



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“Preparación y caracterización de microcápsulas de aceite
de pescado fuente de ácidos grasos esenciales, usando como
pared mucílago de linaza (*Linum usitatissimum*) por el
método de gelificación iónica”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

IBQ. Janet Ileri Arenas Sánchez

Asesor de tesis

Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo

Diciembre 2015 MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la UMSNH por haberme aceptado como alumna de la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios y una estancia en el extranjero.

A la Universidad Estatal de Washington por recibirme 4 meses en una estancia de investigación, la cual fue de gran valor para mi desarrollo académico.

Agradezco de manera especial a la Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo por todo el apoyo recibido para la realización del presente trabajo.

A los miembros de mi comité de tesis: Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, Dr. Rafael Salgado Garciglia, Dr. Jorge Isidro Aranda Sánchez y Dr. Juan José Valdez Alarcón, por sus consejos y aportaciones para en éste trabajo. Agradezco al Dr. Juan José las facilidades otorgadas en su laboratorio para la realización de las pruebas de microscopía láser confocal.

A la Dra. Marina Vega por apoyarme en el uso del microscopio electrónico de barrido.

Un agradecimiento especial al Dr. Manuel García por recibirme en su laboratorio *Biological Systems Engineering* y por su apoyo brindado durante mi estancia en Pullman, WA.

DEDICATORIA

A mi *papá* y mi *mamá* por su cariño, por estar siempre a mi lado y apoyarme incondicionalmente en la culminación de ésta meta.

A mis hermanas, porque son parte fundamental de mi vida. Las quiero mucho.

Índice

	Página
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 La semilla de linaza: generalidades	5
2.1.1 Composición de la semilla de linaza	6
2.2 Mucílago de linaza.....	6
2.2.1 Definición	6
2.2.2 Composición y estructura del mucílago	7
2.2.3 Extracción de mucílago	9
2.3 Fibra dietética (FD).....	10
2.3.1 Fibra dietética soluble (FDS).....	10
2.3.2 Fibra dietética insoluble (FDI)	11
2.3.3 Propiedades funcionales de la fibra dietética	11
2.4 Hidrocoloides.....	11
2.5 Viscosidad.....	12
2.5.1 Viscoelasticidad.....	13
2.6 Compuestos fenólicos	13
2.6.1 Compuestos fenólicos y su interacción con la fibra dietética (FD).....	14
2.7 Ácidos grasos omega-3.....	15
2.8 Microencapsulación	15
2.8.1 Materiales encapsulantes	16
2.8.2 Métodos de encapsulación.....	17
2.8.3 Gelificación iónica.....	17
2.8.4 Alginato	18
2.9 Técnicas de caracterización de microcápsulas.....	18
2.9.1 Microscopía óptica	18
2.9.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	19
2.9.3 Microscopía láser confocal (MLC).....	19

2.9.4	Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)	20
3.	JUSTIFICACIÓN	21
4.	HIPÓTESIS	22
5.	OBJETIVOS	23
5.1	Objetivos específicos	23
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1	Materiales	24
6.2	Extracción de mucílago	24
6.3	Métodos de secado	26
6.3.1	Deshidratación solar	26
6.3.2	Liofilización	26
6.4	Determinación del rendimiento	26
6.5	Determinación de propiedades funcionales	27
6.5.1	Capacidad de retención de agua (CRA)	27
6.5.2	Capacidad de retención de aceite (CRa)	27
6.5.3	Capacidad de absorción de agua (CAA)	27
6.5.4	Capacidad de gelificación	28
6.6	Composición química proximal	28
6.7	Determinación de compuestos bioactivos	28
6.7.1	Preparación del extracto de mucílago de linaza	28
6.7.2	Determinación de compuestos fenólicos totales	29
6.7.3	Determinación de flavonoides totales	29
6.7.4	Determinación de taninos condensados	30
6.8	Viscosidad	30
6.9	Determinación de color	30
6.10	Diagrama visual de fases	31
6.11	Preparación de emulsiones	31
6.11.1	Estabilidad de emulsiones	32
6.12	Microencapsulación por gelificación iónica	32
6.13	Caracterización de las microcápsulas de ácidos grasos omega-3	32
6.13.1	Microscopía óptica	32

6.13.2	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	33
6.13.3	Microscopía láser confocal (MLC).....	33
6.13.4	Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR).....	34
6.13.5	Eficiencia de microencapsulación (EM).....	34
6.14	Análisis estadístico	34
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
7.1	Mucílago de linaza por deshidratación solar (MLA).....	35
7.1.1	Caracterización del mucílago de linaza MLA en polvo: Composición química proximal, propiedades funcionales y propiedades fisicoquímicas	35
7.1.2	Diagrama visual de fases	42
7.1.3	Caracterización de microcápsulas de mucílago por deshidratación solar MLA: tamaño, morfología, microestructura y ubicación del aceite	45
7.2	Mucílago de linaza liofilizado MLB.....	56
7.2.1	Caracterización del mucílago de linaza MLB en polvo: Composición química proximal, propiedades funcionales y propiedades fisicoquímicas	56
7.2.2	Diagramas de fases MLB	64
7.2.3	Caracterización de microcápsulas con mucílago de linaza liofilizado MLB: tamaño, morfología, microestructura y ubicación del aceite microencapsulado	66
7.3	Discusión general.....	76
8.	CONCLUSIONES	78
9.	PERSPECTIVAS	80
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Índice de Figuras

	Página
Figura 2.1 Flores, cápsulas y semillas de linaza.....	5
Figura 2.2. Formación de mucílago en la semilla de linaza	7
Figura 2.3. Estructura primaria de L-arabino-D-xilano (AX)	8
Figura 2.4. Estructura del polisacárido ramnogalacturonano I.....	9
Figura 6.1. Diagrama de proceso de extracción de mucílago de la semilla de linaza.	25
Figura 6.2. a) Secador por deshidratación solar, b) Liofilizador <i>Virtis génesis 25 XL</i>	26
Figura 7.1. Composición elemental del mucílago de linaza MLA.....	37
Figura 7.2. Perfil de viscosidad del mucílago obtenido por deshidratación solar	40
Figura 7.3. Velocidad de rotación vs. Torque de las muestras de mucílago de linaza MLA.....	40
Figura 7.4. Coloración del polvo de mucílago de linaza por deshidratación solar.....	41
Figura 7.5. Fotografía de la fase sol del sistema mucílago de linaza MLA.	42
Figura 7.6. Fotografías de las fases del sistema alginato de sodio. a) Sol, b) Gel y c) Sinéresis	43
Figura 7.7. Diagramas de fases de mucílago de linaza, alginato de sodio, alginato-mucílago. a) mucílago de linaza MLA b) alginato de sodio, c) Al-MLA 3:1, d) Al-MLA 1:2, e) Al-MLA 1:1, f) Al- MLA 1:3.....	44
Figura 7.8. Imágenes por microscopía óptica de las microcápsulas preparadas con alginato y mucílago de linaza MLA. (A) Alginato (control), (B) Al:MLA 3:1 (F1), (C) Al:MLA 1:2 (F2), (D) Al:MLA 1:3 (imagen comparativa).....	45
Figura 7.9. Micrografías de microcápsulas de alginato (muestra control)	47
Figura 7.10. Micrografías de microcápsulas de mucílago de linaza MLA. (a) Al:MLA 3:1 (F1), (b) Al:MLA 1:2 (F2).....	47
Figura 7.11. Ajuste del espectro de los canales de los fluorocromos en sus longitudes de excitación. .	48
Figura 7.12. Micrografías de las microcápsulas Formulación control (alginato) y microcápsulasde alginato sin aceite como blanco.	49
Figura 7.13. Micrografías de las microcápsulas Formulación F1 (Al:MLA 1:2) y F2 (Al:MLA 3:1)..	50
Figura 7.14. Espectro de alginato de sodio	51
Figura 7.15. Espectro IR del mucílago de linaza MLA.....	52
Figura 7.16. Espectro FTIR del aceite de atún omega-3 (DHA/EPA).	53
Figura 7.17. Espectros FTIR de los componentes de las microcápsulas: Alginato de sodio (Al), aceite de atún omega-3 (DHA/EPA), Mucílago de linaza por deshidratación solar (MLA), Microcápsulas formulación F1 (Al:MLA 3:1), Microcápsulas formulación F2 (Al:MLA 1:2), y Microcápsulas formulación control (Al:ML 1:0).	54

Figura 7.18. Aceite superficial extraído de las microcápsulas a diferentes formulaciones. Formulación control (Alginato), F1(Al:MLA 3:1) y F2 (Al:MLA 1:2).....	55
Figura 7.19. Eficiencia de encapsulación de microcápsulas producidas con diferentes combinaciones de material pared. Control (Alginato), F1(Al:MLA 3:1), F2 (Al:MLA 1:2)	55
Figura 7.20. Composición elemental del mucílago de linaza MLB	58
Figura 7.21. Perfil de viscosidad del mucílago de linaza MLB	62
Figura 7.22. Velocidad de rotación vs. Torque de las muestras de mucílago de linaza MLB	62
Figura 7.23. Coloración del polvo de mucílago de semilla de linaza MLB	63
Figura 7.24. Fotografías de las fases de los sistemas alginato-mucílago de linaza. a) Sol, b) Gel y c) Sinéresis.	64
Figura 7.25. Diagramas de fases de mucílago de linaza MLB, alginato de sodio, algintato-mucílago. a) mucílago de linaza MLB b) alginato de sodio, c) Al-MLB 3:1, d) Al-MLB 1:2, e) Al-MLB 1:1, f) Al-MLB 1:3	65
Figura 7.26. Imágenes por microscopía óptica de las microcápsulas preparadas con alginato y mucílago de linaza MLB. (A) Alginato (control), (B) Al:MLB 3:1 (F1), (C) Al:MLB 1:2 (F2), (D) Al:MLB 1:3 (imagen comparativa).....	66
Figura 7.27. Micrografías de microcápsulas de alginato (muestra control)	68
Figura 7.28. Micrografías de microcápsulas de mucílago de linaza MLB. (A) Al:MLB 3:1 (F3), (B) Al:MLB 1:2 (F4).....	68
Figura 7.29. Micrografías de las microcápsulas Formulación control (alginato) y Alginato sin aceite como blanco.	69
Figura 7.30. Micrografías de las microcápsulas Formulación F3 (Al:MLB 1:2) y F4 (Al:MLB 3:1)..	70
Figura 7.31. Espectro FT-IR del mucílago de linaza MLB.....	71
Figura 7.32. Espectros FTIR de los componentes de las microcápsulas MLA: Alginato de sodio (Al), Ácido graso omega 3 (DHA), Mucílago de linaza por deshidratación solar (MLB), Microcápsulas formulación F3 (Al:MLB 3:1), Microcápsulas formulación 4 (Al:MLB 1:2), y Microcápsulas formulación control (Al:ML 1:0).....	72
Figura 7.33. Aceite superficial extraído de las microcápsulas a diferentes formulaciones. Formulación control (Alginato), F3(Al:MLB 3:1) y F4 (Al:MLB 1:2).	73
Figura 7.34. Eficiencia de encapsulación de microcápsulas producidas con diferentes combinaciones de material pared. Control (Alginato), F3(Al:MLB 3:1), F4 (Al:MLB 1:2).....	74

