i>	4
1.3.2	<i>LA VITAMINA C</i>	5
1.4	PROCESOS DE MICROENCAPSULACIÓN. TIPOS, PROCEDIMIENTOS, OPCIONES DE FUTURO	6
1.4.1	<i>FUNDAMENTOS DE LA ENCAPSULACIÓN</i>	6
1.4.2	<i>GELIFICACIÓN IÓNICA</i>	7
1.4.3	<i>IMPORTANCIA DE LA ENCAPSULACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.</i>	8
1.5	PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA ESPECTROFOTOMETRIA	8
1.5.1	<i>FENÓMENOS DIELECTRICOS EN SISTEMAS ALIMENTARIOS</i>	10
1.6	FUNDAMENTOS DE LA IMPRESIÓN 3D	10
1.6.1	<i>MATERIALES DE IMPRESIÓN 3D</i>	11
2.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	11
2.1	OBJETIVOS	11
2.2	PLAN DE TRABAJO	12
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1	MATERIAS	12
3.1.1	<i>BUFFER</i>	12
3.1.2	<i>REACTIVOS</i>	12
3.1.3	<i>DISOLUCIONES DE DIFERENTES pH</i>	12
3.1.4	<i>MATERIALES DE IMPRESIÓN 3D</i>	12
3.2	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	13
3.2.1	<i>PROTOCOLO DE CALIBRACIÓN Y DE MEDIDA</i>	13
3.2.2	<i>PROTOCOLO DE IMPRESIÓN</i>	14
3.2.3	<i>PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE CÁPSULAS DE ALGINATO CÁLCICO ENCAPSULANDO PROTEINSUCCINILATO FÉRRICO Y ÁCIDO ASCÓRBICO</i>	15
3.2.4	<i>PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE EXPANSIÓN DE LAS CÁPSULAS EN LOS DISTINTOS MEDIOS</i>	16
3.2.5	<i>DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN</i>	17
3.2.6	<i>MASA</i>	17
4.	RESULTADOS	17
4.1	DISEÑO DEL SISTEMA DE MEDIDA	17
4.2	CALIBRACIÓN DEL SISTEMA DE MEDIDA; DISOLUCIONES ESTÁNDAR	22
4.3	EXPANSIÓN DEL ENCAPSULADO, PROCESO DE REHIDRATACIÓN	23
4.4	ANÁLISIS DE LIBERACIÓN DE COMPUESTO ENCAPSULANTE	25
5.	CONCLUSIONES	29
6.	BIBLIOGRAFÍA	29

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ingesta de hierro recomendada (Adaptada de Codwat et al., 2019)	4
---	---

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del aparato digestivo. (Adaptado de Niddk, 2019)	2
Figura 2. Representación esquemática de la absorción de hierro hemídico y no hemídico que se da en un enterocito.....	5
Figura 3. Representación esquemática de las diferentes conformaciones en las cápsulas. (Adaptado de Đorđević et al., 2014).	6
Figura 4. Estructura del alginato de sodio. a. monómeros: residuos manuronato y guluronato; b. posibles combinaciones entre los residuos en conformación silla; c. distribuciones de bloques posibles (Adaptado de Santagapita, 2010).	7
Figura 5. Esquema representativo del proceso de entrecruzamiento del alginato-Ca(II), a. coordinación del ión Ca^{2+} dentro de la cavidad creada por las cadenas de bloques de guluronato (G); b. dímero con estructura de “caja de huevo”; c. asociación lateral de más cadenas y gelificación. (•) representan a los átomos de oxígenos posiblemente involucrados en la coordinación con los iones (•) Ca^{2+} (Adaptado de Fang et al., 2007).....	8
Figura 6. Representación de la constante dieléctrica y el factor de pérdidas en sistemas biológicos en función de la frecuencia (Adaptado de Castro-Giráldez et al., 2010c).....	10
Figura 7. Diseño del sensor. a) Tanque de liberación y b) Carcasa externa.....	15
Figura 8. Impresora 3D empleada para el diseño del sensor.....	15
Figura 9. Esquema general del proceso de elaboración de cápsulas. A) Variador de Frecuencia; B) Disolución de alginato de sodio y el reactivo que se desee encapsular; C) Bomba peristáltica; D) Soporte del tubo y aguja; E) disolución de cloruro cálcico; F) Agitador magnético.....	16
Figura 10. a) Cápsulas de alginato de calcio y proteínsuccinilato férrico húmedas; b) Cápsulas de alginato de calcio y proteínsuccinilato férrico secas.....	16
Figura 11. Crisol con la fase líquida y cápsula de alginato de calcio-proteínsuccinilato férrico en el centro de este.....	17
Figura 12. Montaje para determinar la cinética de liberación. A) Ordenador que recoge los datos del analizador de impedancias; B) Carcasa y cámara de liberación y C) Analizador de impedancias.....	18
Figura 13. a) Diferentes diseños de tanques de medida extrusionados con Nylon (blanco), ABS (rojo) y PLA (gris y las cuatro primeras de blanco). b) Diferentes diseños de carcasas externas extrusionadas con PLA.....	19
Figura 14. a) Planta del tanque de medida. b) Alzado del tanque de medida. c) Sección del perfil del tanque de medida. Las cotas de toda la figura están en centímetros.....	20

Figura 15. a) Planta de la carcasa exterior. b) Sección del alzado del tanque de medida. Las cotas de toda la figura están en centímetros.....	21
Figura 16. Esquema del campo eléctrico generado en el medio donde se van a liberar los compuestos encapsulados. Las cotas están en centímetros.....	22
Figura 17. a) Foto del montaje final del sensor. b) Esquema del montaje donde:  son las placas de tantalio,  son las placas de cobre,  es el adhesivo de cobre,  es la goma elástica y  son las soldaduras de estaño que unen el circuito con el analizador de impedancias.....	22
Figura 18. Curva de calibrado de concentración de L (+)-Ácido ascórbico.....	23
Figura 19. Curva de calibrado de concentración de ion férrico (Fe^{3+})	23
Figura 20. Secuencia de hinchamiento de una capsula de proteínsuccinilato férrico a pH 4,7 a los tiempos: A)0 min; B) 0,367 min; C)6min; D)30 min.	24
Figura 21. Secuencia de hinchamiento de una capsula de L (+)-Ácido ascórbico a pH 4,7 a los tiempos a)0; b)0,6 min; c)4 min; d)30 min.	24
Figura 22. Análisis del hinchamiento de los encapsulados vacíos () , de ácido ascórbico () y sal férrica () a pH 3, donde a) representa la curva de expansión y b) el flujo neto de fase líquida que se introduce en cada encapsulado.....	25
Figura 23. Análisis del hinchamiento de los encapsulados vacíos () , de ácido ascórbico () y sal férrica () a pH 4,7, donde a) representa la curva de expansión y b) el flujo neto de fase líquida que se introduce en cada encapsulado.....	25
Figura 24. Análisis del hinchamiento de los encapsulados vacíos () , de ácido ascórbico () y sal férrica () a pH 7, donde a) representa la curva de expansión y b) el flujo neto de fase líquida que se introduce en cada encapsulado.....	25
Figura 25. Evolución de la liberación de ácido ascórbico donde a) es la fracción másica de ácido ascórbico de la fase externa a las cápsulas y b) el flujo molar de ácido ascórbico, ambos en un medio de pH 3; c) es la fracción másica de ácido ascórbico de la fase externa a las cápsulas y d) el flujo molar de ácido ascórbico, ambos en un medio de pH 4,7; e) es la fracción másica de ácido ascórbico de la fase externa a las cápsulas y f) el flujo molar de ácido ascórbico, ambos en un medio de pH 7.....	26
Figura 26. Evolución de la liberación de ion férrico donde a) es la fracción másica de ion férrico de la fase externa a las cápsulas y b) el flujo molar de ion férrico, ambos en un medio de pH 3; c) es la fracción másica de ion férrico de la fase externa a las cápsulas y d)el flujo molar de ion férrico, ambos en un medio de pH 4,7; e) es la fracción másica de ion férrico de la fase externa a las cápsulas y f) el flujo molar de ion férrico, ambos en un medio de pH 7.....	27
Figura 27. Esquema de fuerzas impulsoras sobre el transporte.....	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La población actual está en continuo crecimiento y la industria agroalimentaria se enfrenta al gran reto de conseguir abastecer con alimentos a toda esa población, con la finalidad de mantener de forma estable todos los alimentos hasta su posterior consumo. Del mismo modo, no solo basta con mantenerlos de forma estable e inalterable, sino que incide también en su correcta absorción en el sistema gastrointestinal (FAO, 2019).

A día de hoy, la digestión presenta ciertos problemas de absorción, algunos de ellos están provocados por enfermedades, alergias o intolerancias frente a ciertos compuestos, y otros por el funcionamiento del sistema digestivo. Hay nutrientes que se absorben peor por la forma en la que estos se encuentran o simplemente por su anticipada degradación que estos sufren y, por consiguiente, su mal absorción. Por ello, las investigaciones de los últimos años que tienen como objetivo solucionar este problema han desarrollado y adaptado técnicas enfocadas a mejorar la digestión y, por tanto, la dieta de la población. Existen diversas técnicas para mejorar el problema de absorción, una de ellos, consiste en la encapsulación de compuestos bioactivos alimenticios que son introducidos en una matriz polimérica para impedir su pérdida, protegerlos de las posibles reacciones que sufren con otros compuestos o frenar reacciones de oxidación a y conseguir así, suministrarlos de manera eficiente en el lugar específico donde efectuará su absorción (Ezhilarasi et al., 2013). La baja estabilidad de dichos componentes durante el procesado o almacenado de los alimentos y la baja biodisponibilidad de éstos debidos a cambios repentinos en la acidez del medio o interacciones con otros componentes pueden afectar negativamente al grado absoritivo. Todas estas exigencias han potenciado el empleo de la técnica de encapsulación para solventar dichos problemas (Salomen et al., 2014).

Si bien es cierto que la presencia de compuestos bioactivos en la dieta está relacionada con multitud de beneficios, su repercusión sobre la salud depende del estado en el que llegan al torrente sanguíneo, para ello es vital conocer cómo se liberan al exterior (bioaccesibilidad) y como atraviesan la barrera intestinal (bioabsorción) para ser aprovechado por el organismo (Parada et al., 2007). La mejor forma de determinar la liberación de estos compuestos consiste en someter al mismo al propio proceso digestivo y evaluar los cambios que experimentan en las diferentes fases del sistema digestivo.

La espectrofotometría ha experimentado avances importantes en los últimos años como herramienta de monitorización no destructiva de procesos (Castro-Giráldez et al., 2010), pudiendo identificar y cuantificar compuestos químicos en sistemas alimentarios. Esta técnica se basa en hacer circular un flujo de fotones a través de un medio, en un rango de frecuencia determinado, y analizar la interacción de estos fotones con el medio. La permitividad es la propiedad física que describe esta interacción, la cual se puede relacionar con diversas características del medio (Castro-Giráldez et al., 2010).

Por tanto, el objetivo del trabajo de investigación es el desarrollo de una herramienta de monitorización de la liberación de los compuestos encapsulados basada en la espectrofotometría, concretamente en el rango de la radiofrecuencia.

1.2 ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DIGESTIVO.

Uno de los procesos más complejos y esenciales para la salud humana es la digestión y tiene como objetivo incorporar, descomponer y absorber los líquidos y alimentos ingeridos y transformarlos en nutrientes, es decir, sustancias químicamente más sencillas y fáciles de absorber. En este proceso intervienen diferentes tipos de enzimas.

Está formado por el tracto digestivo, un tubo abierto y hueco que recorre el cuerpo desde la boca hasta el ano y una serie de órganos asociados (glándulas salivares, hígado, páncreas y la vesícula biliar) con funciones diversas que ayudarán a descomponer los alimentos (M. Zorn, 2017). Las diversas partes del sistema digestivo, mostrado en la Figura 1, están especializadas para realizar las funciones de ingestión, digestión y excreción. Con este proceso el organismo es capaz de incorporar al torrente sanguíneo todos los nutrientes necesarios para un correcto funcionamiento del organismo. El proceso digestivo a su vez se divide en tres fases diferenciadas: la fase oral, la fase gástrica y la fase intestinal.

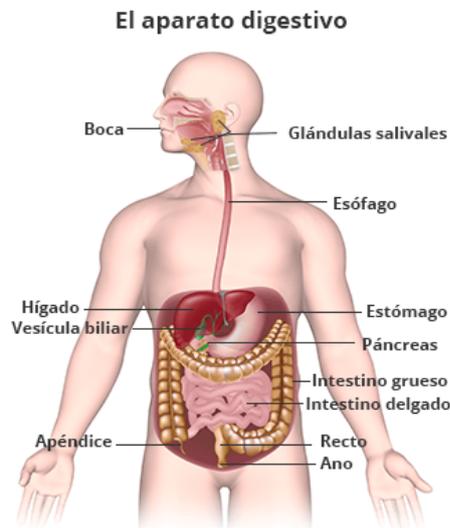


Figura 1. Esquema del aparato digestivo. (Adaptado de Niddk, 2019).

La digestión empieza por la fase oral y en esta fase los alimentos se incorporan al organismo por la boca y junto con la saliva se crea el bolo alimenticio que avanza a lo largo del tubo digestivo por acción de la gravedad y del peristaltismo. En comparación con las fases siguientes esta fase dura poco tiempo.

El bolo alimenticio atraviesa la faringe por el mecanismo de la deglución hasta llegar al estómago. En el estómago el bolo alimenticio pasa a llamarse quimo y entra en contacto con el jugo gástrico, rico en ácido clorhídrico, agua y electrolitos. La alta concentración en ácido clorhídrico hace que el pH descienda de manera brusca de 5 hasta 3, creando un ambiente idóneo para la acción de las tres enzimas gástricas. La pepsina es la responsable de la degradación de las proteínas. La α -amilasa, segregada junto con la saliva en la fase oral, es la encargada en degradar el almidón y su acción finaliza cuando se produce la bajada brusca de pH. Finalmente, la lipasa gástrica, es la encargada de descomponer grasas.

La verdadera digestión de los alimentos se produce en el intestino (delgado y grueso) y es gracias a la participación de la bilis, segregada por la vesícula biliar, formada por amilasa, tripsina

y lipasa. El intestino delgado está fraccionado en el duodeno, yeyuno e íleon y será en este lugar donde se absorberán, gracias a las microvellosidades, la mayor parte de los nutrientes por transporte activo, difusión simple o facilitada.

La primera parte del intestino, el duodeno, es la encargada de recibir el quimo proveniente del estómago y seguir con la digestión de éste hasta su posterior absorción. En el duodeno el bicarbonato segregado, neutraliza el quimo para que las enzimas sigan realizando la descomposición de las macromoléculas. El yeyuno es la parte intermedia del intestino y es la encargada de absorber los nutrientes digeridos en el duodeno como son los hidratos de carbono, aminoácidos y vitaminas. El resto de nutrientes (minerales, agua y sales) son absorbidos e incorporados al organismo en el íleon.

El proceso digestivo finaliza con la evacuación por el esfínter anal de los restos que no han sido digeridos. (Boticario y Cascales, 2012).

1.2.1 PROBLEMAS DIGESTIVOS EN LA ACTUALIDAD

La relación existente entre nutrición y salud está directamente relacionada, puesto que muchas enfermedades digestivas radican en la mala ingesta de nutrientes o un mal empleo de estos nutrientes en el organismo, ya que pueden ser ingeridos de manera correcta con las cantidades requeridas, pero por causas ajenas, no son absorbidos de manera eficaz en el intestino delgado y, en consecuencia, causan una serie de patologías derivadas directamente de esta malabsorción (Sotillos et al., 2000). La malabsorción puede ocurrir de dos formas, por una parte, si ésta interfiere en la digestión de los alimentos, y este proceso es debido en gran parte a una producción insuficiente de enzimas pancreáticas, como puede ser la falta de lactasa y, en consecuencia, padecer intolerancia a la lactosa (Luthy et al., 2017). Por otra parte, puede también estar debida a la existencia de un trastorno que interfiere en la absorción de los nutrientes, como ocurre con el hierro, siendo éste el trastorno nutricional más extendido y generalizado a nivel mundial tanto en países desarrollados como en los no desarrollados (Blanco-Rojo et al., 2018; Nikaki et al., 2016).

En la actualidad, la encapsulación de compuestos bioactivos es una vía de investigación para solucionar estos problemas de absorción. Para ello, se ha de tener en consideración las condiciones que se dan a lo largo del tubo digestivo (pH, temperatura...) por el cual se desplazan las cápsulas, así como las características que ofrecen los recubrimientos a la supervivencia y estabilidad del compuesto encapsulado, ya que cada uno se digiere bajo unas condiciones determinadas.

1.3 COMPUESTOS ACTIVOS QUE SE UTILIZAN PARA SUPLIR DEFICIENCIAS DIGESTIVAS CONOCIDAS.

Los nutrientes pueden clasificarse en función de la cantidad en la que se encuentran en los alimentos, micronutrientes y macronutrientes, el organismo necesita un mayor aporte de macronutrientes que de micronutrientes para funcionar de manera eficiente. Los macronutrientes o también conocidos como nutrientes suministradores de energía, salvo el agua, se clasifican en los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas. Los micronutrientes se

abarcan los minerales y las vitaminas, estos son los encargados de facilitar la producción de muchas reacciones químicas que se dan en el organismo, sin aporte de energía (FAO, 2019).

Las vitaminas se encargan de realizar funciones muy específicas en el cuerpo y son esenciales para mantener la salud del individuo. Los minerales, en forma de ion, se clasifican en dos grupos, los macro-minerales cuyo requerimiento en el organismo es mayor (calcio, potasio, hierro, sodio y magnesio) y los micro-minerales (cobre, zinc, cobalto, cromo y flúoruro).

1.3.1 EL HIERRO

El hierro es un componente esencial en el cuerpo humano ya que interviene en numerosas funciones como puede ser el transporte de oxígeno a todos los tejidos de organismo, ofrece protección a las células frente a ataques nocivos producidos por radicales libres o produce energía. Este macro-mineral no se sintetiza en el organismo por lo que es imprescindible incluirlo en la dieta a fin de que sea absorbido de manera correcta y poder conseguir así, la ingesta de hierro diaria recomendada, siendo esta la mostrada en la Tabla 1.

Hombres ≥ 19 años	8,7 mg
Mujeres 19-50 años	14,8 mg
Mujeres ≥ 50 años	8,7 mg

Tabla 1. Ingesta de hierro recomendada (Adaptada de Codwat et al., 2019)

El hierro se puede encontrar en la dieta en dos formas, como hierro hemínico u orgánico o como hierro no hemínico o inorgánico. El hierro hemínico es el que se asocia a la hemoglobina y la mioglobina contenida en el tejido animal, y su absorción es mayor respecto a la forma no hemo, ésta se presenta en forma de dos valencias – hierro reducido (Fe^{+3}) y hierro oxidado (Fe^{+2}) y sólo pueden ser absorbidas en el duodeno (Conway y Henderson, 2019).

1.3.1.1 METABOLISMO DEL HIERRO

El ser humano incorpora de forma mayoritaria hierro no hemínico, sin embargo, la absorción y biodisponibilidad de éste resulta más problemática que la del hierro hemínico ya que su absorción puede verse interferida por otros factores nutricionales. El hierro no hemínico debe ser solubilizado y reducido, pasando de Fe^{+3} a Fe^{+2} , esta reducción se inicia en el sistema digestivo con los jugos gástricos y, además, existen diversas especies químicas como son los antioxidantes que facilitan dicha absorción como puede ser la vitamina C o la histidina (Bowman y Russell, 2003).

La tasa de absorción y liberación del hierro dependen del sistema de homeostasis del hierro que está regulado por la hormona hepcidina, encargada de controlar, distribuir y regular el metabolismo del hierro (Drakesmith et al., 2019). La absorción del hierro se da en el duodeno y yeyuno y es llevada a cabo por los enterocitos, principalmente por el transportador DMT1 (para hierro no hemínico) y por el transportador HCP1 (para el hierro orgánico) (Domenico et al., 2008). La enzima citocromo B reductasa duodenal (DCytB) localizada en las paredes del intestino es la encargada de llevar a cabo la reducción del hierro. El hierro reducido llega al citoplasma celular mediante el transportador DMT1 (García-Rosolen et al., 2010), donde podrá ser almacenado (ferritina) o transportado por la transferrina al torrente sanguíneo (Figura 2).

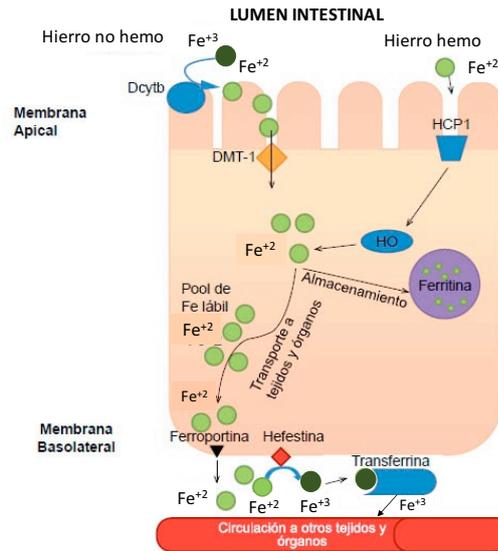


Figura 2. Representación esquemática de la absorción de hierro hemídico y no hemídico que se da en un enterocito.

La deficiencia de hierro es una de las deficiencias más extendidas en el planeta, especialmente en las mujeres y esto es debido en gran parte a la anemia, ésta se puede padecer como resultado de una mala ingesta de hierro caracterizada por un consumo inferior de hierro necesario o por cuando se produce una excesiva pérdida de sangre en situaciones tales como la menstruación (Pettit et al., 2011). La anemia se caracteriza por tener una concentración de hemoglobina inferior a 120 g/Litro en mujeres y una cantidad inferior de 130 g/Litro en hombres, cuando se presentan estos valores de hemoglobina, empiezan a ser visibles los síntomas característicos de esta afección como son el cansancio, mareos, cefaleas, trastornos visuales, trastornos digestivos, sequedad de la piel etc. (Dickson y Brookes, 2019).

1.3.2 LA VITAMINA C

El ácido ascórbico, conocido como vitamina C, es una vitamina hidrosoluble que cumple numerosas funciones en el organismo destacando entre ellas el poder antioxidante, el cual protege a las células del ataque de los radicales libres (especie química generada por el organismo cuando descompone alimentos). La vitamina C contribuye en la mejora de la absorción de hierro, sobre todo en alimentos cuya procedencia es la vegetal como pueden ser las lentejas o las espinacas.

La deficiencia de vitamina C está directamente relacionada con el escorbuto y cuyos síntomas son los siguientes: gingivitis, hemorragias cutáneas o anemia. El escorbuto puede ser mortal si no es tratado de manera correcta. Sin embargo, un exceso de vitamina C puede acarrear graves consecuencias en niños ya que causa hiperoxaluria, es decir, acumulación excesiva de oxoato cálcico (FAO, 2019).

1.4 PROCESOS DE MICROENCAPSULACIÓN. TIPOS, PROCEDIMIENTOS, OPCIONES DE FUTURO.

1.4.1 FUNDAMENTOS DE LA ENCAPSULACIÓN

La encapsulación se puede definir como el proceso en el cual un compuesto de interés es recubierto o atrapado en una matriz con carácter protector (Jiménez et al., 2015), suficientemente resistente y estable para evitar la desintegración de la misma. Las cápsulas pueden presentar diferentes estructuras básicas que dependerán, tanto de las técnicas, como de los materiales (Figura 3). Las técnicas de encapsulación se pueden llevar con diferentes métodos, los cuales pueden generar nano (cuando son inferiores a 1 μm), micro (cuando se encuentran entre 1 y 5000 μm) o macro (cuando superan los 5000 μm) cápsulas dependiendo del tamaño (King, 1995).

La encapsulación puede solucionar algunos problemas tecnológicos como pueden la protección de ciertos compuestos bioactivos para mejorar su estabilidad y biodisponibilidad (Aguirre Calvo y Santagapita, 2016). Así como la preservación de la integridad de los componentes para evitar la producción de sabores no deseables derivados de la degradación de estos.

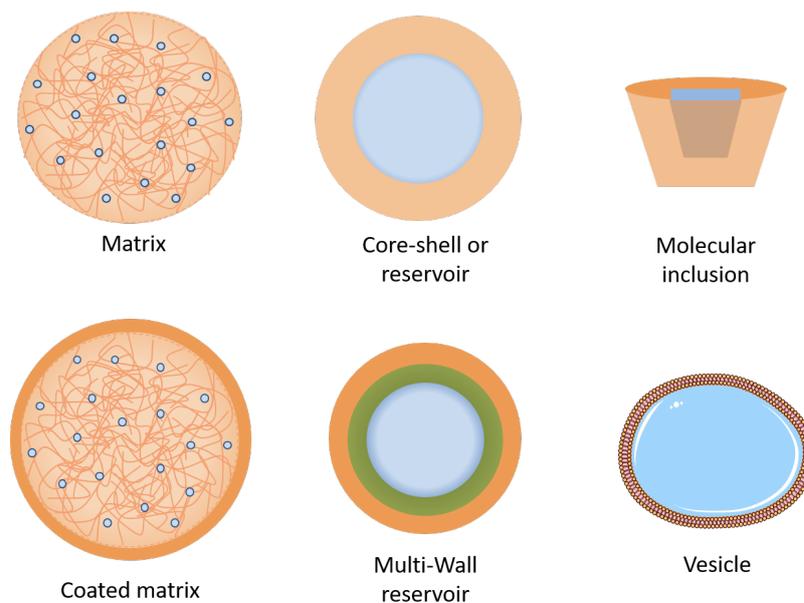


Figura 3. Representación esquemática de las diferentes conformaciones en las cápsulas. (Adaptado de Đorđević et al., 2014).

Las principales técnicas de encapsulación son el spray drying, la gelificación iónica, la coacervación mediante liposomas y la liofilización o electrospinning. Estas técnicas comentadas anteriormente, cumplen con todos los requisitos necesarios para asegurar la correcta llegada de los compuestos bioactivos al sitio de absorción del mismo modo, también evitan la entrada de compuestos indeseables al interior de las cápsulas que pueden llegar a alterar o degradar su contenido interior (Gibbs et al., 1999).

1.4.2 GELIFICACIÓN IÓNICA

La gelificación iónica es una de las técnicas más empleadas para conseguir microcápsulas debido a su sencillez y rapidez (Aguirre Calvo y Santagapita, 2016). La técnica consiste en gotear una solución acuosa de alginato sódico en la que se encuentra suspendida el compuesto a encapsular, sobre una solución de cloruro cálcico con agitación constante optimizada, para así obtener estructuras esféricas. Cuando la gota de alginato sódico entra en contacto con el calcio, se origina la gelificación instantánea de la misma, formándose una membrana insoluble en agua de alginato cálcico, pero al mismo tiempo permeable (Gombotz y Wee, 2012).

Las cápsulas más utilizadas son las de alginato de calcio por su sencillez de preparación a escala de laboratorio y por sus óptimas propiedades de gelación en presencia de cationes divalentes como el calcio (Ca^{2+}) (Aguirre Calvo et al., 2017). A nivel estructural, el alginato de sodio consiste en polímeros lineales compuestos de proporciones variantes de enlaces de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G). El polímero consiste en regiones de bloques homopoliméricos de ácido manurónico (MMMM) y de ácido gulurónico (GGGG) junto con secuencias alternas (M-G-M-G) (Figura 4) (Sonogo et al., 2016; Aguirre Calvo, 2013).

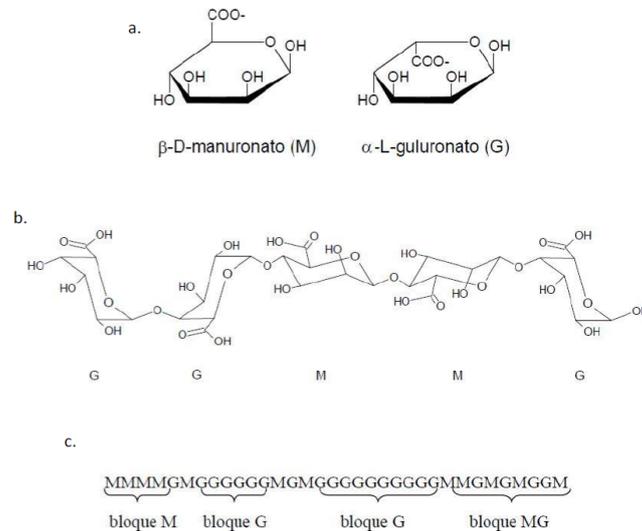


Figura 4. Estructura del alginato de sodio. a. monómeros: residuos manuronato y guluronato; b. posibles combinaciones entre los residuos en conformación silla; c. distribuciones de bloques posibles (Adaptado de Santagapita, 2010).

El alginato forma una estructura característica (caja de huevos) (Figura 5) en presencia de calcio. Los iones de calcio establecen puente entre los grupos cargados negativamente del ácido gulurónico. La incorporación del calcio a las cadenas debe realizarse de forma lenta, bien en la masa del alimento o bien controlando la difusión del calcio desde el exterior.

Las zonas con gulurónico son consideradas como zonas de unión entre cadenas, mientras que las de manurónico son las de interacción preferente con el agua. Los geles obtenidos a partir de alginatos ricos son más resistentes que los geles obtenidos en alginatos ricos en manurónico.