Índice de Tablas

	Página
Tabla 2.1. Tipos de material de recubrimiento utilizados en microencapsulación.....	16
Tabla 2.2. Clasificación de métodos de encapsulación	17
Tabla 6.1. Composición de polímeros de las formulaciones de microcápsulas.	31
Tabla 7.1. Pruebas de caracterización química y rendimientos de extracción del mucílago de linaza MLA.....	36
Tabla 7.2. Concentración mínima de gelificación (CMG) del mucílago de linaza MLA a diferentes concentraciones	38
Tabla 7.3. Parámetros de color (L^* , a^* y b^*) de los polvos de mucílago de linaza MLA.	41
Tabla 7.4. Tamaño de las microcápsulas de mucílago de linaza MLA.....	46
Tabla 7.5. Pruebas de caracterización química y rendimientos de extracción del mucílago de linaza MLB.....	57
Tabla 7.6. Concentración mínima de gelificación (CMG) del mucílago de linaza MLB a diferentes concentraciones.....	60
Tabla 7.7. Parámetros de color (L^* , a^* y b^*) de los polvos de mucílago de linaza liofilizado.....	63
Tabla 7.8. Tamaño de microcápsulas obtenidos de cada formulación	67

RESUMEN

La tecnología de microencapsulación ha sido el concepto central de esta investigación y las áreas analizadas en relación a la misma son la aplicación del mucílago de linaza como un encapsulante, que protegerá a ácidos grasos omega-3 (DHA/EPA). El estudio y caracterización de microcápsulas compuestas de mucílago de linaza y alginato de sodio que contienen DHA/EPA encapsulado, se desarrolló usando semillas de linaza (*Linum usitatissimum*) color café-marrón y se obtuvo el mucílago por medio de extracción acuosa, seguida de precipitación con etanol empleando dos métodos distintos de secado: liofilización y deshidratación solar. La composición química proximal, las propiedades funcionales y las propiedades fisicoquímicas, fueron determinadas a los polvos de mucílago de linaza. Se utilizó aceite de atún refinado como fuente de los ácidos grasos omega-3, el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA). La microencapsulación de las fuentes de AGPI omega-3 es un medio para mejorar su estabilidad. En este trabajo, las microcápsulas de AGPI omega-3 se prepararon mediante gelificación iónica usando mucílago de linaza y alginato de sodio, como materiales pared. Los objetivos principales de esta investigación fueron (1) evaluar la capacidad del mucílago de linaza como material pared en un sistema de AGPI omega-3, usando el método de gelificación iónica y (2) caracterizar las microcápsulas obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía láser confocal (MLC), espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier y reflectancia atenuada (FTIR-ATR), así como la determinación de la eficiencia de encapsulación. La eficiencia de encapsulación (EE) osciló entre 93% y 95%, con la EE más alta observada para las microcápsulas preparadas a partir de alginato de sodio y mucílago de linaza liofilizado con una relación de 3:1 alginato/mucílago. El tamaño medio de las microcápsulas varió de 19 μm a 51 μm , con una morfología esférica e irregular de acuerdo a las observaciones por microscopía electrónica de barrido y microscopía láser confocal. Los resultados sugieren que el mucílago de linaza mezclado con alginato de sodio tiene la capacidad para ser utilizado como material pared para la encapsulación de DHA/EPA u otros aceites usando el método de gelificación iónica.

Palabras clave: extracción, alginato de sodio, liofilización, caracterización, microscopía

ABSTRACT

Microencapsulation technology has been the central concept of this research and the areas analyzed in relation to it are the application of flaxseed mucilage as an encapsulant, which will protect omega-3 (DHA / EPA) fatty acids. The study and characterization of microcapsules composed of sodium alginate and flaxseed mucilage containing DHA / EPA encapsulated, was developed using brown flaxseeds (*Linum usitatissimum*), and flaxseed mucilage was obtained by aqueous extraction followed by ethanol precipitation using two different drying methods: freeze drying and solar drying. The nutritional content, the functional properties and physicochemical properties were determined in linseed mucilage powders. Refined tuna oil was used as a source of omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). Microencapsulation of omega-3 PUFA sources is one means of improving their stability. In this work, omega-3 PUFA microcapsules were prepared by ionic gelation using linseed mucilage and sodium alginate as wall materials. The primary objectives of this research were to (1) to evaluate the ability of flaxseed mucilage as wall material in an omega-3 PUFA system, using the method of ionic gelation and (2) to characterize the microcapsules obtained by scanning electron microscopy (SEM), confocal laser microscopy (MLC), infrared spectroscopy and Fourier transform attenuated reflectance (FTIR-ATR) and to determine the encapsulation efficiency. The encapsulation efficiency (EE) was 93% and 95%, with the highest EE observed for microcapsules prepared from sodium alginate and linseed mucilage lyophilized with a ratio of 3: 1 alginate / mucilage. The average size of the microcapsules ranged from 19µm to 51µm with an irregular spherical morphology, according to observations by scanning electron microscopy and laser confocal microscopy. The results suggest that the flaxseed mucilage mixed with sodium alginate has the potential to be used as wall material for the encapsulation of DHA / EPA or other oils using ionic gelation method.

Key words: extraction, sodium alginate, freeze drying, characterization, microscopy

1. INTRODUCCIÓN

La microencapsulación puede definirse como un proceso en el que partículas diminutas o gotas se envuelven por un recubrimiento para dar lugar a cápsulas pequeñas. El material dentro de la microcápsula se conoce como fase interna o núcleo, mientras que el recubrimiento se denomina pared o membrana. La microencapsulación es un ejemplo de tecnología que tiene el potencial para enfrentar el reto de incorporar y liberar con éxito ingredientes funcionales en un rango amplio de alimentos. Los alimentos funcionales son aquellos que contienen componentes que poseen actividad biológica capaz de promover la salud. Cuando se demuestra que un alimento actúa beneficiosamente sobre alguna función corporal más allá de sus propiedades nutricionales básicas, éste se considera un “alimento funcional”. Estos alimentos están relacionados con mejoras significativas en la salud y bienestar físico en general y/o con la reducción del riesgo de enfermedades crónicas (Salta y col., 2005).

Algunos de los materiales encapsulantes utilizados en la microencapsulación de los alimentos son las proteínas, azúcares, almidones, gomas, lípidos y materiales celulósicos. El mucílago de linaza en combinación con quitosano se ha reportado en la microencapsulación de Levosalbutamol Sulfato como inhalador en seco contra el asma (Patel y col., 2013); y la pectina de linaza con alginato se ha examinado en la microencapsulación de aceite de hígado de tiburón (Díaz-Rojas y col., 2004). Un número considerable de investigaciones han estudiado la estabilidad oxidativa de aceites de pescado, microencapsulado con diferentes materiales pared utilizando los procesos químicos y físicos de microencapsulación disponibles. Se ha reportado que el mucílago de linaza (*Linum usitatissimum*) es un polisacárido heterogéneo soluble en agua que presenta varios oligo- y polisacáridos que imparte propiedades gelificantes (Hunt & Jones, 1962). Dado que este mucílago es una fuente rica de polisacáridos y debido a su notable capacidad de absorción de agua y aceite y capacidad emulsificante, se ha seleccionado como material pared para la microencapsulación de DHA/EPA por el método de gelificación iónica.

La incorporación de los aceites de pescado como fuente de ácidos grasos omega-3 en productos alimenticios podría tener beneficios para la salud. Sin embargo, los aceites de pescado tienen olores fuertes y se oxidan fácilmente debido a la alta susceptibilidad al oxígeno de los ácidos grasos altamente insaturados. Una de las metodologías propuestas para la

protección de aceite de pescado es la microencapsulación, que es la tecnología de una fina capa continua que se forma alrededor de sólidos, líquidos o materiales gaseosos en cápsulas selladas en miniatura (Pothakamury & Barbosa-canovas, 1995; Barbosa-Canovas y col., 2005). Esta tecnología permite presentar al aceite de pescado de un líquido a un ingrediente sólido con mayor estabilidad oxidativa.

El aceite de pescado es rico en ácidos grasos omega-3, por lo que son fácilmente sujetos a la oxidación. La oxidación afecta a las propiedades sensoriales de los alimentos en los que el aceite se incorpora por impartir un sabor y olor “a pescado”. Por lo tanto, para producir alimentos con componentes lipídicos fisiológicamente bioactivos, se deben desarrollar métodos para controlar las reacciones oxidativas. La técnica de microencapsulación se ha sugerido como un medio para preservar compuestos reactivos, sensibles o volátiles para ser convertidos en ingredientes estables.

El enfoque de este proyecto se basa en desarrollar microcápsulas de DHA/EPA usando aceite de atún refinado (como fuente de ácidos grasos omega-3) por el método de gelificación iónica y evaluar las propiedades de las microcápsulas. La primera parte del estudio consistió en la extracción y obtención del mucílago de linaza en polvo empleado dos diferentes métodos de secado: deshidratación solar y liofilización; además se realizó el análisis de composición proximal, la determinación de propiedades funcionales y fisicoquímicas de ambos polvos. La segunda parte investigó la formulación de las microcápsulas y su caracterización, (a) explorando la localización del aceite encapsulado utilizando microscopía láser confocal (MLC); (b) examinar la superficie exterior de las partículas encapsuladas por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB); (c) la investigación de la relación entre la capacidad de encapsulación y la espectroscopia por infrarrojo FTIR; y (d) la eficiencia de encapsulación (EE).