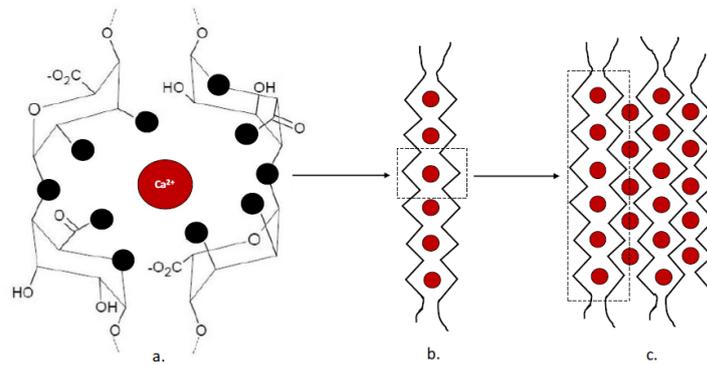


Figura 5. Esquema representativo del proceso de entrecruzamiento del alginato-Ca(II), a. coordinación del ion Ca^{2+} dentro de la cavidad creada por las cadenas de bloques de guluronato (G); b. dímero con estructura de “caja de huevo”; c. asociación lateral de más cadenas y gelificación. (•) representan a los átomos de oxígenos posiblemente involucrados en la coordinación con los iones (●) Ca^{2+} (Adaptado de Fang et al., 2007).

1.4.3 IMPORTANCIA DE LA ENCAPSULACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

La técnica de la encapsulación fue llevada a cabo inicialmente por el sector farmacéutico, y años más tarde se expandió al sector agroalimentario y cosmético (Martin et al., 2014). Como ya se ha comentado anteriormente, en la industria alimentaria existe la problemática relacionada con la resistencia y la estabilidad de ciertos compuestos a diferentes condiciones ambientales, como son: presión, temperatura y pH. Para poder solventar dichos problemas y limitar la reactividad con otros compuestos, se han desarrollado diversas técnicas, siendo la encapsulación una de las empleadas.

La encapsulación ofrece ciertas ventajas respecto a otras técnicas de aislamiento de compuestos bioactivos puesto que ofrece protección frente factores bióticos, abióticos y biológicos (Dias et al., 2015). La principal ventaja es el control de la liberación de los compuestos en el lugar específico del sistema gastrointestinal, aumentando así la biodisponibilidad de estos. Del mismo modo, la encapsulación ofrece una mayor estabilidad de dichos compuestos con la finalidad de alargar la vida útil y de proporcionar protección frente posibles reacciones que degradan sus propiedades funcionales (Ezhilarasi et al., 2013; Salomen et al., 2014). La introducción de técnicas de encapsulación en la industria alimentaria permite la incorporación de sabores en ciertos tipos de alimentos, y también la encapsulación de nutrientes funcionales que de otra forma no sería posible o tan efectiva (Dias et al., 2014).

1.5 PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA ESPECTROFOTOMETRIA

Según el modelo estándar de partículas, los fotones son partículas portadoras de todas las formas de radiación electromagnética, con espín nulo, que provocan una interacción nula con la malla de Higgs, es decir, sin masa que limite su velocidad, por lo tanto, se mueven a la velocidad de la luz. La falta de espín y masa solo hace posible que varíe su energía o movimiento vibrando. Las interacciones de los fotones dependen del nivel de energía del flujo de fotones.

Los fotones que poseen una baja frecuencia tienen un nivel de energía bajo e inducen orientación e inducción en algunas especies químicas, dependiendo de su frecuencia de

vibración. El resultado de estas interacciones se produce a niveles de penetración altos, debido a su baja energía, pudiéndose emplear el efecto de la circulación de fotones sobre la materia para analizar tejidos complejos. Es decir, midiendo las propiedades eléctricas y magnéticas de un flujo de fotones cuando atraviesa cualquier matriz biológica, es factible determinar y analizar el estado y cantidad de las especies químicas que habrán interactuado con dicho flujo (Velázquez-Varela, 2014).

Un medio dieléctrico es aquel material que no permite el movimiento libre de sus cargas internas, aquí, las cargas están asociadas a sus átomos por lo que impiden el movimiento. Por lo que cuando se dispone de un medio dieléctrico, se genera una resistencia al flujo de fotones que atraviesa que ocasiona un desplazamiento del campo magnético y eléctrico (Ecuaciones 1).

$$\bar{D} = \varepsilon^* \cdot \varepsilon_0 \cdot E = (\varepsilon' - j\varepsilon'') \cdot \varepsilon_0 \cdot E \quad (\text{Ec.1.a.})$$

$$\bar{E} = \mu^* \cdot H = (\mu' - j\mu'') \cdot \mu_0 \cdot H \quad (\text{Ec.1. b.})$$

Donde D y B son desplazamiento eléctrico y desplazamiento magnético, E y H son los campos eléctricos y magnéticos. ε^* es la permitividad compleja (F/m) y se define como la propiedad física que describe la respuesta del medio frente a un campo eléctrico. μ^* es la permeabilidad vectorial (H/m) y representa la respuesta del medio ante un campo magnético.

Cuando la radiación atraviesa un sistema pueden ocurrir diferentes fenómenos: transmisión, absorción o reflexión. La proporción de energía que es absorbida por el sistema se define a través de las propiedades dieléctricas y magnéticas. La propiedad eléctrica fundamental en base a la cual se describe la interacción con la materia es la permitividad ε^* (Castro-Giráldez et al., 2012) y matemáticamente se expresa de la siguiente manera (Ecuación 2).

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - j\varepsilon'' \quad (\text{Ec.2})$$

Donde ε' es la constante dieléctrica, energía que es almacenada cuando se produce la orientación del medio con respecto a la dirección que lleva el campo eléctrico. El factor de pérdidas, ε'' , representa el desplazamiento del campo inducido por las transformaciones de energía eléctrica en otro tipo de energía.

Cabe añadir que la permitividad varía en función del medio ya sea líquido, gaseoso o sólido y, además, está ligado al ordenamiento estructural del mismo. Con el empleo de bajas frecuencias, como la radiofrecuencia, las interacciones con el medio ocasionan un aumento de la movilidad de las partículas, generando así, una serie de colisiones que desencadenan una disipación de la energía en forma de energía mecánica o calorífica.

Otro factor importante es la permitividad vectorial, la cual se puede expresar como un número polar, el módulo se asocia con la energía que es absorbida y el ángulo (δ) con las pérdidas producidas con el desplazamiento del campo eléctrico cuando éste se orienta debido a la interacción entre el fotón y la molécula presente en el medio (Talens et, al., 2016a). La tangente de este ángulo se describe matemáticamente con la ecuación siguiente (Ecuación 3):

$$tg\delta = \frac{\varepsilon'}{\varepsilon''} = \frac{|\varepsilon| \sen \delta}{|\varepsilon| \cos \delta} \quad (\text{Ec. 3.})$$

La conductividad iónica (σ) con unidades Sm⁻¹, incluida con el factor de pérdidas, se asocia a las pérdidas energéticas que se dan debido a la vibración de las especies químicas, dichas pérdidas se pueden cuantificar en el rango de Hz a 1 GHz (Velázquez-Varela, 2014) (Ecuación 4).

$$\sigma = \epsilon_0 \epsilon'' \omega \quad (\text{Ec.4})$$

Donde $\omega=2\pi f$ corresponde a la frecuencia angular expresada en rad/s, la f en Hz y ϵ_0 corresponde con la permitividad del vacío (Nelson & Datta,2001).

1.5.1 FENÓMENOS DIELECTRICOS EN SISTEMAS ALIMENTARIOS

Los fenómenos dieléctricos que se dan a lo largo del espectro eléctrico y magnético se clasifican diferenciando dos tipos de dispersión en función del nivel de energía empleado por los fotones, siendo directamente proporcional el nivel de energía a la frecuencia alcanzada. Cuando se emplean frecuencias comprendidas entre los Hz y los GHz se producen los fenómenos de dispersión asociados a la orientación de moléculas, mientras que a frecuencias superiores se dan fenómenos de desplazamiento de otras partículas a nivel atómico.

Las dispersiones de orientación se subdividen en tres dispersiones conocidas como α , β , γ (Figura 6). La dispersión α se relaciona con la orientación de las cargas móviles, la β se produce en el rango de la radiofrecuencia y se relaciona con las interacciones con las cargas fijas y finalmente, la γ es debida a la orientación de las moléculas dipolares (Velázquez-Varela, 2014; Traffano-Schiffo, 2017).

Todos estos fenómenos generan una acumulación de energía cedida por el fotón en consecuencia del proceso de orientación de las partículas, sin embargo, parte de esa energía acumulada se disipa en forma de energía calorífica o mecánica, por lo que es menor que la energía inicialmente absorbida.

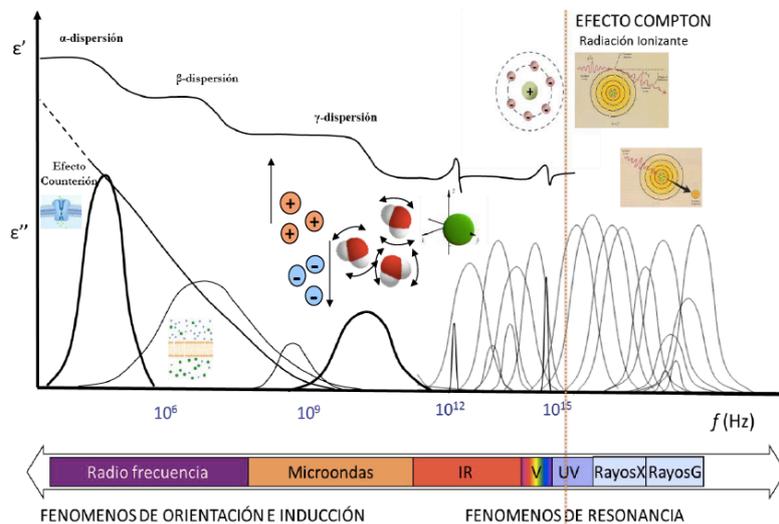


Figura 6. Representación de la constante dieléctrica y el factor de pérdidas en sistemas biológicos en función de la frecuencia (Adaptado de Castro-Giráldez et al., 2010c).

1.6 FUNDAMENTOS DE LA IMPRESIÓN 3D

La impresión 3D se fundamenta en la creación de objetos tridimensionales a partir de un modelo mediante la unión de materiales, la cual se lleva a cabo con tecnologías como la fotopolimerización, fusión de capa de polvo, deposición directa de energía o la más extendida en la actualidad: el modelado por deposición fundida (extrusión del material). Esta última está

basada en la fusión de un termoplástico en forma de filamento que se introduce en un extrusor, el cual lo calienta hasta fundirlo y lo va depositando a capas para formar la pieza.

1.6.1 MATERIALES DE IMPRESIÓN 3D

El PLA o ácido poliláctico es un material biodegradable fabricado a partir de materias primas renovables ricas en almidón, lo que lo convierte en un material barato. Es considerado el material de impresión más sencillo de utilizar al extruirse con temperaturas menores que sus competidores y no necesitar un soporte caliente sobre el que depositarse porque no muestra prácticamente contracción entre capas, por lo que es muy sencillo construir con él piezas complejas. Como inconvenientes podemos destacar la baja resistencia mecánica al ser rígido y frágil, térmica al volverse endeble a partir de los 60-70 °C y su higroscopicidad.

El ABS o acrilonitrilo butadieno estireno es un termoplástico derivado del petróleo y no es biodegradable. Este material se caracteriza por sus buenas propiedades mecánicas por su resistencia al impacto, térmicas por su resistencia no sólo a altas temperaturas, sino a bajas, químicas al ser muy resistente tanto a ácidos como a bases. Entre sus inconvenientes se encuentra el precio y la dificultad de impresión, necesitando soportes calefactores que compensen la contracción que se produce al imprimirse.

El nylon no está tan extendido como los dos anteriores, pero ofrece piezas con gran flexibilidad, proporcionando buenas propiedades mecánicas, además de una buena resistencia térmica y química. Los inconvenientes, similares al ABS, se centran en su dificultad de impresión al contraerse el material durante su deposición.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 OBJETIVOS

El objetivo de estudio fue determinar los cambios experimentados por las cápsulas durante la digestión a diferente pH, y para ello, se mide la cinética de liberación de los componentes aplicando una espectrofotometría en el rango de la radiofrecuencia con el empleo del sensor desarrollado.

Este objetivo general se subdivide en diferentes objetivos particulares:

- Primer objetivo particular: diseñar un sensor capaz de monitorizar la liberación de compuestos bioactivos con el empleo de diferentes materiales plásticos (PLA, ABS, NYLON).
- Segundo objetivo particular: aplicar el protocolo establecido para la elaboración de microcápsulas.
- Tercer objetivo: aplicar el protocolo establecido para determinar el aumento de volumen (ΔV) que sufren las cápsulas cuando entran en contacto con los diferentes pH.
- Cuarto objetivo particular: determinar la liberación de los compuestos bioactivos por espectrofotometría en el rango de la radiofrecuencia.

2.2 PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajado seguido para conseguir los objetivos previamente planteados es el siguiente:

- Revisión bibliográfica de materiales y técnicas de encapsulación de compuestos bioactivos en matrices de biopolímeros.
- Revisión bibliográfica del funcionamiento del sistema digestivos con el fin de conocer sus mecanismos y características propias de cada tramo.
- Obtención del sensor para medir la liberación de los compuestos bioactivos cuando se someten a espectrofotometría en el rango de la radiofrecuencia.
- Obtención de las cápsulas de alginato cálcico y hierro mediante las técnicas aprendidas en el punto uno.
- Monitorización del proceso de liberación de las cápsulas mediante el analizador de impedancias

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAS

3.1.1 BUFFER

La disolución buffer con un pH 3,8 y 0,05 M se prepara a partir de ácido acético y acetato de sodio (Scharlab S.L., Barcelona, España). Se seleccionan con la intención de bajar el pK_a del alginato, consiguiendo que se cargue negativamente y asegurando una interacción óptima entre el alginato y el calcio (Santagapita et al., 2010).

3.1.2 REACTIVOS

Los reactivos empleados en la elaboración de las muestras junto al buffer fueron el cloruro cálcico ($CaCl_2$) (Scharlab S.L., Barcelona, España), alginato sódico (Panreac Química SLU, Castellar del Valles, Barcelona) con una pureza del 90%, proteínsuccinilato férrico (Ferplex, Italfarmaco S.A., Madrid, España), con una pureza de 40mg/15 mL y L (+)-Ácido ascórbico (Scharlab S.L, Barcelona, España), ácido clorhídrico (1N) (Panreac Química SLU, Castellar del Valles, Barcelona)

3.1.3 DISOLUCIONES DE DIFERENTES pH

Para la preparación de las tres disoluciones de pH 3, 4,7 y 7 se utilizó agua bidestilada y ácido clorhídrico ajustándose con un pHmetro (S20 SevenEasy™,Mettler Toledo, España)

3.1.4 MATERIALES DE IMPRESIÓN 3D

3.1.4.1 ABS

Este material (FrontierFila, China) se ha impreso con los siguientes parámetros: 235 °C de temperatura de extrusión, 90 °C de temperatura de cama, 100% de relleno, 40 mm/s de velocidad de impresión y una altura de capa de 0,1 mm. El filamento tiene un diámetro de 1,75 mm de acuerdo con las especificaciones del extrusor de la impresora.

3.1.4.2 PLA

Este material (Shenzhen Eryone Technology Co., Shenzhen, China) se ha impreso con los siguientes parámetros: a 210 °C de temperatura de extrusión, 70°C de temperatura de cama, 100% de relleno, 40 mm/s de velocidad de impresión y una altura de capa de 0,1 mm. El filamento tiene un diámetro de 1,75 mm de acuerdo con las especificaciones del extrusor de la impresora.

3.1.4.3 NYLON

Este material (Taulman3D, Saint Peters, Missouri, EEUU) se ha impreso con los siguientes parámetros: a 250 °C de temperatura de extrusión, 80°C de temperatura de cama, 100% de relleno, 40 mm/s de velocidad de impresión y una altura de capa de 0,1 mm. El filamento tiene un diámetro de 1,75 mm de acuerdo con las especificaciones del extrusor de la impresora.

3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.2.1 PROTOCOLO DE CALIBRACIÓN Y DE MEDIDA

Se diseñó un sistema de medida de propiedades dieléctricas específico para poder realizar medidas en continuo durante la liberación de compuestos bioactivos. Este sistema de medida consta de una carcasa exterior y un tanque de medida, ambos impresos mediante impresión 3D. Posteriormente se ensamblaron las piezas y los metales elegidos para obtener el sensor de propiedades dieléctricas, y se conectó a un analizador de impedancias para poder realizar medidas.

Se prepararon tres disoluciones a diferentes pH (3, 4,7 y 7), para la disolución a pH 7 se empleó únicamente agua bidestilada y para las disoluciones a pH 3 o 4,7 se adicionó ácido clorhídrico hasta alcanzar el pH final. Se prepararon disoluciones estándar con cantidades conocidas de proteínsuccinilato férrico y otras disoluciones estándar contenían L (+)-Ácido ascórbico, en ambos casos se prepararon a los tres pH (3, 4,7 y 7). Las disoluciones tienen las siguientes fracciones máscas (kg/kg) de Fe³⁺: 0,005; 0,001; 0,0012; 0,0015; 0,0018; 0,002; 0,0025 y 0,003. Por otra parte, las fracciones máscas (kg/kg) de L (+)-Ácido ascórbico son las siguientes: 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 y 0,3. Una vez preparadas las muestras se midieron para comprobar el funcionamiento y analizar la posibilidad de determinar cantidades concretas de estos compuestos en diferentes medios mediante el sensor desarrollado.

Tras este proceso de puesta a punto y prueba del sensor, se realizaron tres tipos de cápsulas: de alginato cálcico (cápsulas control) y de alginato cálcico con proteínsuccinilato férrico, y, por último, de L (+)-Ácido ascórbico, todas sometidas a un proceso de secado a 40 °C con 0,8 Bar durante 24 horas en una estufa de desecación a vacío (Vaciotem-T, Grupo Selecta, Abrera, Barcelona, España). Se introdujeron 0,05 g de cápsulas y 200 µL de medio (disoluciones a distintos pH 3; 4,7 y 7) en el tanque de liberación del sensor y se realizaron medidas de propiedades dieléctricas durante dos horas. Dichas medidas se tomaban de forma continua durante los primeros 600 segundos, (a los 5, 15, 30, 60, 120, 150, 200, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600 segundos) a partir de ese tiempo se tomaba una medida cada 5 min hasta los 30 min, y después cada 15 minutos hasta completar las 2 horas.

Por último, se realizó una medida de expansión dentro de distintos medios (disoluciones a distintos pH 3; 4,7 y 7) de las cápsulas control, cápsulas de sal férrica y cápsulas de ácido ascórbico.

3.2.2 PROTOCOLO DE IMPRESIÓN

El protocolo seguido para el diseño y obtención de la carcasa externa y el tanque de medida se divide en tres pasos. En primer lugar, se diseñó la pieza usando un programa de diseño 3D (Tinkercad), en la cual se especificó todas las medidas y dimensiones de las piezas deseadas (Figura 7). Una vez se tiene el prototipo del diseño se envía la impresora 3D (Anet A8) (Figura 8) fijando todos los parámetros establecidos previamente, para ello se empleó el software Repetier-Host que se encarga de controlar y calibrar la impresora, así como de transmitir los datos de un archivo GCode para ser replicados por la impresora 3D, previamente calentada a la temperatura óptima de cada material. Para convertir el diseño digital 3D en las instrucciones y pasos necesarios para conseguir el diseño físico se empleó la herramienta Slic3c que encarga de cortar el modelo en capas, genera las trayectorias para rellenarla y calcula la cantidad de material que será necesario extrusionar.

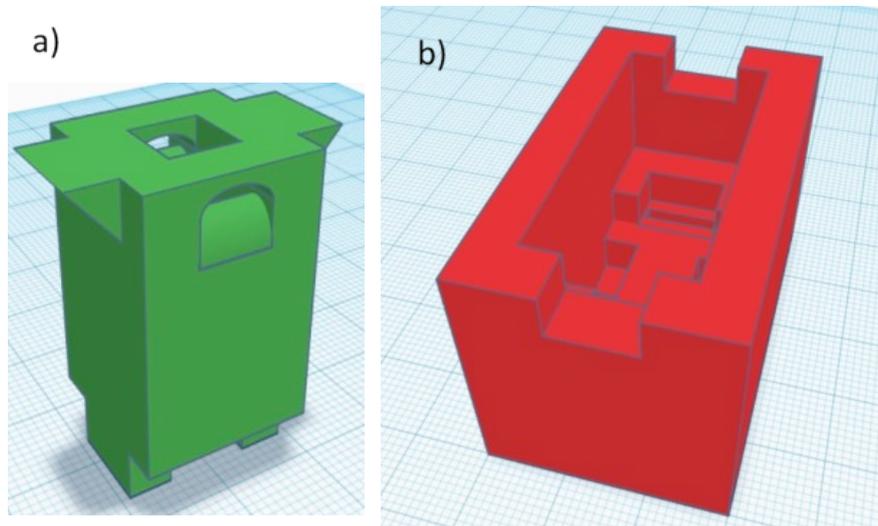


Figura 7. Diseño del sensor. a) Tanque de liberación y b) Carcasa externa.

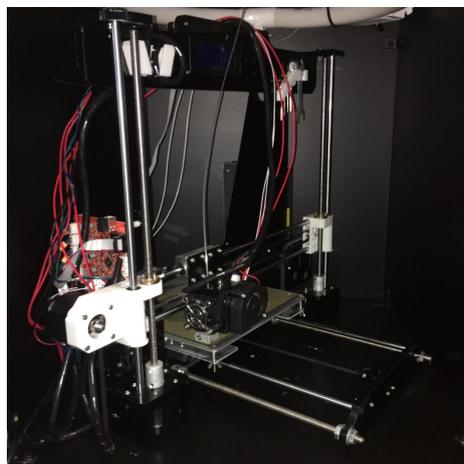


Figura 8. Impresora 3D empleada para el diseño del sensor

3.2.3 PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE CÁPSULAS DE ALGINATO CÁLCICO ENCAPSULANDO PROTEINSUCCINILATO FÉRRICO Y ÁCIDO ASCÓRBICO

Las cápsulas de Alginato-Ca (II) y de hierro o vitamina C se prepararon mediante gelificación iónica, para ello, es preciso preparar una disolución 1:100 de alginato sódico (junto al reactivo que se desee encapsular: proteínsuccinilato férrico o L (+)- Ácido ascórbico) y otra disolución de 1:100 de cloruro cálcico, ambas preparadas con el buffer de acetato sódico. El montaje precisa en primer lugar de un variador de frecuencia (Inverter DV-700 Panasonic, Osaka, Japón) para controlar las revoluciones por minuto de la bomba peristáltica (Damova S.L, Barcelona, España, modelo CPM-045B) (Figura 9). La bomba peristáltica gotea la disolución formada por alginato de sodio y el reactivo que se desee encapsular sobre la disolución de CaCl_2 con una proporción del 1:10, la disolución de CaCl_2 se encuentra en continua agitación (IKA® MS3 basic). La velocidad empleada para realizar un correcto goteo debe ser en función del porcentaje de potencia que le da el variador de frecuencia a la bomba, en este caso, es del 30% y la distancia entre la punta de la aguja (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finlandia) y la disolución de CaCl_2 es de 10 cm.

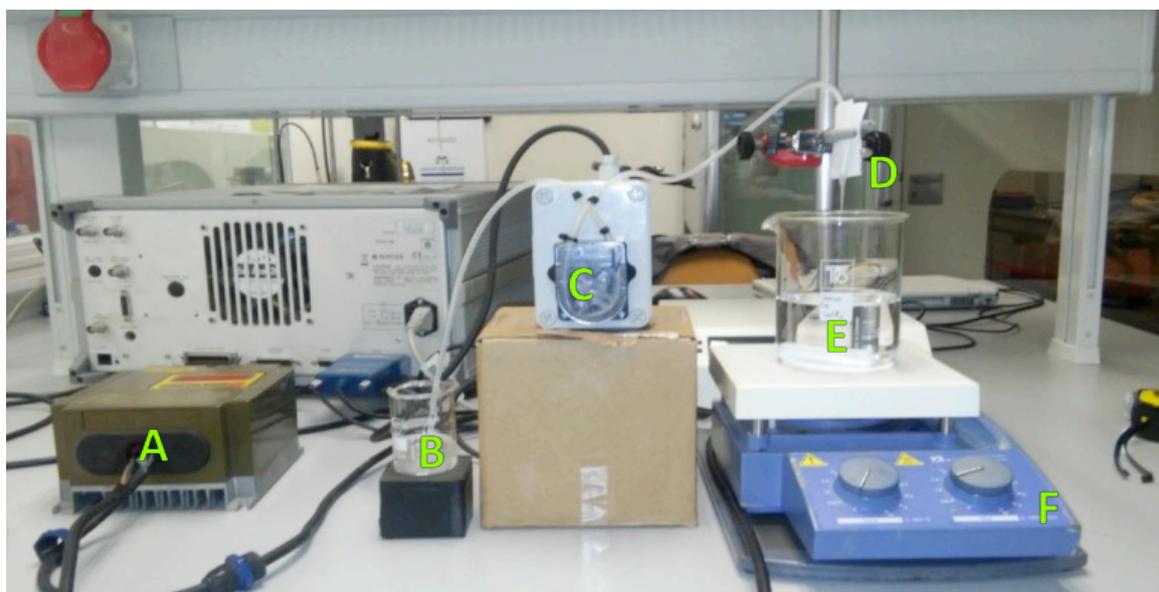


Figura 9. Esquema general del proceso de elaboración de cápsulas. A) Variador de Frecuencia; B) Disolución de alginato de sodio y el reactivo que se desee encapsular; C) Bomba peristáltica; D) Soporte del tubo y aguja; E) disolución de cloruro cálcico; F) Agitador magnético.

Una vez se obtienen las cápsulas, éstas se deben dejar en agitación en la solución de CaCl_2 durante 15 minutos para asegurar una óptima gelificación (Deladino et al., 2008). Una vez transcurridos los 15 minutos, las cápsulas son extraídas de la solución y son lavadas 5 veces con agua destilada para retirar el exceso de CaCl_2 .

Una vez se han formado las cápsulas húmedas de alginato de calcio y proteínsuccinilato férrico o alginato de calcio y L (+)-Ácido ascórbico, son introducidas en crisoles previamente pesados y se toma la masa del conjunto. Se introduce en una estufa de desecación a vacío (Vaciotem-T, JPSELECTA) a 40°C con 0,8 Bar durante 24 horas. Una vez transcurridas 24 horas,

las muestras secas con una a_w inferior a 0,35 son pesadas y posteriormente se guardan en cápsulas Aqualab® selladas con parafilm® para evitar una posible rehidratación (Figura 10).

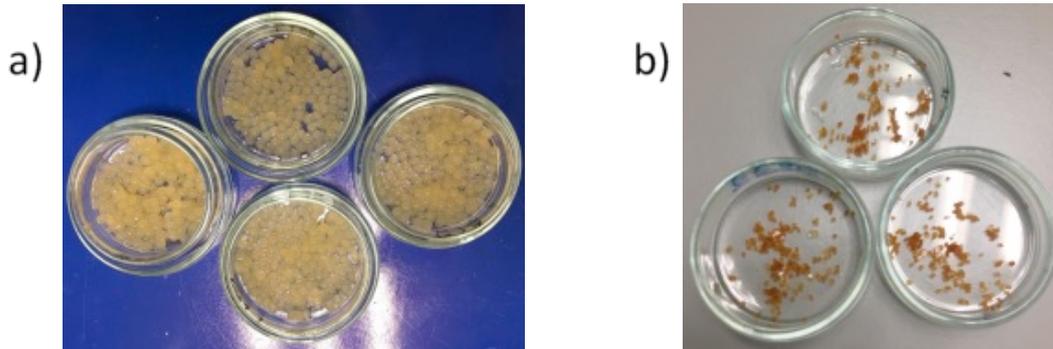


Figura 10. a) Cápsulas de alginato de calcio y proteínsuccinilato férrico húmedas; b) Cápsulas de alginato de calcio y proteínsuccinilato férrico secas

3.2.4 PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE EXPANSIÓN DE LAS CÁPSULAS EN LOS DISTINTOS MEDIOS

Una vez se obtienen las cápsulas secas se realizó por triplicado el protocolo de determinación de la capacidad de expansión: capacidad de expansión de las cápsulas control en los distintos medios (pH 3; 4,7;7), capacidad de expansión de las cápsulas de L (+)-Ácido ascórbico en los distintos medios (pH 3;4,7;7) y, finalmente, la capacidad de expansión de las cápsulas de proteínsuccinilato férrico en los distintos medios (pH 3;4,7;7). Las cápsulas fueron sometidas a un proceso de rehidratación para cuantificar y replicar el aumento de tamaño que éstas sufren dentro del sensor cuando entran en contacto con una disolución con un determinado pH. El montaje precisa de un microscopio (Jusion USB Microscope) conectado a un ordenador (MacBook Air, Apple, USA), usando para la toma de fotos el programa “Photo Booth”. Como distancia de referencia se usa un cristal micrometrado situado en la base de la cápsula (Figura 11).

Una única cápsula, es colocada dentro de un crisol de vidrio, seguidamente 100 μ L del pH correspondiente (3, 4,7 o 7) se añaden. La primera foto se toma una vez la fase líquida entra en contacto con la cápsula. Tras este la primera fotografía, se realizaron a los 5, 15, 30, 60, 120, 150, 200, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600 segundos) a partir de ese tiempo se tomaba una medida cada 5 min hasta los 30 min.