2. ANTECEDENTES

2.1 La semilla de linaza: generalidades

La semilla de linaza (*Linum usitatissimum* L.) es una oleaginosa de la familia Linaceae, originaria de la región mediterránea de Europa. Morfológicamente la planta de linaza es pequeña de tallo único y a partir de cuya base o parte media-superior (dependiendo de la variedad), se desprenden múltiples ramas que finalizan en inflorescencias y posteriormente en cápsulas dentro de las cuales se encuentra las semillas de linaza. El color de la flor también es dependiente de la variedad y puede ser blanca, violeta o azul (Flax Council of Canada, 2015).

La semilla de linaza es de 4 a 6 mm de longitud, aplanada, de forma oval y con un extremo aguzado. La cubierta de la semilla es de apariencia suave y brillante, y su color puede variar entre marrón oscuro y amarillo claro (Figura 2.1). El color de la semilla está determinado por la cantidad de pigmentos concentrados en la capa externa. La semilla tiene dos cotiledones aplanados, que constituyen la mayor proporción del embrión; este último está rodeado por las cubiertas de la semilla y por una delgada capa de endospermo. La testa tiene una capa exterior que contiene la mayoría de la fibra soluble y dos interiores ricas en fibra y lignanos. Desde un punto de vista estructural, la testa, endospermo y cotiledones representan el 22, 21 y 57 % del total de la semilla, respectivamente (Daun y col., 2003).



Figura 2.1 Flores, cápsulas y semillas de linaza.

(Tomado de: <http://flaxcouncil.ca/resources/image-catalogue/>)

En las últimas décadas ha surgido un gran interés por la semilla de linaza debido al reconocimiento de algunos de sus componentes que ofrecen potenciales beneficios para la manutención de la salud y la prevención de algunas enfermedades crónicas. Entre estos compuestos con actividad biológica destacan, el ácido alfa linolénico, los lignanos y la fibra dietética (Figuerola y col., 2008). Estos compuestos, aunque están ubicados en diferentes partes de la semilla, interactúan entre si durante la extracción y el procesamiento, lo que plantea grandes desafíos para su utilización (Oomah, 2003; Hall y col., 2006).

2.1.1 Composición de la semilla de linaza

La semilla de linaza es rica en grasa, proteína y fibra dietética, en promedio contiene de 30 a 40% de aceite, 20 a 25 % de proteína, 20 a 28 % de fibra dietética total, de 4 a 8% de humedad y de 3 a 4% cenizas el aceite contiene vitaminas A, B , D y E , minerales y aminoácidos. La composición proximal varía considerablemente entre las variedades y de acuerdo a las condiciones ambientales en las que haya crecido la planta. En virtud de la presencia de componentes fisiológicamente activos que pueden proporcionar beneficios para la salud más allá de la nutrición básica, la semilla de linaza es a menudo considerada como un alimento funcional (Herchi y col., 2012).

2.2 Mucílago de linaza

2.2.1 Definición

El mucílago es un constituyente común de las plantas que se puede extraer de semillas o tallos suaves de plantas como: okra (de *Hibiscus esculentus*), psyllium (de especies de *Plantago*), mostaza amarilla (de *Sinapis alba*) y linaza (de *Linum usitatissimum*) (Izydorczyk y col., 2005). Se compone de polisacáridos heterogéneos, formados por diferentes azúcares y en general llevan ácidos urónicos. Se caracterizan por formar disoluciones coloidales viscosas y geles en agua. Varias partes de la planta (por ejemplo: las paredes celulares, exudados de árboles, semillas, tubérculos/raíces, algas) tienen células superficiales que contienen gomas, mucílagos y compuestos proteicos. Los mucílagos son producidos por varias plantas como

resultado de los mecanismos de protección contra daño mecánico o de tipo microbiano (Rana y col., 2011).

2.2.2 *Composición y estructura del mucílago*

El mucílago de linaza se produce principalmente en la capa más externa de la semilla como se muestra en la Figura 2.2 (Cunnane & Thompson, 1995).

La cubierta de la semilla de linaza, junto con el endospermo, forma seis capas. Esta fracción rica en fibra es capaz de liberar material mucilaginoso fácilmente cuando se pone en contacto con agua. El mucílago es fácilmente extraíble de la cubierta de la semilla por inmersión en agua. Cuando se hidratan las semillas, las células productoras de mucílago se expanden y su contenido exuda en la superficie de las semillas. Ésta fracción constituye aproximadamente el 8 % del peso total de la semilla.

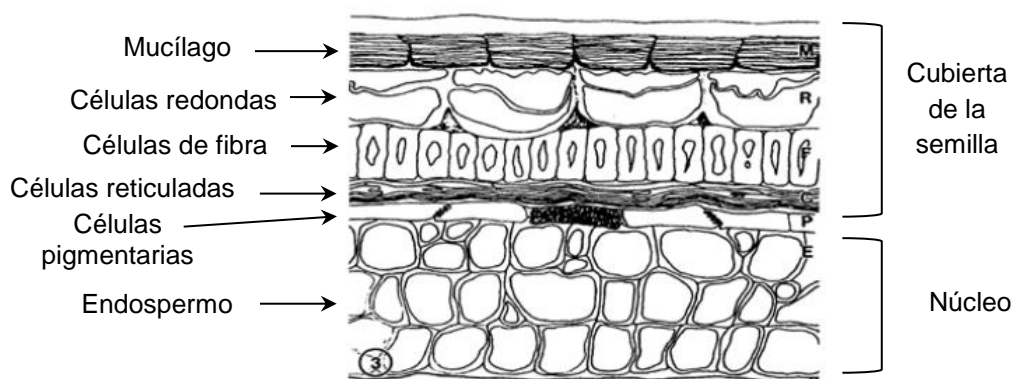


Figura 2.2. Formación de mucílago en la semilla de linaza

[Tomado de: (Cunnane & Thompson, 1995)]

La linaza es única entre las semillas oleaginosas y los cereales debido a su alto contenido de mucílago ubicado en las capas externas de la semilla, el cual pertenece a la fracción soluble de la fibra dietética. El mucílago de linaza contiene entre 50-80 % de carbohidratos y 4-20 % de proteínas y cenizas. El constituyente principal de mucílago de linaza consta de dos componentes de polisacáridos, que se caracterizan como una mezcla de arabinoxilanos neutros y polisacáridos ácidos de ramnosa (Cui y col.,1994; Ricky & Biliaderis, 1994 ;Warrand y col., 2005).

Los arabinoxilanos (AX) se han identificado en una gran variedad de los principales cereales comerciales: trigo, centeno, cebada, avena, arroz y el maíz. Ellos representan el componente principal de hemicelulosa de las paredes celulares del endospermo amiláceo (harina) y capas exteriores (salvado) del grano de cereal. Además, se han encontrado ácidos fenólicos como el ácido ferúlico y ácido cumárico esterificados en O-5 de algunos residuos de arabinosa en AX (Ebringerová y col., 2005). La fracción ácida de polisacáridos consiste en ramnogalacturanos tipo I (Guilloux y col., 2009). El ramnogalacturonano-I (RG-I) es una familia de polisacáridos pécticos que representa del 20-35% de la pectina.

El mucílago está compuesto por dos polisacáridos, uno neutro (aproximadamente 75%) y otro ácido. El polímero neutro está formado por una cadena de β -D-Xilosa unida con enlaces 1-4, que tiene cadenas laterales de arabinosa y galactosa en posición 2 y 3 (Figura 2.3). El polímero ácido está formado por una cadena principal de residuos de (1-2)- α -L ramnopiranosil y de ácido (1-4)- D-galactopiranosilurónico, con cadenas laterales de fucosa y galactosa (Figura 2.4).

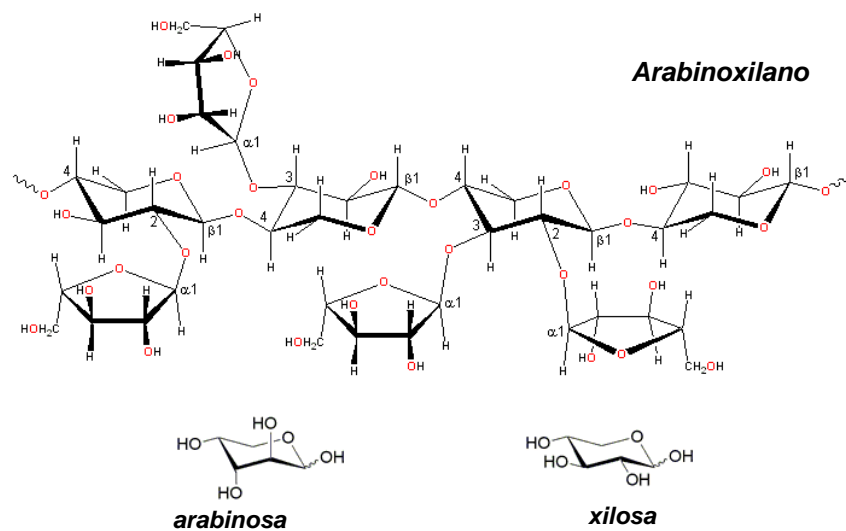


Figura 2.3. Estructura primaria de L-arabino-D-xilano (AX)

[Tomado de: (Ebringerová y col., 2005)]

El componente principal del polímero neutro es la xilosa (62.8%) y el del polímero ácido es la ramnosa (54.5%), por lo que la relación ramnosa/xilosa se usa frecuentemente para estimar la

relación entre polisacáridos ácidos/neutros. Esta relación fluctúa entre 0.3 y 2.2. Los estudios realizados acerca de la composición del mucílago de la linaza indican que la composición de monosacáridos del mucílago varía significativamente entre diferentes variedades de semillas de linaza. Las variedades con mayor contenido de polisacáridos neutros muestran mayor viscosidad aparente y formación de geles más firmes. El mucílago de linaza es un hidrocoloide complejo polidisperso y los diferentes comportamientos reológicos observados en las variedades de semilla es provocado tanto por las diferencias en la proporción entre los polímeros neutros y ácidos, el peso molecular y la conformación estructural de los polisacáridos (Hall y col., 2006).

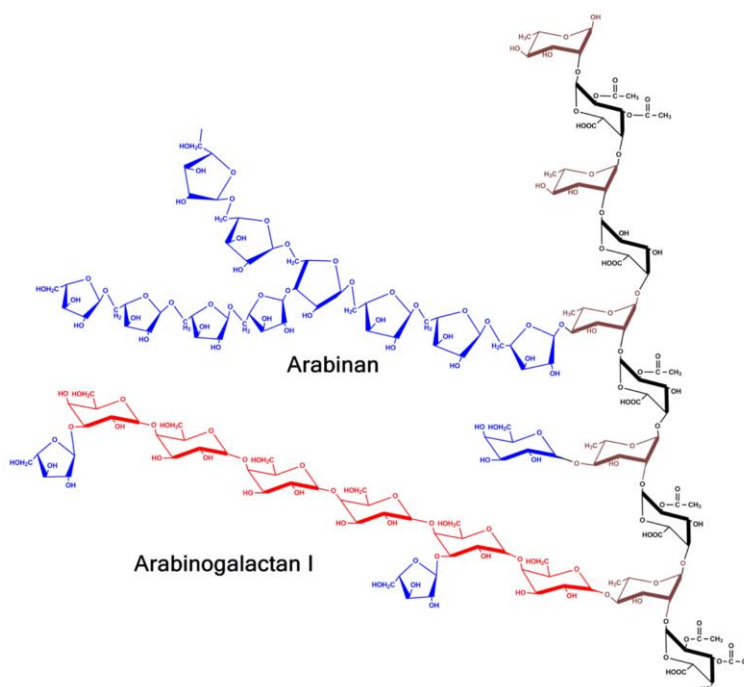


Figura 2.4. Estructura del polisacárido ramnagalacturonano I.
[Tomado de: (Ochoa-Villarreal y col., 2012)]

2.2.3 Extracción de mucílago

El método más común utilizado para el aislamiento de mucílago de linaza es la extracción acuosa, seguido de precipitación con etanol. La precipitación con alcohol no sólo se utiliza para recuperar los polisacáridos disueltos, sino que también elimina los glucósidos

cianogénicos potencialmente tóxicos, que es probable se extraen junto con el mucílago (Rickard & Thompson, 1997).

La extracción acuosa permite remover la mayor parte del mucílago. Sin embargo, una sola etapa de extracción no permite obtener una semilla libre de mucílago. Se ha demostrado un mejor rendimiento al aplicar tres etapas de extracción bajo parámetros determinados, logrando la extracción del 98.3-99.1% de las sustancias solubles en agua de la semilla de linaza (Ziolkowska, 2012).

2.3 Fibra dietética (FD)

El concepto de fibra dietética total abarca aquellos polisacáridos, exceptuando el almidón, y los no polisacáridos como la inulina, que forman parte de la estructura de la pared celular de las plantas que no son digeridos por las enzimas del tracto gastrointestinal humano, pero si están sujetos a cierta degradación en el intestino grueso por fermentación bacteriana como la lignina, celulosas hemicelulosas, β -glucanos, pectinas, gomas, mucílago, oligofruktosa y almidón resistente (American Association of Cereal Chemists, 2010).

Actualmente, la FD es el principal ingrediente de alimentos funcionales (constituye más del 50% del total de ingredientes usados a nivel mundial) y se está incorporando progresivamente a todo tipo de alimento y bebidas como factor de calidad nutricional muy apreciado por los consumidores. Los efectos fisiológicos de la fibra dietética se relacionan con sus propiedades fisicoquímicas y tecnológicas, como capacidad de retención de agua, capacidad de hinchamiento, viscosidad, formación de gel, capacidad de ligazón de sales biliares. Estas propiedades dependen de su relación fibra insoluble/fibra soluble, tamaño de partícula, condiciones de extracción y fuente vegetal de origen (Figuerola y col., 2005).

2.3.1 Fibra dietética soluble (FDS)

La fibra dietética puede clasificarse como soluble e insoluble de acuerdo a su comportamiento en medio acuoso. La fibra soluble en contacto con agua forma un retículo donde ésta queda atrapada, dando lugar a soluciones de gran viscosidad. Los efectos derivados de la viscosidad de la fibra son los responsables de sus acciones sobre el metabolismo lipídico, hidrocarbonado

y en parte de su potencial anticarcinogénico. Dentro de este grupo se encuentran gomas, mucílagos, algunas pectinas, ciertos tipos de hemicelulosas y polisacáridos solubles.

2.3.2 *Fibra dietética insoluble (FDI)*

Las fibras insolubles son capaces de retener el agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad, lo cual produce un aumento del volumen de la masa fecal, acelerando el tránsito intestinal. Estas fibras incluyen celulosa, lignina y algunas fracciones de hemicelulosa. La fibra insoluble presente en la linaza principalmente lignina y celulosa, ha sido poco estudiada en comparación con la fibra soluble, debido a que a esta última se le atribuyen mayores beneficios y propiedades funcionales (Oomah & Mazza, 1998; Daun y col., 2003).

2.3.3 *Propiedades funcionales de la fibra dietética*

Denominadas así por su posible asociación con efectos fisiológicos benéficos en el organismo, conocidas también como propiedades fisicoquímicas por su dependencia con la estructura química de los polisacáridos constituyentes y la influencia de factores como el tamaño de partículas, pH, temperatura y fuerza iónica (Fleury & Lahaye, 1991), estas propiedades son: capacidad de retención de agua, capacidad de absorción de agua, capacidad de retención de aceite, viscosidad.

2.4 Hidrocoloides

Los hidrocoloides son polímeros de alto peso molecular (polisacáridos y proteínas) que tienen una gran afinidad por el agua donde se dispersan y forman soluciones coloidales. En la actualidad, los hidrocoloides son comúnmente empleados en una diversa variedad de sectores industriales como ingredientes con funciones espesantes y gelificantes de soluciones acuosas, estabilizantes de espumas, emulsiones y dispersiones, agentes inhibidores del crecimiento de cristales, liberación controlada de sabores, encapsulantes, formadores de películas y modificadores de textura (Williams & Phillips, 2000). La utilización de hidrocoloides depende de sus propiedades funcionales únicas tales como la viscosidad, gelificación, propiedades emulsionantes y espumantes.

Por otra parte, muchos hidrocoloides pueden formar geles. Los geles son redes que contienen agua aunque presentan un comportamiento tipo sólido dependiente de la concentración de las macromoléculas. Su dureza y fragilidad están asociadas a la estructura del hidrocoloide presente. Los hidrocoloides gelifican cuando los puentes de hidrógeno intra e intermoleculares son favorecidos lo suficiente, con respecto a los puentes de hidrógeno formados con las moléculas de agua para superar el costo entrópico (Stephen y col., 2006). A menudo, los hidrocoloides exhiben un delicado balance entre hidrofobicidad e hidrofiliidad. Los hidrocoloides extendidos tienden a formar una red a más altas concentraciones y las moléculas similares pueden envolverse una alrededor de la otra (formando zonas de uniones tipo hélice) sin pérdida de uniones puente de hidrógeno, reduciendo la heterogeneidad conformacional y minimizando la superficie hidrofóbica de contacto con el agua. En esas circunstancias puede necesitarse la formación de un número mínimo de uniones para superar el efecto entrópico y formar una unión estable.

2.5 Viscosidad

La reología se ha definido como una ciencia dedicada al estudio de la deformación y el flujo (Barnes y col., 1989). Es la rama de la física que estudia el comportamiento de los fluidos sometidos a diferentes tipos de esfuerzos. Tiene que ver con el estudio de las relaciones entre la fuerza, la deformación, tiempo y otros parámetros.

La viscosidad describe la resistencia de un fluido a fluir, y es la relación entre la velocidad de cizallamiento y el esfuerzo cortante. La viscosidad es el comportamiento reológico básico que caracteriza el comportamiento de flujo de los sistemas líquidos. La composición química y la concentración de polisacárido, así como las condiciones ambientales, como el pH, la temperatura, y la condición de procesamiento están relacionados con alteraciones en la viscosidad de fibras dietéticas en soluciones (Dikeman & Fahey, 2006).

Los fluidos que tienen un único valor de viscosidad a temperatura y presión constante para cualquier velocidad de cizalla (independiente del tiempo), se denominan fluidos Newtonianos. En términos generales, en los fluidos newtonianos la viscosidad es constante, es decir que son aquellos fluidos no estructurados, compuestos por moléculas simples, con un comportamiento puramente viscoso el cual puede ser descrito, en todo el rango del gradiente de medición,

mediante la Ley de Newton y su viscosidad sólo depende de las variables presión y temperatura. Hay una gran variedad de fluidos cuyo comportamiento no se ajusta al de un líquido newtoniano, al menos en un cierto rango de esfuerzo (Rohn, 1995). Estos fluidos suelen ser sistemas dispersos (emulsiones, suspensiones, etc.), soluciones de macromoléculas (fluidos biológicos) o materiales fundidos (plásticos) con un cierto grado de estructuración. En este punto hay que distinguir entre un comportamiento newtoniano y un fluido no newtoniano. Un fluido no newtoniano puede tener un comportamiento newtoniano en un cierto rango de esfuerzo lo suficientemente bajo para no modificar su estructura. Sin embargo, la aplicación de un esfuerzo superior a un valor crítico modifica la estructura y por lo tanto, la viscosidad del fluido. Por ello, el concepto de viscosidad como propiedad intrínseca desaparece y en todo caso, puede hablarse de una viscosidad aparente. En los fluidos no newtonianos, la relación entre el esfuerzo y el gradiente de velocidad deja de ser lineal y puede ser muy variada, obteniendo diferentes tipos de comportamiento.