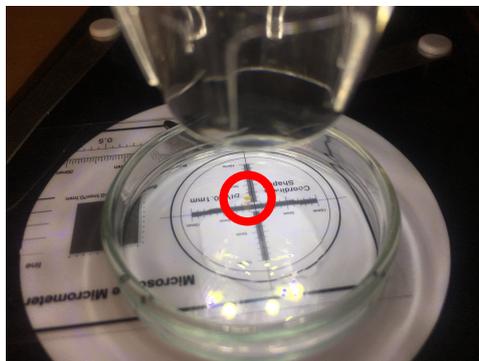


Figura 11. Crisol con la fase líquida y cápsula de alginato de calcio-proteínsuccinilato férrico en el centro de este.

Las imágenes se analizan en el Photoshop® (CS5, ver. 12, Adobe Systems InCorp. EEUU) midiendo con la regla los dos diámetros de las cápsulas y una distancia de referencia proporcionada por el cristal micrometrado para extrapolar la medida en píxeles a milímetros, obteniendo así la variación del volumen (ΔV).

3.2.5 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN

Para obtener la cinética de liberación de compuestos bioactivos en distintos medios se diseñó y construyó un sistema de medida de propiedades dieléctricas (Ver apartado 4.1 de resultados). El sistema de medida se conectaba a un Analizador de impedancias Agilent 4294A, (Agilent Technologies, EE. UU) (Figura 12). Se realizaba una calibración en abierto y en corto. El rango de medida fue de 40 Hz a 1 MHz. Se realizó un triplicado de cada proceso de liberación: liberación de cápsulas control en distintos medios (pH 3; 4,7 y 7), liberación de cápsulas de alginato cálcico y proteínsuccinilato férrico en distintos medios (pH 3; 4,7 y 7), y, por último, liberación de cápsulas de alginato cálcico y L (+)-Ácido ascórbico en distintos medios (pH 3; 4,7 y 7).

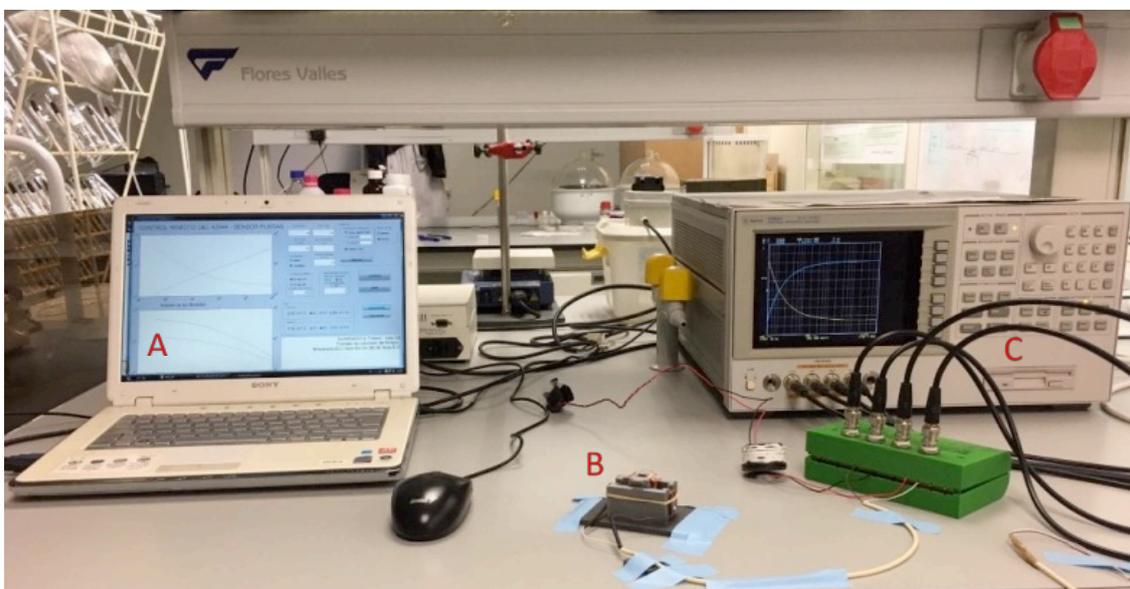


Figura 12. Montaje para determinar la cinética de liberación. A) Ordenador que recoge los datos del analizador de impedancias; B) Carcasa y cámara de liberación y C) Analizador de impedancias.

3.2.6 MASA

Durante las diferentes etapas del proceso se ha empleado una balanza de precisión (Mettler Toledo, modelo AB304-S).

4. RESULTADOS

4.1 DISEÑO DEL SISTEMA DE MEDIDA.

Para llevar a cabo el proceso de monitorización de la liberación de compuestos bioactivos encapsulados en alginato cálcico se diseñó un sistema de medida. Dicho sistema de medida debía ser capaz de medir las propiedades dieléctricas del medio que

rodea las cápsulas en condiciones límite de pH con el fin de poder simular en el futuro el proceso digestivo, por lo que se realizó un estudio de los mejores materiales (ABS, nylon y PLA) y diseños para lograr este fin (Figura 13). El diseño del sistema de medida se compuso de dos partes, una carcasa externa cuya función fue la de fijar el tanque de medida en el que se llevaron a cabo las medidas de las propiedades dieléctricas.

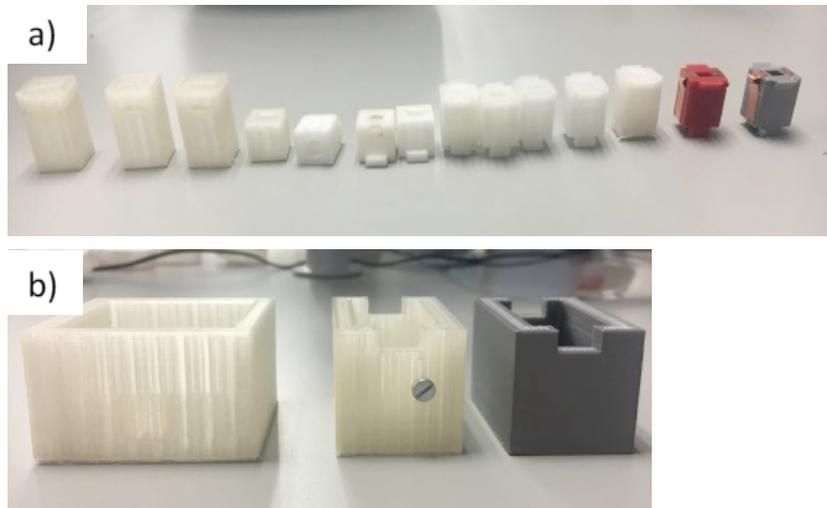


Figura 13. a) Diferentes diseños de tanques de medida extrusionados con Nylon (blanco), ABS (rojo) y PLA (gris y las cuatro primeras de blanco). b) Diferentes diseños de carcasas externas extrusionadas con PLA.

Tras someter distintos tanques de medidas extrusionados con los distintos materiales a medios con pH comprendidos entre 3 y 7 se observó que el pH ácido degradaba rápidamente el tanque de medida extrusionado con nylon; el PLA fue más resistente pero también sufría una degradación, por lo que también se descartó. Por último, el ABS no mostró interacciones con ningún medio. También se realizó un estudio para ver el comportamiento de distintos metales conductores para seleccionar el mejor material capaz de medir las propiedades dieléctricas. El cobre, el latón y el acero reaccionaban con los iones cloro en medio ácido, por lo que se descartaron, utilizándose tantalio al ser muy conductor e inerte en medios ácidos a reacciones electrolíticas.

El diseño final del sensor se compuso de dos partes, una carcasa externa y un tanque de medida. Los materiales seleccionados para el diseño final fueron el PLA para la carcasa externa debido a su facilidad de extrusión de piezas grandes y el ABS para el tanque de medida.

El tanque de medida (figura 14) se diseñó con el objetivo de introducir las dos placas de tantalio (0,75 x 1,5 cm) paralelas en el interior del tanque, pegadas a las paredes interiores, quedando entre ellas el medio y las cápsulas. Además, se añadieron en la base dos rectángulos de sujeción, que se introducían en la carcasa exterior para mejorar su fijación.

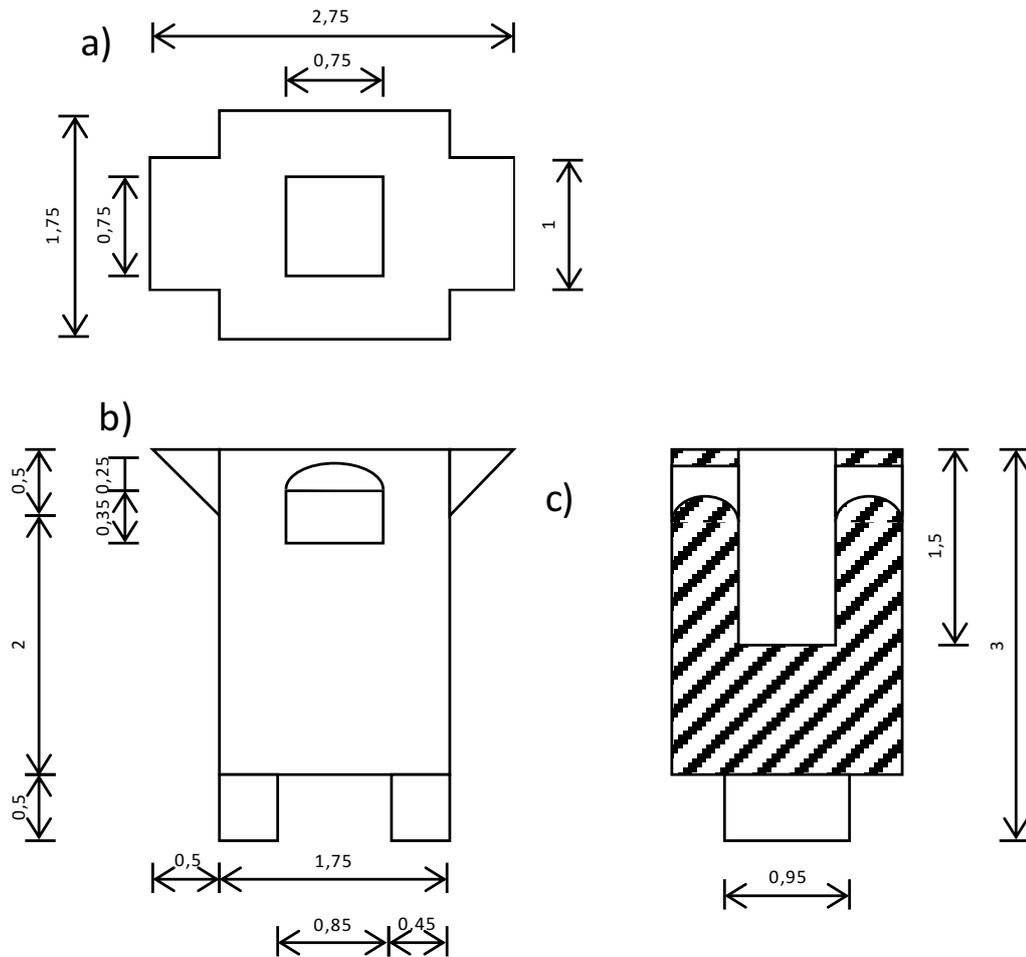


Figura 14. a) Planta del tanque de medida. b) Alzado del tanque de medida. c) Sección del perfil del tanque de medida. Las cotas de toda la figura están en centímetros.

La carcasa exterior (figura 15) se diseñó con el objetivo de fijar el tanque de medida y facilitar la conexión de las placas de tantalio con el analizador de impedancias, para lo que se incluyó en la base dos huecos para poder introducir placas de cobre.

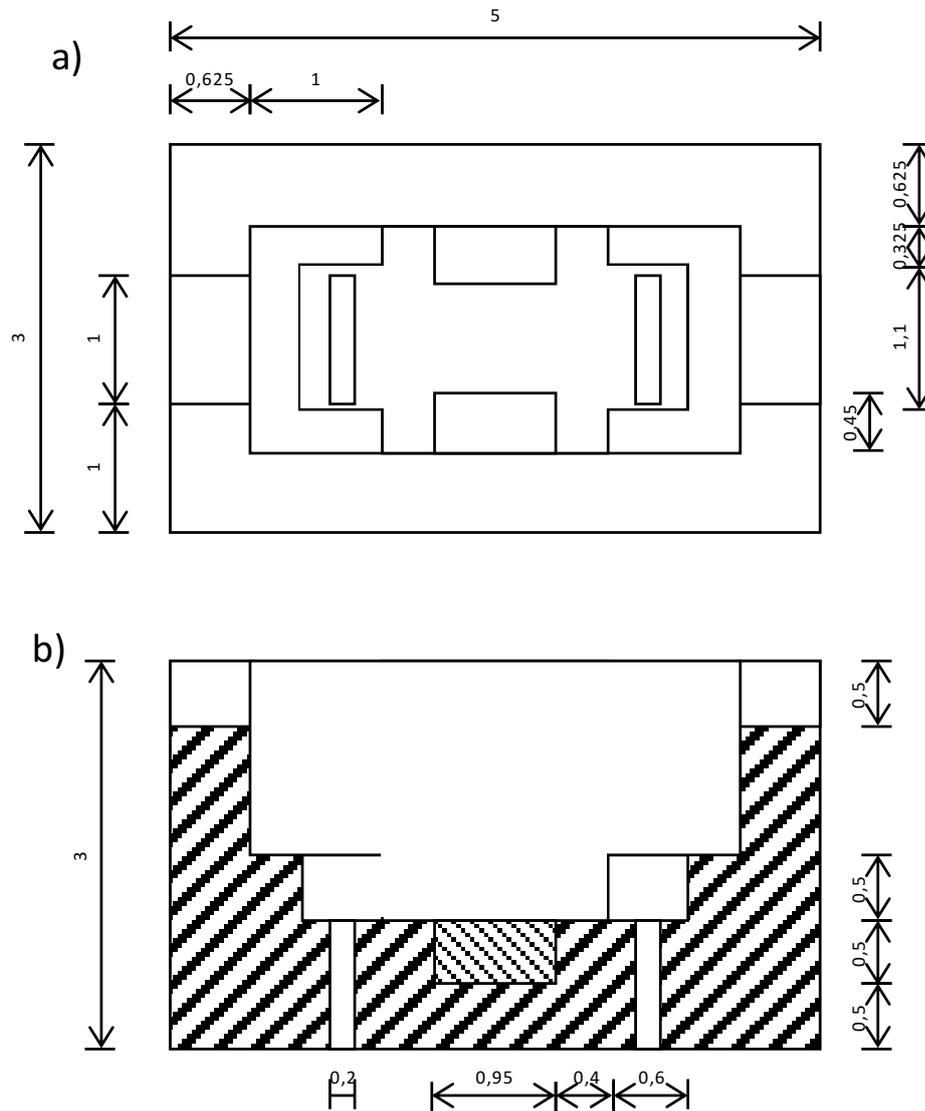


Figura 15. a) Planta de la carcasa exterior. b) Sección del alzado del tanque de medida. Las cotas de toda la figura están en centímetros.