2.5.1 *Viscoelasticidad*

La mayoría de los sistemas alimenticios presentan estructuras complejas las cuales exhiben características del tipo viscosas y elásticas, simultáneamente. Este tipo de materiales reciben el nombre de viscoelásticos y tienen la característica de disipar parte de la energía de deformación al fluir y almacenar otra parte, utilizada para recuperar parcialmente la forma original al desaparecer la fuerza externa aplicada (Barnes y col., 1989)

Un gran número de materiales presenta tanto un comportamiento viscoso como elástico, por ejemplo pueden mencionarse los polímeros orgánicos, materiales de construcción, plásticos, etc. En el campo de los alimentos se pueden aportar ejemplos donde, además del aroma, el sabor y la apariencia, la viscoelasticidad influye en la aceptación por parte del consumidor, como son los emulsificantes, agentes estabilizantes, hidrocoloides, polímeros biológicos, pectinas, mayonesas, goma de mascar, etc. (Borwankar & Shoemaker, 1992).

2.6 Compuestos fenólicos

La fibra dietética siempre se encuentra en los alimentos o suplementos de fibra como una matriz vegetal que puede llevar compuestos bioactivos asociados, entre los que destacan

compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Hall y col., 2006), y son considerados los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta (Manach y col., 2004).

En las oleaginosas, los principales compuestos fenólicos que se encuentran son derivados hidroxilados de los ácidos benzoico y cinámico, cumarinas, flavonoides y lignanos (Hall y col., 2006). Existen variaciones importantes entre variedades de plantas y por las condiciones ambientales donde se desarrollan. Los ácidos fenólicos más abundantes en la harina de semilla de linaza descascarada son el trans-ferúlico (46%) trans-sinápico (36%) *p*-cumárico (7.5% y trans-cafeico (6.5%). También, se ha reportado que la goma de linaza (mucílago) puede tener cantidades considerables de ácidos fenólicos (Figuerola y col., 2008).

2.6.1 Compuestos fenólicos y su interacción con la fibra dietética (FD)

Generalmente a estos compuestos bioactivos la literatura científica los analiza por separado, como compuestos que no tienen relación alguna. Sin embargo, existen reportes que demuestran que alrededor del 50% de los antioxidantes dietarios totales —principalmente compuestos fenólicos— se encuentran ligados a la matriz de fibra dietética de los alimentos vegetales, los cuales pueden alcanzar el colon. La FD y cantidades considerables de compuestos fenólicos siguen un proceso fisiológico común y sinérgico dentro del tracto digestivo. Por lo tanto, la presencia de compuestos fenólicos y otros compuestos asociados a la FD pueden afectar significativamente sus propiedades fisiológicas y los efectos a la salud (Saura-Calixto, 2011). Los compuestos fenólicos están conformados por anillos aromáticos y grupos hidroxilo y tienen además la habilidad de unirse a polisacáridos y proteínas de diferentes sitios de la pared celular. Los compuestos fenólicos se unen por puentes de hidrógeno (entre el grupo hidroxilo del compuesto fenólicos y el átomo de oxígeno del enlace glucosídico del polisacárido), interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes como el éster entre ácidos fenólicos y polisacáridos. Las interacciones entre compuestos fenólicos y la pared celular del alimento vegetal pueden depender de la porosidad específica y de las propiedades de la superficie, lo cual pueden restringir el tamaño de la partícula que penetra la pared celular.

2.7 Ácidos grasos omega-3

El aceite de pescado es una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (AGPI ω 3) ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) y ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), así como otros ácidos grasos poliinsaturados menos estudiados. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son ácidos grasos que contienen dos o más dobles enlaces. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6 se consideran ácidos grasos esenciales, que significa que son importantes para la salud humana, pero no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano y deben ser adquiridos a través de la dieta. Los AGPI se han asociado con numerosos beneficios para la salud, incluyendo la prevención de trastornos cardiovasculares, la diabetes, la artritis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedades autoinmunes, cáncer y depresión (Young, 2001; Shahidi, 2008). Además, los AGPI juegan un papel importante en la fluidez de la membrana, en el desarrollo del cerebro y el ojo y la expresión génica (Young, 2001). El DHA es un componente principal de los lípidos en el cerebro y es crítico para el desarrollo cerebral (Shahidi, 2008).

El mercado mundial de alimentos está actualmente interesado en los alimentos que proporcionan no sólo valor nutritivo, sino también beneficios para la salud al ser humano. Una de estas categorías de productos alimenticios es uno de los llamados "alimentos funcionales" que actualmente está creciendo rápidamente en la cuota de mercado y la investigación científica en esta área ha proliferado enormemente. Los aceites de pescado son considerados alimentos funcionales, debido al hecho de que son excelentes fuentes alimenticias de los importantes ácidos grasos omega-3, especialmente los AGPI [EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico)]. Muchas investigaciones han demostrado que el aceite de pescado como suplemento puede ser beneficioso para la función saludable del corazón, el cerebro y el sistema nervioso (Lands, 2005).

2.8 Microencapsulación

La microencapsulación se ha definido como la tecnología de envasado de sólidos, líquidos y materiales gaseosos en pequeñas cápsulas que liberan su contenido a velocidades controladas en períodos de tiempo prolongados (Champagne & Fustier, 2007). La sustancia que se encapsula puede ser llamada agente activo, fase interna o núcleo y el material que recubre es

llamado pared, material de revestimiento, matriz, material de soporte o fase externa (Zuidam & Nedovic, 2010).

El objetivo principal es construir una barrera entre el componente de la partícula y el medio ambiente (Fuchs y col., 2006). La pared protege el núcleo contra el deterioro, que puede conducir a la pérdida del valor nutricional y el desarrollo de sabores desagradables (Velasco y col., 2000). La microencapsulación también se utiliza para transformar líquidos en polvos secos, mejorar las propiedades de manipulación, limitar las pérdidas de materiales volátiles, y controlar la liberación de material activo (Onwulata y col., 1994). La microencapsulación es un ejemplo de tecnología que tiene el potencial para enfrentar el reto de incorporar con éxito ingredientes funcionales en diversos tipos de alimentos.

2.8.1 Materiales encapsulantes

Los materiales de recubrimiento se seleccionan de una amplia variedad de polímeros sintéticos y naturales (Tabla 2.1), estos materiales se pueden mezclar entre ellos para obtener propiedades de barrera y mecanismos de liberación específicos; o se puede combinar con modificadores como antioxidantes o surfactantes. Existe una amplia variedad de materiales para cobertura que pueden ser usados para encapsular ingredientes alimentarios.

Tabla 2.1. Tipos de material de recubrimiento utilizados en microencapsulación.

Tipo de material	Materiales de recubrimiento
Gomas	Goma arábica, agar, alginato de sodio, carragenina
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz
Celulosas	Carboximetil-celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa
Lípidos	Ceras, parafinas, tristearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites, grasas
Proteínas	Gluten, caseína, grenetina, albúmina
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos

Tomado de: (Yáñez y col, 2005).

2.8.2 *Métodos de encapsulación*

Existen diversos métodos para la producción de microcápsulas. En general, estos métodos se pueden dividir en tres grupos como se describe en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Clasificación de métodos de encapsulación

	Método de encapsulación	Tamaño de partícula (μm)
Procesos Físicos	Secado por aspersión	1–50
	Extrusión	200–2000
Procesos Químicos	Polimerización interfacial	0.1 – 5
	Inclusión molecular	1–1000
Procesos Físicoquímicos	Coacervación	1 – 1000
	Liposomas	5-200
	Gelificación iónica	>100

Tomado de: (Yáñez y col, 2005).

La selección del proceso de encapsulación para una aplicación considera el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo.

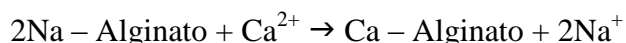
2.8.3 *Gelificación iónica*

En esta técnica la formación de la cubierta de las cápsulas tiene lugar por una reacción de gelificación iónica entre un polisacárido y un ion de carga opuesta. También se conoce como método de goteo con alginato, éste ha sido extensamente utilizado debido a que es un método fácil de reproducir a nivel laboratorio. El proceso se lleva a cabo rápidamente y se puede encapsular cualquier tipo de alimento ya sea hidrofóbico, hidrofílico, termosensible, líquido ó sólido (Gouin, 2004).

El método consiste en suspender el compuesto que se va a encapsular en una solución acuosa de alginato sódico, adicionando la mezcla, mediante goteo, sobre una solución acuosa de CaCl_2 que se encuentra sometida a una velocidad de agitación adecuada. Al entrar la gota de

alginato sódico en contacto con Ca^{2+} , se produce la gelificación instantánea de la misma, obteniéndose una membrana o cubierta de alginato cálcico que es insoluble en agua pero permeable (Wandrey y col, 2010).

La reacción que tiene lugar es:



2.8.4 Alginato

El alginato es un polisacárido que se obtiene de algunas “algas marrones”, algas de gran tamaño, entre las que se encuentran fundamentalmente *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Macrocystis pyrifera*, ente otras. El alginato es uno de los biopolímeros más versátiles y es ampliamente utilizado en la industria de alimentos y farmacéutica. Sus principales propiedades son: estabilizante, espesante, gelificante y formador de películas (Junter & Vinet, 2009). El alginato está formado por dos tipos de monosacáridos: el ácido galurónico y el ácido manurónico. Las algas sintetizan el alginato inicialmente como un polímero de ácido manurónico, que posteriormente modifican transformando unidades de manurónico en galurónico.

2.9 Técnicas de caracterización de microcápsulas

2.9.1 Microscopía óptica

El microscopio óptico es el instrumento más ampliamente utilizado para la visualización de las estructuras a la escala de unos pocos micrómetros. La luz visible como un medio de imágenes no suele inducir cambios artificiales en la muestra (Hoppert, 2003). Si la muestra no es muy colorida, el contraste se debe introducir para hacerlo visible. Esto se logra comúnmente por el uso de colorantes o satenes de especificidad conocida para los diferentes componentes de la muestra.

2.9.2 *Microscopía electrónica de barrido (MEB)*

La Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) es una técnica que permite la observación y caracterización superficial de cualquier material, ya sea orgánico e inorgánico, analizando la morfología de la superficie de la muestra, así como también su composición química (Aguilera, 2005). Tiene una gran profundidad de campo, lo cual permite que se enfoque una gran parte de la muestra, a la vez que reproduce imágenes de alta resolución. A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con él se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de diversos materiales, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas.