Estos diseños se dibujaron en 3D mediante Tinkercad, se añadieron los parámetros de impresión correspondientes mediante el software Repetier-Host y Slic3r y se imprimieron en la impresora 3D Anet A8.

Con el objetivo de monitorizar los cambios en las propiedades dieléctricas del medio introducido en el tanque de medida, se diseñó un circuito (figura 16) para poder modelizar el campo eléctrico generado entre las dos placas de tantalio paralelas (figura 17). Para ello, mediante fijación mecánica con una goma elástica se puso en contacto el tantalio del exterior del tanque de medida, que previamente había sido recubierto con adhesivo de cobre, con una placa de cobre introducida por la base de la carcasa exterior, esta placa rodea el exterior de la carcasa, donde mediante una soldadura de estaño se une a los cables de cobre provenientes del analizador de impedancias.

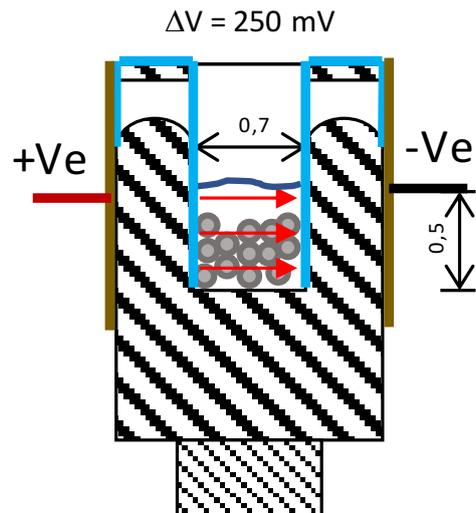


Figura 16. Esquema del campo eléctrico generado en el medio donde se van a liberar los compuestos encapsulados. Las cotas están en centímetros

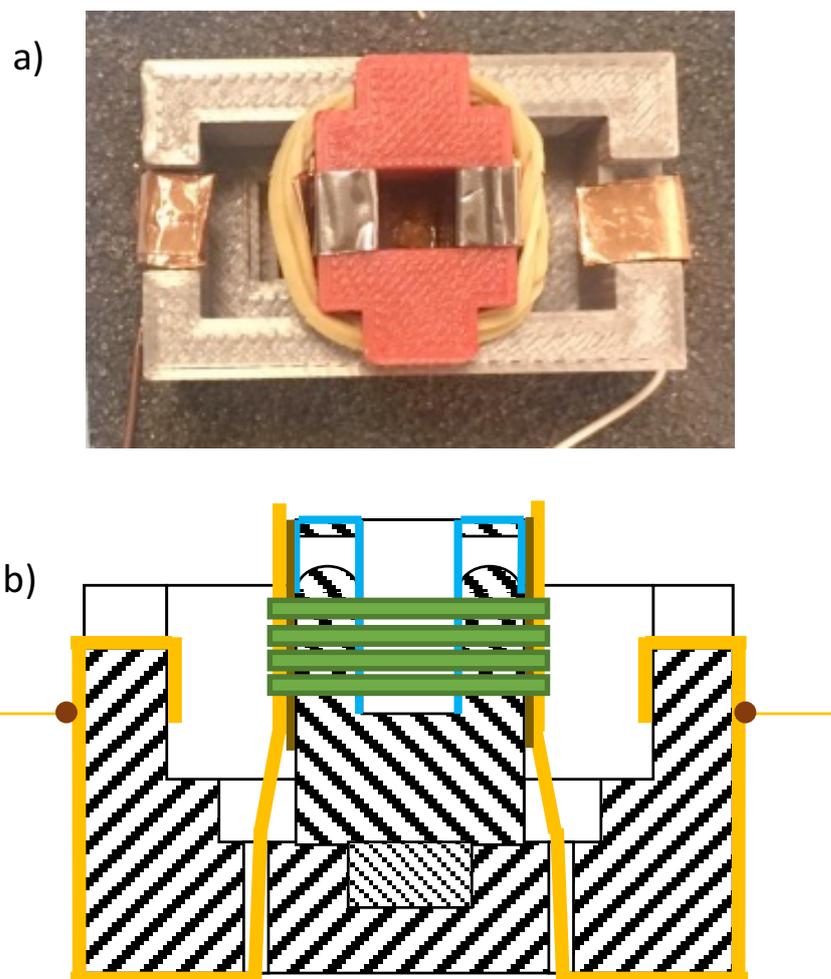


Figura 17. a) Foto del montaje final del sensor. b) Esquema del montaje donde: — son las placas de tantalio, — son las placas de cobre, — es el adhesivo de cobre, — es la goma elástica y ● son las soldaduras de estaño que unen el circuito con el analizador de impedancias.

4.2 CALIBRACIÓN DEL SISTEMA DE MEDIDA; DISOLUCIONES ESTÁNDAR.

Con el fin de obtener la calibración del sistema de medida de liberación se realizaron disoluciones estándar de ión férrico (proteinsuccinilato férrico) desde fracciones máscas de 0.0005-0.003 de ión hierro (kg/kg), y de ácido ascórbico en fracciones máscas de 0,005 a 0,3 (kg/kg) de ácido ascórbico a tres niveles de pH, 3, 4,7 y 7. Se equilibró el pH con HCl en el caso de las disoluciones ácidas. Se observó que el pH, ni el HCl tenían un efecto significativo sobre las medidas de propiedades dieléctricas a frecuencias de kHz. Se encontró una relación exponencial, por lo que se ajustó tal y como se muestra las figuras 18 y 19.

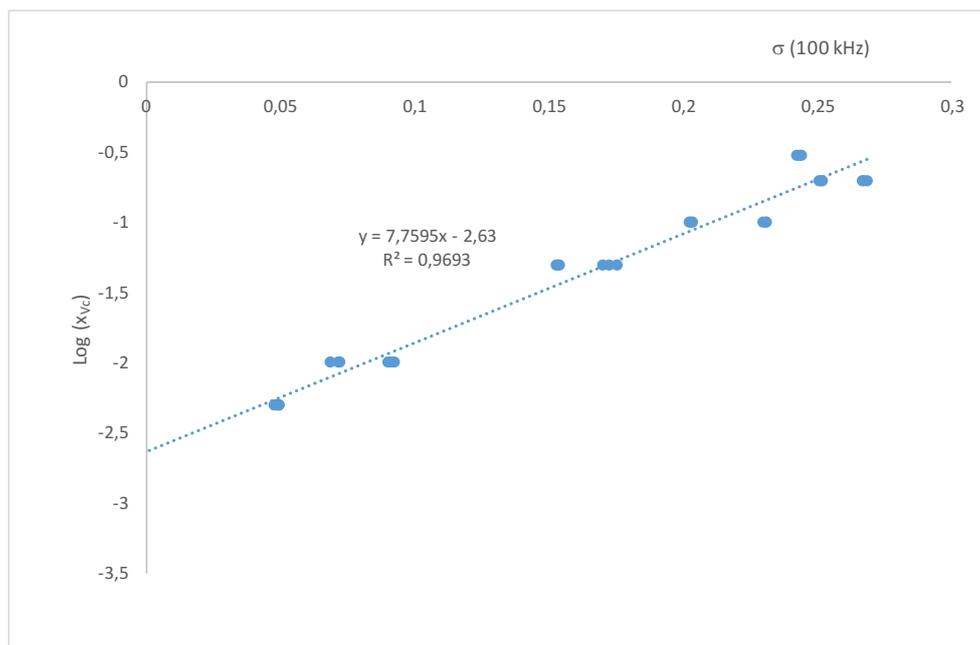


Figura 18. Curva de calibrado de concentración de L (+)-Ácido ascórbico.

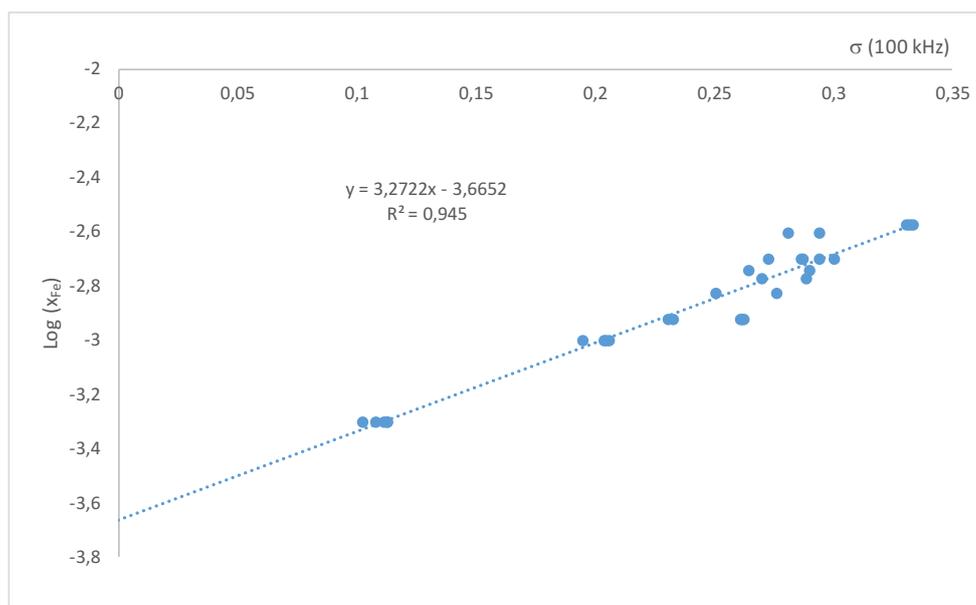


Figura 19. Curva de calibrado de concentración de ion férrico (Fe^{3+})

4.3 EXPANSIÓN DEL ENCAPSULADO, PROCESO DE REHIDRATACIÓN.

Tal y como se explica en el apartado de materiales y métodos, 3.2.4, se realizaron ensayos de hinchamiento por rehidratación de las capsulas vacías y encapsuladas con ion férrico o ácido ascórbico.

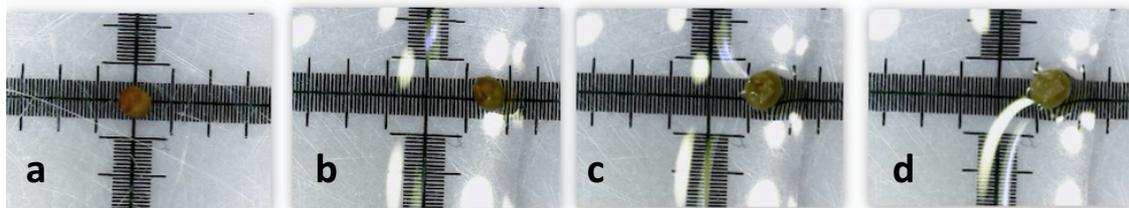


Figura 20. Secuencia de hinchamiento de una capsula de proteínsuccinilato férrico a pH 4,7 a los tiempos: A) 0 min; B) 0,367 min; C) 6min; D) 30 min.

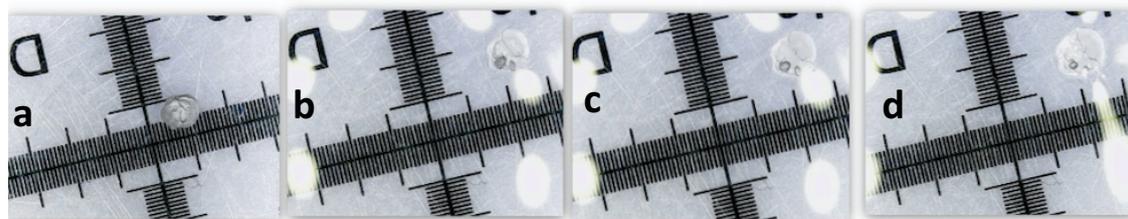


Figura 21. Secuencia de hinchamiento de una capsula de L (+)-Ácido ascórbico a pH 4,7 a los tiempos a) 0; b) 0,6 min; c) 4 min; d) 30 min.

En las figuras 20 y 21 se muestran dos secuencias de hinchamiento, la primera de encapsulado de Fe^{3+} y en la segunda de ácido ascórbico, como se puede observar el hinchamiento es evidente en ambos casos.

Las figuras 22,23 y 24 muestran el análisis del hinchamiento de los encapsulados vacío, de ácido ascórbico y sal férrica El apartado (a) de las tres figuras muestra la curva de expansión a causa del hinchamiento que sufren los encapsulados (vacío, ácido ascórbico y sal férrica) cuando entran en contacto con los distintos medios, explicado en el apartado 3.2.4 de materiales y métodos. En el apartado (b) de las figuras se muestra el flujo neto de fase líquida (J_{FL}) que se introduce en cada encapsulado (Ecuación 5).

$$J_{FL} = \frac{\Delta V \cdot \rho_w}{S \cdot t} \quad (Ec.5)$$

Donde ΔV es la variación de volumen (m^3), ρ_w es la densidad del medio (kg/m^3), S es la superficie de la cápsula (m^2) y t el tiempo (s).

A partir de las curvas de hinchamiento se obtuvieron los flujos netos de fase líquida que se introduce en cada encapsulado pudiendo calcular en cada caso la cantidad de entrada de líquido en los encapsulados.

Por esta razón es posible decir que en el tracto digestivo a cualquiera de los pH que se encuentran en el mismo, un encapsulado de alginato cálcico liberará constantemente cualquier compuesto que se encapsule en su interior.

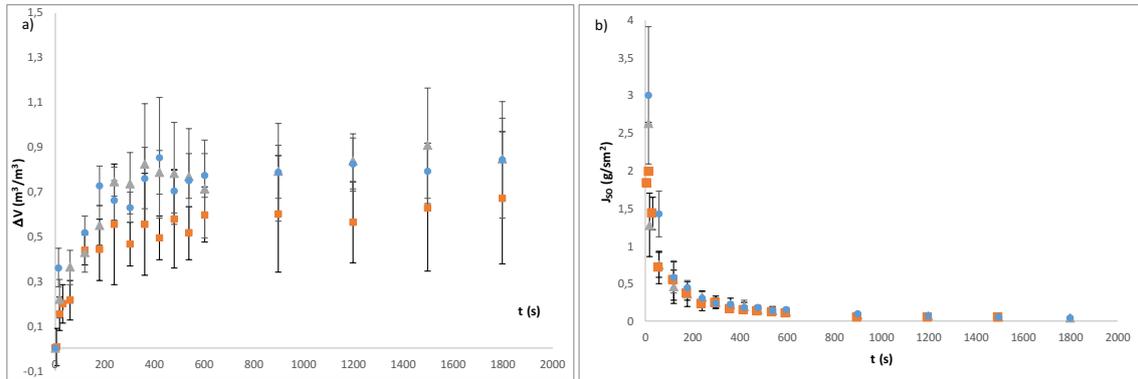


Figura 22. Análisis del hinchamiento de los encapsulados vacíos (\blacklozenge), de ácido ascórbico (\blacktriangle) y sal férrica (\blacksquare) a pH 3, donde a) representa la curva de expansión y b) el flujo neto de fase líquida que se introduce en cada encapsulado.

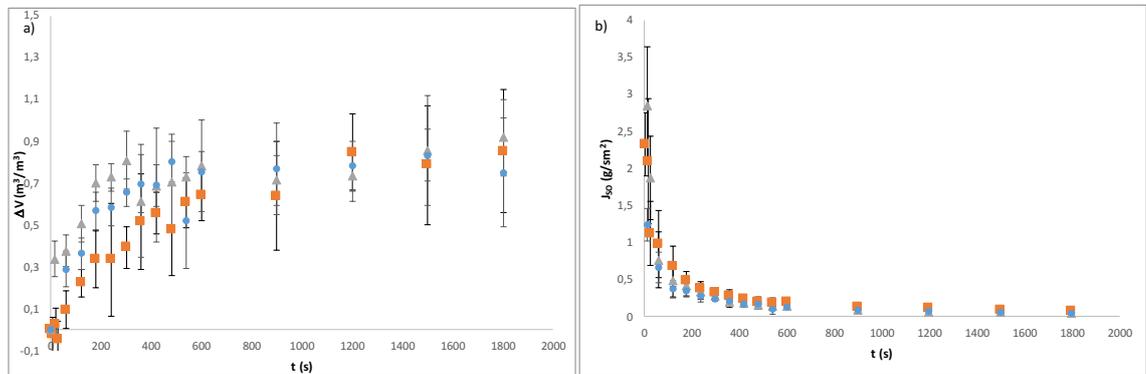


Figura 23. Análisis del hinchamiento de los encapsulados vacíos (\blacklozenge), de ácido ascórbico (\blacktriangle) y sal férrica (\blacksquare) a pH 4,7, donde a) representa la curva de expansión y b) el flujo neto de fase líquida que se introduce en cada encapsulado.

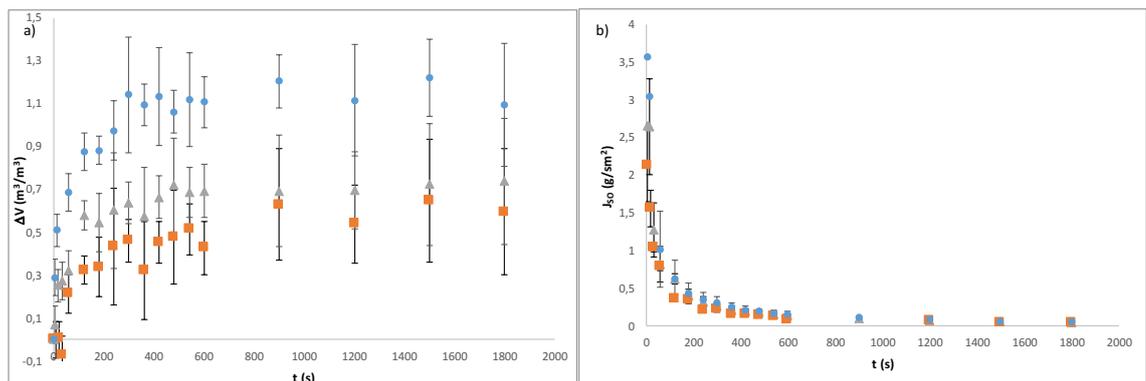


Figura 24. Análisis del hinchamiento de los encapsulados vacíos (\blacklozenge), de ácido ascórbico (\blacktriangle) y sal férrica (\blacksquare) a pH 7, donde a) representa la curva de expansión y b) el flujo neto de fase líquida que se introduce en cada encapsulado.

Dado que la entrada de fase líquida, que es casi su mayoría representa agua, es la responsable del proceso de hinchamiento y por ende de los mecanismos de

expansión/contracción que interfieren en las fuerzas impulsoras al transporte, el análisis de estos flujos se realizara conjuntamente con la liberación de los compuestos encapsulados.

4.4 ANALISIS DE LIBERACIÓN DE COMPUESTO ENCAPSULANTE.

Siguiente el protocolo expuesto en el apartado 3.2.5. se introdujeron encapsulados de ácido ascórbico y de proteínsuccinilato férrico en el tanque de medida (figura 17), inmediatamente después se introdujo el medio externo, según apartado 3.2.1., a pH 3, 4,7 o 7. A partir de ese momento empezó a contar el tiempo de liberación y se empezó a analizar las propiedades dieléctricas.

Siguiente la función de calibrado mostrada en la figura 18 se transformó la conductividad iónica a 100 kHz a fracciones másicas de ácido ascórbico, obteniéndose una evolución de la concentración del mismo en la fase líquida externa (ver figura 24 a, c y e).

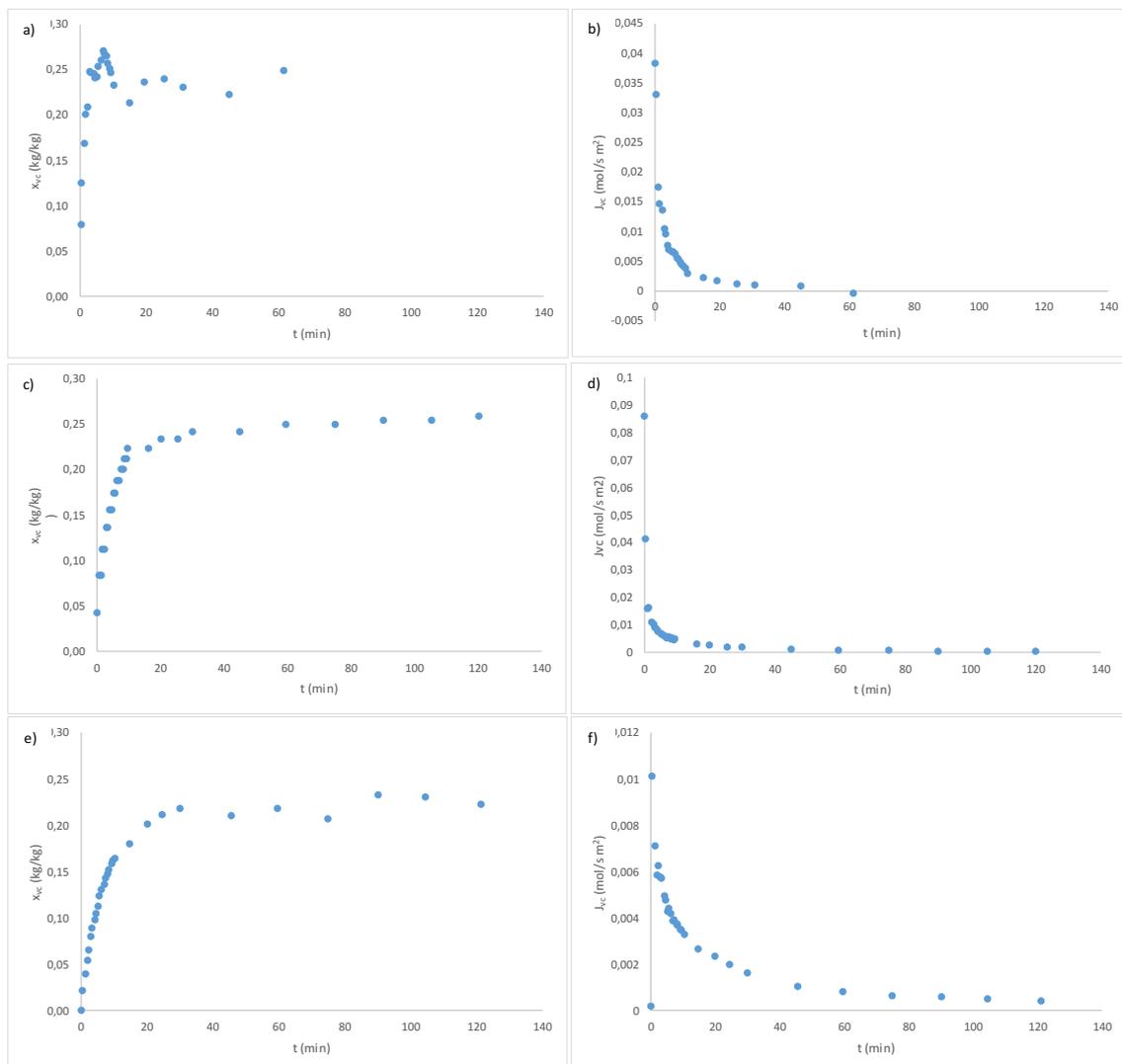


Figura 25. Evolución de la liberación de ácido ascórbico donde a) es la fracción másica de ácido ascórbico de la fase externa a las cápsulas y b) el flujo molar de ácido ascórbico, ambos en un medio de pH 3; c) es la fracción másica de ácido ascórbico de la fase externa a las cápsulas y d) el flujo molar de ácido ascórbico, ambos en un medio de pH 4,7; e) es la fracción másica de ácido ascórbico de la fase externa a las cápsulas y f) el flujo molar de ácido ascórbico, ambos en un medio de pH 7.

A partir de variación de la concentración de ácido ascórbico en el medio externo es posible calcular el flujo de salida del mismo a partir de la siguiente ecuación:

$$J_{VC} = \frac{\Delta(V \cdot \rho_i) \cdot x_{VC}^{FL} \cdot 10^{-3}}{S \cdot t \cdot M_{VC}} \quad (\text{Ec.6})$$

Donde J_{VC} es el flujo molar de ácido ascórbico (mol/s m^2), V es el volumen (m^3), ρ_i es la densidad de la mezcla agua/ácido ascórbico (kg/m^3), x_{VC}^{FL} es la fracción másica de ácido ascórbico ($\text{kg}_{VC}/\text{kg}_T$), S la superficie (m^2), t el tiempo (s), M_{VC} la masa molecular del ácido ascórbico (176,12 g/mol).

La evolución de los flujos molares de ácido ascórbico se muestra en la figura 25 b, d y e.

Siguiendo el mismo protocolo realizado para calcular la fracción másica de ácido ascórbico se calculó la fracción másica del ion férrico en el medio externo a lo largo del tiempo de liberación con la curva de calibrado mostrada en la figura 19. En la figura 26 a, c y e se muestra la evolución de la fracción másica del ion férrico para los medios con pH 3, 4,7 y 7.

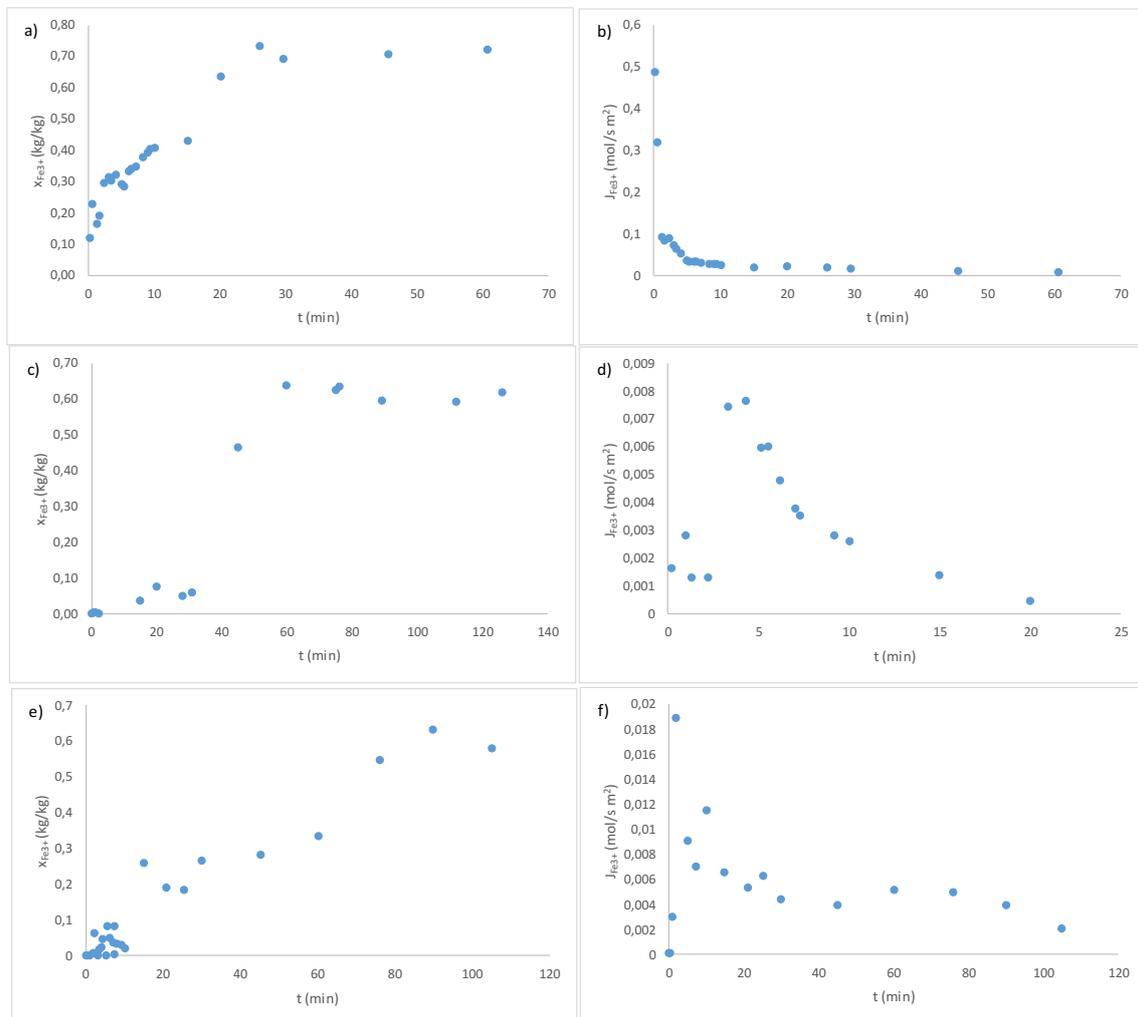


Figura 26. Evolución de la liberación de ion férrico donde a) es la fracción másica de ion férrico de la fase externa a las cápsulas y b) el flujo molar de ion férrico, ambos en un medio de pH 3; c) es la fracción másica de ion férrico de la fase externa a las cápsulas y d) el flujo molar de ion férrico, ambos en un medio de pH 4,7; e) es la fracción másica de ion férrico de la fase externa a las cápsulas y f) el flujo molar de ion férrico, ambos en un medio de pH 7.