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que emplea el bombardeo de un haz de electrones acelerados hasta una longitud de onda cien mil veces menor a la de la luz blanca, y condensados por lente electromagnéticas. Es así, que debido a la generación de señales ocasionadas del impacto de electrones con la muestra, se obtiene una imagen (Aguilera & Stanley, 1990).

2.9.3 *Microscopía láser confocal (MLC)*

El microscopio de barrido láser confocal (MLC) es un dispositivo útil para obtener información completa sobre polímeros en una red tridimensional 3D. Las diferentes fases, así como los gradientes de concentración del polímero pueden ser detectables bajo esta técnica microscópica. Los polímeros normalmente no poseen componentes fluorescentes y necesitan ser etiquetados con fluorocromos. La intensidad de la luz fluorescente estará relacionada con la concentración de los componentes marcados fluorescentemente (Ribbe, 1997). La unión cualitativa de diferentes polímeros pueden ser identificados en el microscopio confocal, marcando los polímeros con diferentes fluorocromos. Los fluorocromos emitirán luz a diferentes longitudes de onda, por lo tanto cada polímero dará lugar a diferentes colores que podrían separarse fácilmente uno del otro en el microscopio.

2.9.4 *Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)*

La espectroscopía de infrarrojo FTIR se basa en el hecho de que la mayoría de las moléculas absorben la luz en la zona infrarroja ($4,000$ a 400 cm^{-1}) del espectro electromagnético, esta absorción corresponde específicamente a los enlaces presentes en la molécula. La muestra es irradiada por un amplio espectro de luz infrarroja y el nivel de absorbancia a una frecuencia particular se traza después de una transformación de Fourier de los datos. El espectro resultante es característico de las moléculas orgánicas presentes en la muestra. Debido a que los enlaces químicos absorben la energía infrarroja a frecuencias específicas (longitudes de onda), la estructura básica de los compuestos puede ser determinada por la ubicación en el espectro de sus absorbancias en IR. En la espectroscopia FTIR, la luz se dirige sobre la muestra de interés y la intensidad se mide usando un detector de infrarrojos. La intensidad de la luz que incide sobre el detector se mide en función de la posición del espejo, y ésta es luego transformada por Fourier para producir un gráfico de intensidad vs. número de onda (Maddams & Hendra, 1996).

3. JUSTIFICACIÓN

El mucílago de linaza se emplea comúnmente en la industria cosmética como agentes de textura, sin embargo, en la industria alimentaria su aplicación aún no ha sido ampliamente examinada. Las investigaciones sobre el mucílago de linaza se han centrado en la caracterización completa y la extracción de polisacáridos de la semilla de linaza.

El mucílago de linaza es un hidrocoloide con buena capacidad de retención de agua debido a su marcada capacidad de incrementar su volumen, puede formar geles termo-reversibles, presenta alta viscosidad en soluciones acuosas y posee propiedades emulsificantes y gelificantes. Tales características le permiten al mucílago de linaza funcionar como encapsulante con propiedades deseables en la formación de microcápsulas. El mucílago de linaza ha mostrado un gran potencial como un hidrocoloide para alimentos, lo que sugiere ser adecuado para una amplia gama de aplicaciones e incluso podría ser producido y utilizado para reemplazar la mayor parte de gomas no gelificantes de la industria alimentaria y no alimentaria. El mucílago de linaza también tiene la ventaja de un costo relativamente bajo en comparación con la mayoría de las gomas comerciales.

4. HIPÓTESIS

El mucílago de linaza es capaz de funcionar como material pared independientemente del proceso de obtención para obtener microcápsulas protegiendo a los ácidos grasos esenciales de aceite refinado de atún, favoreciendo la emulsión o/w de DHA/EPA y la solución acuosa de mucílago de linaza.

5. OBJETIVOS

Utilizar el mucílago de semilla de linaza (*Linum usitatissimum*) como material pared en un sistema de microencapsulación de ácidos grasos omega-3, usando el método de gelificación iónica. Su incorporación como un nuevo biomaterial en un proceso de microencapsulación permitirá evaluar su potencial como matriz polimérica, actuando como un medio de protección.

5.1 Objetivos específicos

- a. Extraer el mucílago de semilla de linaza y obtenerlo en polvo mediante deshidratación solar y liofilización.
- b. Determinación de la composición química del mucílago de linaza en polvo por deshidratación solar y liofilización.
- c. Establecer las condiciones de proceso de microencapsulación por gelificación iónica para la formación de microcápsulas.
- d. Caracterizar las microcápsulas por Microscopía con focal y Microscopía electrónica de barrido, FTIR, FTIR-ATR.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Las semillas enteras de linaza (color café-marrón) utilizadas para la extracción de mucílago por deshidratación solar se adquirieron en el comercio local por la distribuidora “Cereales Castillo” de la ciudad de Morelia, Michoacán. Las semillas enteras de linaza (color café-marrón, lote: bulk bin #1404 - flaxseeds) para extracción de mucílago liofilizado se adquirieron en el supermercado “WinCo Foods” en la ciudad de Moscow, Idaho, USA.

El alginato de sodio tipo Manugel DMB (con alto contenido de grupos gulurónicos, lote G3909401) fue adquirido por *FMC Biopolymers*. El aceite refinado de atún (como fuente de ácidos grasos Omega-3: Ácido Docosahexaenoico (DHA) y Ácido Eicosapentaenoico (EPA); con un contenido total de ácidos grasos omega-3 de 820 mg/g) fue adquirido por Enzacta. El cloruro de calcio anhidro (pureza 96%) fue adquirido por Meyer. Alcohol etílico 96° (alcohol de caña) fue adquirido por Distribuidora Alcohólica de Morelia.

6.2 Extracción de mucílago

El proceso de extracción utilizado se resume en la Figura 6.1. El mucílago de linaza fue extraído a partir de semillas de linaza usando el método descrito por Qian y col. (2012), con algunas modificaciones. El mucílago se obtuvo remojando las semillas enteras de linaza en agua destilada (1:8 p/v), de 8 a 12 horas, a temperatura ambiente y con agitación manual durante los primeros 15 min para lograr la completa hidratación de las semillas y evitar su aglomeración. El agua añadida a las semillas se dividió en 3 partes (35% primer ciclo, 35% segundo ciclo y 30% el tercer ciclo), llevando a cabo 3 ciclos de extracción en la etapa de remojo para obtener el mucílago más concentrado y lograr un mayor rendimiento. Las semillas se separaron del extracto acuoso usando una tela filtrante de 1 mm de apertura. Las partículas insolubles en agua se eliminaron por una segunda filtración del mucílago a través de una malla de seda. La solución acuosa de mucílago se mezcló con un volumen de etanol al 95% para precipitar el mucílago y se dejó reaccionar por 1 hora previo a la centrifugación. El precipitado se recuperó por centrifugación de la mezcla a 3000 g durante 10 min y fue secado por dos métodos: liofilización y secado solar.

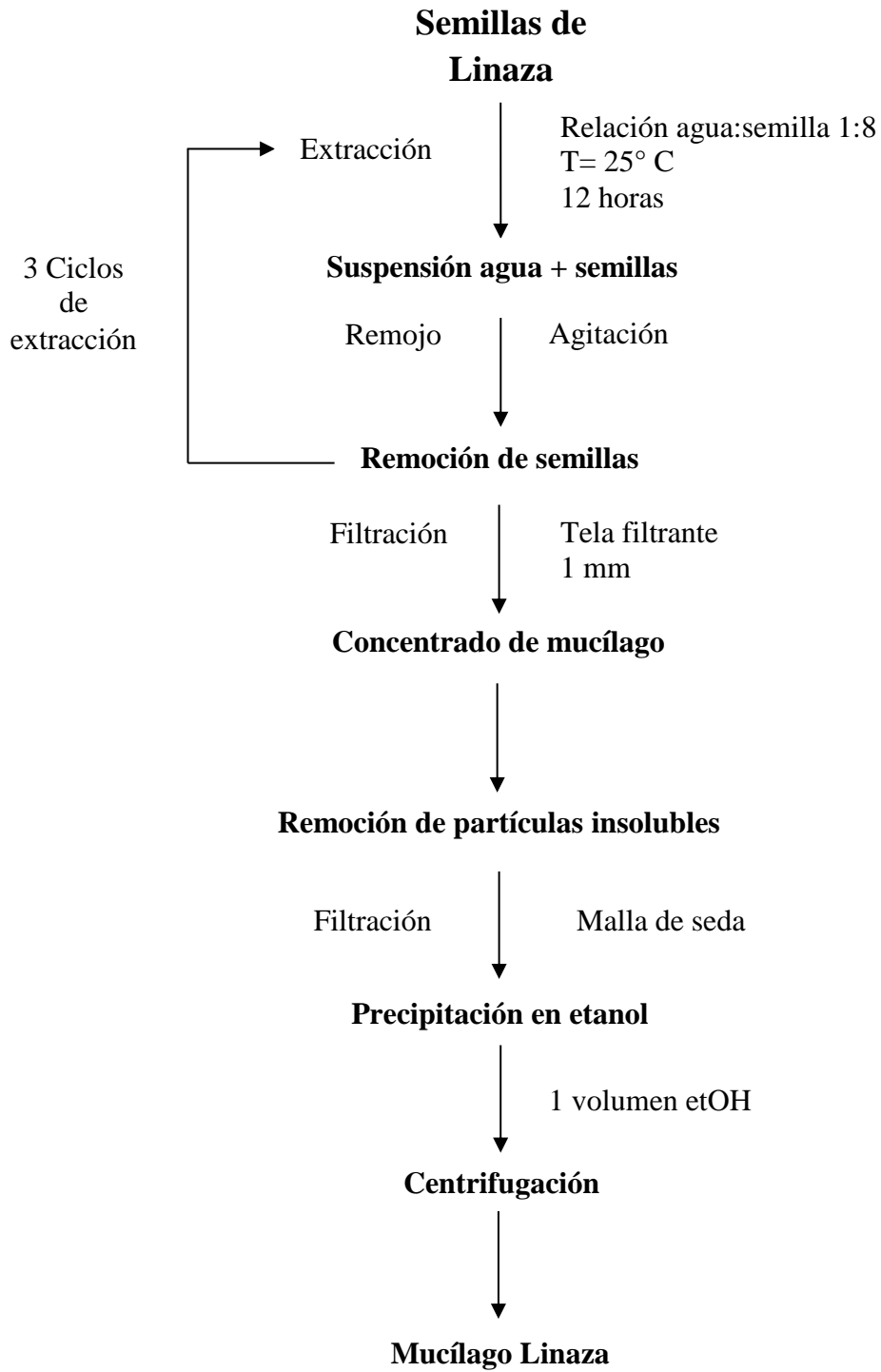


Figura 6.1. Diagrama de proceso de extracción de mucílago de la semilla de linaza.

6.3 Métodos de secado

6.3.1 *Deshidratación solar*

Se utilizó un prototipo diseñado y construido en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos de la facultad de Químico-Farmacobiología de la UMSNH, el cual emplea energía solar para la deshidratación de alimentos (Figura 6.2a). La temperatura de trabajo mínima que se alcanza es de 50°C.

6.3.2 *Liofilización*

En el proceso de liofilización se utilizó un equipo *Virtis génesis 25 XL* (Figura 6.2b), su condensador trabajó a una temperatura de -77.6°C y a una presión de 16mTorr. Estas fueron las condiciones adecuadas de secado por liofilización para obtener el polvo de mucílago de linaza. Las muestras se depositaron en bandejas de aluminio formando capas de 5 mm de espesor y se congelaron a -20°C por 2 h antes de la liofilización.

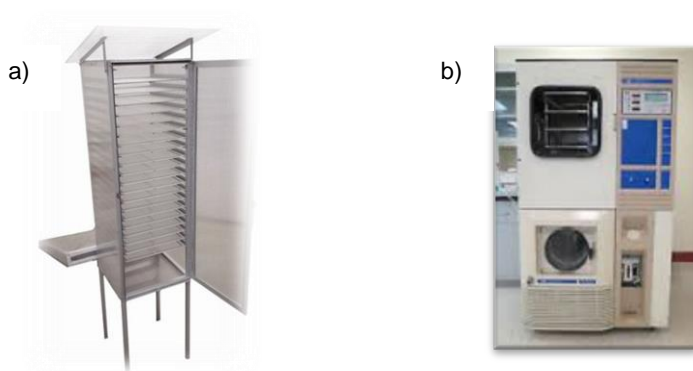


Figura 6.2. a) Secador por deshidratación solar, b) Liofilizador *Virtis génesis 25 XL*

6.4 Determinación del rendimiento

El rendimiento de extracción se obtiene al calcular el porcentaje de mucílago extraído con relación al peso de semillas.

El rendimiento de los sólidos de mucílago de linaza (R) fue calculado a partir de la ecuación:

$$R = \frac{m_{MS}}{m_{LS}} \cdot 100$$

donde m_{MS} es el peso de mucílago seco en polvo, g; m_{LS} es el peso de linaza seca antes de la extracción, g.

6.5 Determinación de propiedades funcionales

6.5.1 Capacidad de retención de agua (CRA)

El método propuesto por Chau y Huang (2003) se utilizó con algunas modificaciones. En un tubo para centrifuga de 50 mL se colocaron 0.5 g de muestra en base seca y se adicionaron 40 mL de agua destilada, se colocaron los tubos en una placa de agitación durante 24 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 2500 g por 30 min (Centrificient CRM Globe). El volumen del sobrenadante se midió en probetas de 10 mL. La capacidad de retención de agua se expresa como los mL de agua retenidos por gramo de muestra en base seca.

6.5.2 Capacidad de retención de aceite (CRa)

La prueba se realizó por el método propuesto por Chau y Huang (2003), con algunas modificaciones. En tubos Falcon de 50 mL se pesaron 0.5 g de muestra y se mezclaron con aceite vegetal de maíz (1:10). La mezcla se agitó en un vortex durante 30 min y posteriormente se centrifugó a 2500 g por 30 min (Centrificient CRM Globe). Se midió el volumen del sobrenadante en probetas de 10 ml. La capacidad de retención de aceite se expresa como los gramos de aceite retenidos por un gramo de muestra.

6.5.3 Capacidad de absorción de agua (CAA)

De acuerdo al método de Beuchat (1997) se pesaron 0.5 g de muestra de mucílago de linaza en polvo, se adicionaron 40 mL agua destilada y se agitó en un vortex durante 1 min, posteriormente se centrifugó a 4000 g por 35 min (Centrificient CRM Globe). El sobrenadante fue separado en una probeta graduada de 10 mL, donde se midió su volumen. La CAA fue expresada como gramos de agua absorbida por cada gramo de muestra.

6.5.4 Capacidad de gelificación

A partir de las muestras en polvo se prepararon suspensiones en agua destilada a diferentes concentraciones 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5% (p/v), se pesan 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 y 0.35 g de muestra en tubos Falcon y se adicionan 10 ml de agua destilada en cada tubo. Los tubos se introdujeron en un baño de agua a 100 °C durante 1 h y, a continuación se colocaron en un baño de hielo durante 1 h (Chau y Cheung, 1998). La capacidad de gelificación se define como la menor concentración de gelificación (MCG) a la que la muestra no se desliza por las paredes al invertir los tubos.

6.6 Composición química proximal

El estudio de la composición química del mucílago de linaza se realizó de acuerdo a los métodos oficiales de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC). El contenido de humedad se determinó por el método de la estufa (AOAC 934.01), las cenizas por calcinación en mufla (AOAC 923.03) y el contenido graso por el método de Soxhlet (AOAC 963.15). La determinación de fibra dietética se realizó por el método enzimático de Prosky y col. (1998). El contenido de proteína se realizó por determinación de nitrógeno en un analizador elemental (TruSpec CHN, Leco). El factor utilizado para calcular proteína fue 6.25.

6.7 Determinación de compuestos bioactivos

6.7.1 Preparación del extracto de mucílago de linaza

Para la determinación de compuestos bioactivos en mucílago de semillas de linaza (*Linum usitatissimum*), se llevó a cabo la extracción metanólica de las muestras de mucílago de linaza en polvo. La cual sirvió para la posterior determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y taninos condensados. El extracto se preparó de la siguiente manera

- i. Se pesa 1 g de muestra de mucílago de linaza en polvo en tubos Falcon de 15 mL previamente cubiertos con papel aluminio, posteriormente se adicionan 10 mL de metanol y la mezcla se mantiene en agitación constante por 24 h.

- ii. Se centrifuga a 4300 rpm/ 10 min, se separó el sobrenadante y se colocó en un matraz de 100 ml protegiéndose de la luz y los extractos se guardan a 4°C hasta su utilización.

6.7.2 *Determinación de compuestos fenólicos totales*

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó usando el método fotocolorimétrico Folin-Ciocalteu descrito por (Singleton & Rossi, 1965). Este método se basa en la oxidación de los polifenoles en medio básico, los cuales reaccionan con los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, formando un complejo colorido que es proporcional a la cantidad presente de polifenoles. En esta técnica se utiliza como estándar al ácido gálico.

Se tomó una alícuota de 40 µl de extracto, se diluye con 460 µl de agua, se le adicionan 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v), se mezcla por 5 min. Se le adicionan 1250 µL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) (20%) se incuba por 2 h a temperatura ambiente protegiéndose de la luz y se lee la absorbancia a 765 nm en espectrofotómetro. Los resultados se expresan como mg equivalente de ácido gálico/gramo de muestra (mgEAG/g).

6.7.3 *Determinación de flavonoides totales*

El contenido de flavonoides presentes en el mucílago de linaza, se determinó mediante el método fotocolorimétrico descrito por Oomah y col., 2005. Se basa en la reacción en metanol del compuesto 2-aminoetil difenilborato con el grupo hidroxilo de los flavonoides en la posición 2' del anillo B para formar el 2'- difenilborato del flavonoide, presentando una coloración amarilla en medio neutro. Para su determinación se hace reaccionar 200 µL del extracto con 80 µL de 2-aminoetil difenilborato y 720 µL de agua destilada. Se incuba por 30 min en la obscuridad y su absorbancia se lee a 404 nm. Se utiliza como estándar al flavonoide rutina. Los resultados se expresan como (mg E Rutina/ g muestra).

6.7.4 Determinación de taninos condensados

Para determinar el contenido de taninos se usa el método colorimétrico de la vainillina-HCl y como estándar catequina, (Deshpande y Cheyran, 1987). Se basa en la habilidad de los taninos condensados para reaccionar con la vainillina en medio ácido produciendo color rojo. Para esta determinación se toma una alícuota de 100 μ L de extracto que se hace reaccionar con 500 μ L de vainillina HCl 8% (1:1), se mezcla protegiéndose de la luz y se lee la absorbancia a 492 nm en el espectrofotómetro. Los resultados se expresan como (mg E Catequina/ g muestra).

6.8 Viscosidad

La viscosidad aparente se determinó a diferentes concentraciones de mucílago de linaza, usando un viscosímetro Brookfield Programmable DV- II+. Se utilizó la aguja No. 3 y se tomaron lecturas en un rango de velocidad de rotación de 0.5 a 100 rpm a temperatura ambiente. Se prepararon soluciones al 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, y 2.5% (p/v). El tiempo de equilibrio entre las mediciones fue de 30 s. Los valores de viscosidad fueron expresados en centipoise (cP), y el torque en porcentaje (%).

6.9 Determinación de color

La determinación de color se realizó a cada una de las muestras utilizando un colorímetro Konica Minolta CM-5 Spectrophotometer, con iluminante D65 (luz de día) y observador patrón 10° que define el ángulo de observación. Se colocaron las muestras en una placa de Petri de 7 cm de diámetro para capturar la imagen. Se obtuvieron parámetros de luminosidad (L^*), componente (a^*) y componente (b^*). El parámetro L mide el nivel de luminosidad desde el cero (0) o negro hasta el cien (100) o blanco; los parámetros a y b, miden la intensidad de los colores rojos (+) o verde (-), y amarillo (+) o azul (-), respectivamente.