A partir de variación de la concentración del ion férrico en el medio externo es posible calcular el flujo de salida del mismo a partir de la siguiente ecuación:

$$J_{Fe^{3+}} = \frac{\Delta(V \cdot \rho_i) \cdot x_{Fe^{3+}}^{FL} \cdot 10^{-3}}{S \cdot t \cdot M_{Fe^{3+}}} \quad (\text{Ec.7})$$

Donde $J_{Fe^{3+}}$ es el flujo molar de ion férrico (mol/s m^2), V es el volumen (m^3), ρ_i es la densidad de la mezcla agua/sal férrica (kg/m^3), $x_{Fe^{3+}}^{FL}$ es la fracción másica de ion férrico ($\text{kg}_{Fe^{3+}}/\text{kg}_T$), S la superficie (m^2), t el tiempo (s), $M_{Fe^{3+}}$ la masa molecular del hierro ($55,845 \text{ g/mol}$).

La evolución de los flujos molares de ion férrico se muestran en la figura 26 b, d y f.

Al comparar la evolución de la fracción másica de ácido ascórbico se puede observar como no muestra diferencias en la liberación del compuesto respecto al pH del medio, siendo un poco superior la velocidad de liberación en los medios ácidos. Sin embargo, en el caso del ion férrico la velocidad de liberación sí que se ordena en función del pH del medio externo, quizá inducida por el reactivo utilizado para ajustar el pH. Al utilizar HCl, los iones cloro, fuertemente cargados, generan atracción a los iones de hierro implementando la fuerza impulsora de transporte.

Para poder entender mejor el proceso de liberación es necesario acoplar en una única ecuación las distintas fuerzas impulsoras que inducen los dos transportes descritos anteriormente (flujo de fase líquida externa y del compuesto encapsulado). Con este fin, es posible mediante a la termodinámica irreversible describir el flujo neto de cualquier especie siguiendo el primer principio de Onsager (Castro-Giraldez et al., 2010):

$$J_n = L_n \cdot \Delta\mu_n \quad (\text{Ec.8})$$

Donde J_n es el flujo neto de la especie química en movimiento (mol/s m^2), L_n , es el coeficiente fenomenológico que expresa la facilidad de la especie química a moverse por el medio ($\text{mol}^2/\text{Jm}^2\text{s}$) y $\Delta\mu_n$ es la variación de potencial químico que induce el movimiento (J/mol).

Por lo tanto, será necesario desarrollar el potencial químico en cada caso para entender las fuerzas impulsoras involucradas en cada transporte.

En el caso de la fase líquida externa, casi en su mayoría es agua bidestilada con una cantidad mínima de HCl para ajustar el pH, por esta razón sería posible modelizar el potencial químico utilizando las propiedades del agua tan y como se muestra a continuación:

$$\Delta\mu_{FL} = \Delta\mu_w = RT \cdot \ln \frac{a_w^{FL}}{a_w^C} + v_w \cdot \Delta P \quad (\text{Ec.9})$$

Donde R es la constante de los gases ideales ($8,314 \text{ J/mol K}$), T la temperatura del medio (K), a_w^{FL} la actividad del agua de la fase líquida, a_w^C la actividad del agua en la cápsula, v_w es el volumen parcial molar del agua (inversa de la densidad molar del agua) expresado en (m^3/mol) y ΔP es la diferencia de presión entre el entorno (presión atmosférica) y el interior de la capsula (sobrepresión en contracción y sub-presión en expansión).

Es decir, en el caso de la fase líquida externa, al ser mayoritariamente agua, el flujo vendrá inducido fundamentalmente por dos motores, la actividad del agua y las fuerzas mecánicas inducidas por las expansiones.

En el caso de los compuestos encapsulados, al tener carga, los términos que habrá que tener en cuenta para calcular el potencial químico serán los asociados a especies químicas electrolíticas (Velázquez, et al., 2014):

$$\Delta\mu_i = RT \cdot \ln \frac{a_i^{FL}}{a_i^C} + \psi \cdot de + v_i \cdot \Delta P \quad (\text{Ec.10})$$

Donde R es la constante de los gases ideales (8,314 J/mol K), T la temperatura del medio (K), a_i^{FL} la actividad de la especie química encapsulada de la fase líquida, a_i^C la actividad de la especie química en la cápsula, v_i es el volumen parcial molar de la especie química expresado en (m^3/mol) y ΔP es la diferencia de presión entre el entorno (presión atmosférica) y el interior de la cápsula (sobrepresión en contracción y sub-presión en expansión).

En el caso del ácido ascórbico y del ion férrico, además de existir un gradiente asociado a la actividad de cada especie y a las expansiones de las cápsulas, también habrá un gradiente electromagnético asociado a las cargas, sobre todo en el caso del ion férrico que posee una gran fuerza iónica.

En la figura 27 se muestra un esquema con las variaciones de las fuerzas impulsoras que intervienen en el transporte de liberación.

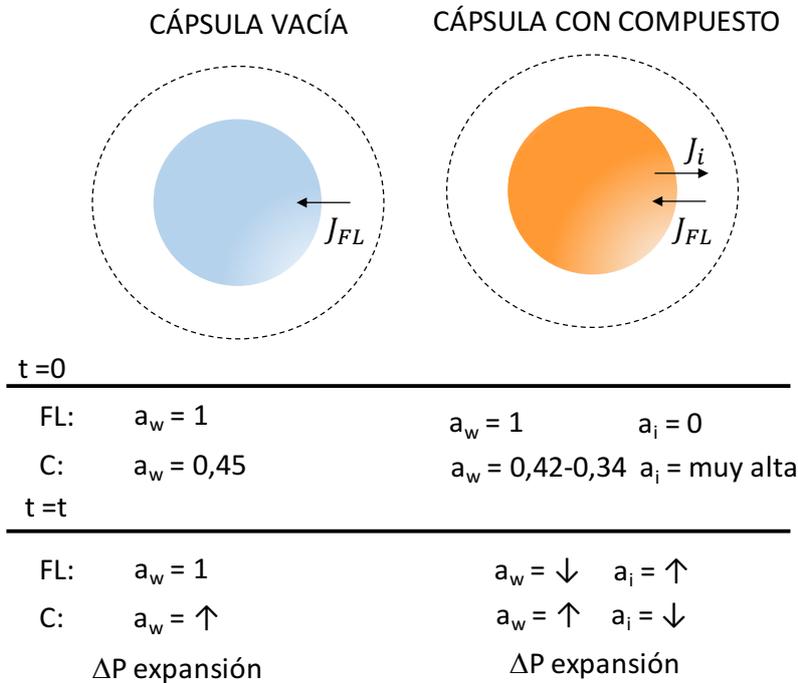


Figura 27. Esquema de fuerzas impulsoras sobre el transporte.

Como se puede observar en la figura, a tiempo cero, la actividad del agua en la fase líquida externa vale 1, manteniéndose constante a lo largo del tiempo en el caso de la cápsula vacía, pero disminuyendo en el caso de las cápsulas de ácido ascórbico e ion férrico. Además, en el interior de las cápsulas la actividad del agua es similar en todos los casos, por lo que inicialmente, y para todos los casos, el gradiente de agua es la primera fuerza impulsora que aparece provocando un flujo de agua al interior que genera una expansión de la cápsula. Dado que, en el caso de la cápsula vacía, el medio líquido mantiene la actividad del agua y no sufre flujos de salida, su expansión es mayor que las de las cápsulas llenas, tal y como se puede observar en las figuras 22a, 23a y 24a. Además, en el caso del ácido ascórbico y el ion férrico, la variación de actividad tanto de agua como de la propia especie varía más rápidamente con la variación de concentración en especies químicas electrolíticas, por lo que variara más en el ion férrico, por

esa razón sufre menores expansiones (Figuras 22a, 23a y 24a), alcanzan mayor concentración en fase líquida externa (Figura 26a, c y e) que el ácido ascórbico (Figura 25a, c y e), y por ende, mayores flujos (Figura 26b, d y f) que el ácido ascórbico (Figura 25b, d y f).

5. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un sistema de medida de propiedades dieléctricas en el espectro de la radiofrecuencia que ha permitido, además de monitorizar en línea los cambios de las propiedades dieléctricas en un medio líquido, además ha servido para monitorizar la liberación de especies químicas con alta o moderada fuerza iónica, encapsuladas en alginato cálcico.

Se ha demostrado la utilidad de la encapsulación de ion férrico con ácido ascórbico en alginato cálcico para la liberación en tracto digestivo, ya que se ha demostrado que la liberación se produce tanto en condiciones digestivas como en tiempos de digestión.

Por último, se ha modelizado las fuerzas impulsoras que inducen la liberación de las especies químicas encapsuladas, determinando los mecanismos involucrados.

6. BIBLIOGRAFÍA

AGUIRRE CALVO, (2013). Encapsulación de licopeno empleando polielectrolitos. Influencia del secado y congelado sobre su estabilidad. Tesis de máster, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

AGUIRRE CALVO, T. R.; SANTAGAPITA, P. (2016). Physicochemical Characterization of Alginate Beads Containing Sugars and Biopolymers. *Journal of Quality and Reliability Engineering*, 2016.

AGUIRRE CALVO, T.R.; Busch, V. M.; SANTAGAPITA, P.R. (2017). Stability and release of an encapsulated solvent-free lycopene extract in alginate-based beads. *LWT- Food Science and Technology*, 77, 406-412.

BLANCO-ROJO, R.; VAQUERO, M.P. (2018). Iron bioavailability from food fortification to precision nutrition - a review. *Journal of Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 126-138.

BOTICARIO, C.; CASCALES, M. (2012). *Digestión y metabolismo de nutrientes*. UNED. Madrid. 383 pp.

BOWMAN, B.; RUSSELL, R. (2003). Conocimientos actuales sobre nutrición. Washington, D.C.; OPS / ILSI; 2003. 873 p. ilus. (OPS Publicación científica y técnica, 592).

CASTRO-GIRÁLDEZ, M.; FITO, P.J.; FITO P., (2010). Non-equilibrium thermodynamic approach to analyze the pork meat (*Longissimus dorsi*) salting process. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 24-30.

CASTRO-GIRÁLDEZ, M.; FITO, P. J., PRIETO, J. M., ANDRÉS, A.; FITO, P. (2012). Study of puffing process of amaranth seeds by dielectric spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 298-304.

CONWAY, D.; HENDERSON, M.A., (2019). Iron metabolism. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 20, 175-177.

- DIAS, M.I.; FERREIRA, I.; BARREIRO, M.F. (2015). Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food Function*, 6 (4), 1035- 1052.
- DIKSON, E.A.; BROOKES, M.J., (2019). Common causes of iron deficiency anaemia in gastroenterology patients. *Medicine*, 47, 219-223.
- DRAKESMITH, H.; PRENTICE, A.M., (2012). Hepcidin and the iron-infection axis. *Science*, 338(6108), 768-772.
- DOMENICO, I.; MCVEY WARD, D.; KAPLAN, J. (2008). Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 72-81.
- ĐORĐEVIĆ, V.; BALANČ, B.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; LEVIĆ, S.; TRIFKOVIĆ, K.; KALUŠEVIĆIVANA KOSTIĆ, I.; KOMES, D.; BUGARSKI, B.; NEDOVIĆ, V., (2014). Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews*, 7, 452-490.
- FAO (1970). Como alimentar al mundo en 2050, Roma, Italia, Visto el día 10 de Julio de 2019.
http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/synthesis_papers/Cómo_alimentar_al_mundo_en_2050.pdf
- FANG, Y.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G.O.; NISHINARI, K.; FUNAMI, T.; WILLIAMS, P. A.; Li, L., (2007). Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(10), 2456-2462.
- GARCÍA-ROSOLEN, N.; EANDOI-EBERLE, S.; FELIU-TORRES, A.; MUSSO, A.M. (2010). Conceptos actuales sobre fisiología y patología del hierro. *Hematología*, 14 (2), 48-57.
- GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N., (1999). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 213-224.
- GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 194-205.
- JIMÉNEZ-MARTÍN, E.; GHARSALLAOUI, A.; PÉREZ-PALACIOS, T.; RUIZ, J.; ANTEQUERA, T. (2015). Suitability of Using Monolayered and Multilayered Emulsions for Microencapsulation of ω -3 Fatty Acids by Spray Drying: Effect of Storage at Different Temperatures. *Food and Bioprocess Technology*, 8 (1), 1100-1111
- KING A.H. (1995). Encapsulation of Food ingredients – a review of an available technology, focusing on Hydrocolloids. *In Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*.
- Nelson, C. R. & Datta, A. K. (2001). *Dielectric Properties of Food Materials and Electric Field Interactions en Handbook of microwave technology for food application*, Editorial CRC Press. Boca Raton, New York (E.E.U.U).
- NIKAKI, K.; DEGREE, M.; MRCPCHE.; CLINICAL RESEARCH FELLOW.; GUPTA, G.L.; MD (PAEDS INDIA).; DNB (PAEDS INDIA).; MRCPI, CONSULTANT PAEDIATRIC HEPATOLOGIST. (2016) Assessment of intestinal malabsorption. *Best practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30, 225-235.
- MARTIN, I.M.; BARREIRO, M.F.; COELHO, M.; RODRIGUEZ, A.E. (2014). Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245, 191-200.

PARADA, J.; AGUILERA, J. (2007). Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), 21-32.

PEREZ-MORAL, N.; CHUECA, M.; PARKER, R. (2013). Preparation of iron-loaded alginate gel beads and their release characteristics under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 31(1), 114-120.

PETTIT, K.; ROWLEY, J.; BROWN, N. (2011). Iron deficiency. *Paediatrics and Child Health*, 21(8), 339-343.

SALONEN, A.; WILLEM, M., (2014). Impact of diet human intestinal microbiota and health. *Annual review of Food Science and Technology*, 5, 239-262.

SANTAGAPITA, P.R. (2010). Estabilidad de enzimas en medios de distinta movilidad molecular, impacto de interacciones con azúcares y biopolímeros y de la encapsulación. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

SONEGO, J. M.; SANTAGAPITA, P. R.; PERULLINI, M.; JOBBAGY, M., (2016). Ca (II) and Ce (III) homogenous alginate hydrogels from the parent alginic acid precursor: a structural study. *Dalton Transactions*, 45(24), 10050-10057.

TALENS, C.; CASTRO-GIRÁLDEZ, M.; FITO, P. J. (2016a) Study of the effect of microwave power coupled with hot air drying on orange peel by dielectric spectroscopy. *LWT- Food Science and Technology*, 66, 622-628.

TRAFFANO-SCHIFFO, M.V. (2017). Espectrofotometría de Baja Frecuencia aplicada a Sistemas Alimentarios. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

VELÁZQUEZ, J., CASTRO-GIRÁLDEZ, M.; FITO, P.J.; FITO P., (2014) Thermodynamic analysis of salting cheese process. *J. Food Engineering* 130 36–44

VELÁZQUEZ, J. (2014). Estudios de los espectros dieléctricos en alimentos con estructura coloidal. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.