Las medidas de color fueron expresadas por los valores especiales obtenidos a partir del sistema CIE- $L^* a^* b^*$.

6.10 Diagrama visual de fases

El diagrama visual de fases se elaboró de acuerdo a la metodología descrita por Perrechil y col. (2011), con algunas modificaciones. El biopolímero se disuelve en agua destilada a temperatura ambiente a diferentes concentraciones: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 % (p/v) y se mezcla cada una de las concentraciones de la solución polimérica con las soluciones de sal divalente de CaCl_2 en sus diferentes concentraciones: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 % (p/v), generando una matriz con todas sus combinaciones. Se prepararon mezclas de dos componentes, mucílago de linaza y alginato en proporciones 3:1, 1:2 y 1:3. Se toma una alícuota de 2.5 ml de la solución polimérica y se transfiere a un tubo de ensayo que contenga 0.5 ml de la solución de cloruro de calcio. Se agitan los tubos en un vortex durante 10 s y después de 24 h de reposo se evalúa la formación del gel visualmente. A partir de esta información se construye el diagrama de transición de sol-gel.

6.11 Preparación de emulsiones

Las emulsiones se prepararon con el mucílago de linaza liofilizado o el mucílago obtenido por deshidratación solar en combinación con alginato de sodio a diferentes concentraciones, de acuerdo a la Tabla 6.1. La concentración total de sólidos (material pared + aceite) se fijó en 1%. Los materiales pared se disolvieron en agua destilada, a 35°C para facilitar su disolución, bajo agitación magnética un día antes de la homogenización. El aceite de atún como fuente de ácidos grasos omega 3 (DHA/EPA), se añadió a la solución polimérica a una concentración del 20% con respecto al total de sólidos. Se formaron las emulsiones usando un homogeneizador Ultra - Turrax (IKA, México) a 18,000 rpm durante 5 min. Las emulsiones se prepararon siguiendo la técnica de Carneiro y col. (2013), con algunas modificaciones.

Tabla 6.1. Composición de polímeros de las formulaciones de microcápsulas.

Ingrediente	Ingrediente/Composición (% p/v)				
	Control	F1	F2	F3	F4
Alginato	1	3	1	3	1
MLA (mucílago solar)	--	1	2	--	--
MLB (mucílago liofilizado)	--	--	--	1	2

6.11.1 Estabilidad de emulsiones

Inmediatamente después de la preparación de la emulsión, se transfieren 8 ml de cada muestra a tuyos de ensayo de 15 ml y se sellan, almacenando a temperatura ambiente durante un día. El volumen de la fase superior se mide después de 24 h. Se midió la estabilidad por porcentaje (%) de separación y se expresa como:

$$\%Separación = \frac{H_1}{H_0} \times 100$$

Donde H_0 representa la altura inicial de la emulsión y H_1 es la altura de la fase superior.

6.12 Microencapsulación por gelificación iónica

Las microcápsulas se forman al atomizar la emulsión sobre una solución de CaCl_2 bajo agitación magnética constante. La emulsión se conduce a través de una bomba peristáltica hacia un atomizador de fluido doble, con una boquilla de diámetro de apertura (Φ 0.7 mm) y flujo de aire comprimido ($1.58 \text{ kgf/cm}^2 = 22.5 \text{ lb/in}^2$), posicionado a 20 cm de altura de la solución de CaCl_2 al (1% p/v); el flujo de alimentación fue controlado por la velocidad de flujo de la bomba peristáltica (3ml/min). Las microcápsulas se mantienen en la solución de cloruro de calcio durante 30 min (tiempo de curado) para asegurar la gelificación completa. Después del tiempo de curado, las microcápsulas se enjuagan con agua destilada sobre tamices de acero inoxidable (Φ 44 micras) de diámetro. Se realiza siguiendo la técnica de Rodrigues y col. (2014), con algunas modificaciones.

6.13 Caracterización de las microcápsulas de ácidos grasos omega-3

6.13.1 Microscopía óptica

Para observar la morfología de las microcápsulas húmedas se utilizó un microscopio óptico (Motic), y las imágenes fueron capturadas a través del software de procesamiento de imágenes (Motic Images Plus 2.0). Dado que las microcápsulas son traslúcidas, se tiñen con hematoxilina (sustancia de color morado) para facilitar la observación de las mismas. Se

coloca una porción representativa de muestra en tubos de ensayo de 5 ml, se adicionan 40 μ l de colorante y se agita en el vortex; se toma una alícuota de 10 μ l y se coloca en el portaobjetos y se coloca un cubreobjetos. Se utiliza el objetivo de 10X para la observación de las microcápsulas y la captura de imágenes.

6.13.2 *Microscopía electrónica de barrido (MEB)*

La microestructura de las microcápsulas fue observada con un microscopio electrónico de barrido (TM-1000, Hitachi) operado con un voltaje de aceleración de 15 kV. Las microcápsulas húmedas se suspenden en etanol al 96% para deshidratarlas, posteriormente se toma una gota de la suspensión y se fija en un porta-muestra de aluminio con cinta de carbón de doble adhesión y se coloca en una campana de extracción para evaporar los residuos de etanol. Posteriormente se procede a observación de las muestras.

6.13.3 *Microscopía láser confocal (MLC)*

La identificación del aceite de atún omega 3 (DHA/EPA) en las microcápsulas se realiza con un microscopio de barrido láser confocal (Fluoview™ FV1000, Olympus). El colorante Rojo de Nilo se usó como fluorocromo de lípidos, que permite distinguir entre el aceite encapsulado y la fase continua (mucílago), la cual se marcó con Calcofluor®. Se preparó una solución de Rojo de Nilo en etanol a una concentración de 1mg/ml. Para la tinción de las muestras, se colocó una porción de microcápsulas frescas en tubos Eppendorf y se agregó una alícuota de 40 μ l de la solución de Rojo de Nilo, se agita en el vortex y se deja reposar 2 min. Posteriormente se agrega una gota de KOH al 10% y enseguida una gota de Calcofluor®, se agita en el vortex y se colocan 15 μ l de la mezcla en un portaobjetos y se protege con un cubreobjetos. El Rojo de Nilo presenta una longitud de excitación de 488 nm y una longitud de emisión de 525 nm y el Calcofluor® una longitud de excitación de 440 nm y una longitud de emisión de 500-520 nm.

6.13.4 Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)

Se utilizó un espectrofotómetro FTIR/ATR (Vertex 70, Bruker) para estudiar las interacciones estructurales entre los componentes presentes en las microcápsulas de omega-3 (DHA/EPA). Se obtienen los espectros IR de las dos muestras de mucílago de linaza en polvo, del alginato en polvo, del aceite de atún omega-3 y de las microcápsulas secas en todas sus formulaciones. Los espectros se obtienen en un rango de escaneo de 400 a 4000 cm^{-1} . Se colocó la muestra directamente sobre el portamuestras de ATR para realizar la lectura.

6.13.5 Eficiencia de microencapsulación (EM)

La eficiencia de microencapsulación (EM) se determinó en función del aceite no encapsulado (es decir, aceite libre o aceite superficial) presente en la superficie de los polvos y se determinó de acuerdo al método utilizando por Bae & Lee (2008). Se agregan 15 ml de hexano a 1.5 g de microcápsulas en polvo en un frasco de vidrio con tapa, y se agita en el vortex durante 2 min a temperatura ambiente para extraer el aceite libre. La mezcla con el solvente se filtró a través de papel filtro Whatman No.1 y el polvo retenido en el papel filtro se enjuaga tres veces con 20 ml de hexano. Posteriormente, se seca para vaporizar todo el solvente residual a 60° C hasta peso constante. El aceite no encapsulado se determinó por diferencia de pesos del polvo antes y después de la extracción y lavado con hexano. El aceite total se asume que es igual al aceite inicial, ya que el aceite de atún no es volátil. La eficiencia de microencapsulación (EM) se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$(EM) = \frac{\text{Aceite total} - \text{Aceite superficial}}{\text{Aceite total}} \times 100$$

6.14 Análisis estadístico

Se utilizó el programa JMP® versión 8.0 para comparar los resultados experimentales obtenidos de ambas muestras de mucílago de linaza y determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre la composición del mucílago liofilizado y el mucílago deshidratado solar y los resultados de las formulaciones de las microcápsulas. Las diferencias significativas entre las medias se evaluaron por análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía,

y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5% ($p < 0,05$).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan los resultados obtenidos de las pruebas realizadas a las dos muestras de mucílago de linaza MLA y MLB, obtenidas a través de dos diferentes métodos de secado: deshidratación solar y liofilización, respectivamente; mismo tipo de semilla de linaza (color café-marrón) y dos diferentes lotes de semilla de linaza. Se realizaron las pruebas por triplicado.

7.1 Mucílago de linaza por deshidratación solar (MLA)

7.1.1 Caracterización del mucílago de linaza MLA en polvo: Composición química proximal, propiedades funcionales y propiedades fisicoquímicas

La Tabla 7.1 muestra los resultados obtenidos de la composición química proximal, así como también el rendimiento de extracción de mucílago de linaza de acuerdo con las condiciones de extracción establecidas en el diagrama de proceso (sección 6), se presentan las propiedades funcionales y el contenido de compuestos bioactivos.

Rendimiento de extracción

El rendimiento del mucílago de la semilla de linaza varía con las condiciones de extracción, así como el ambiente de cultivo y el genotipo. Ooham & Mazza (2001) reportaron que la relación material:agua para el caso de mucílago de semillas de linaza tiene un efecto significativo en el rendimiento. Por otra parte, el rendimiento máximo de mucílago de linaza se obtiene a 80° C con la proporción de semilla: agua de 1 a 25 (Ziolkovska, 2012). Sin embargo, el aumento de temperatura de extracción induce un mayor contenido de proteína y un color marrón (Fedeniuk y Billiaderis, 1994). Teniendo en cuenta que el oscurecimiento

puede afectar a las propiedades de los polisacáridos, en el presente trabajo la extracción del mucílago de linaza se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Tabla 7.1. Pruebas de caracterización química y rendimientos de extracción del mucílago de linaza MLA.

MLA		
Pruebas	Composición	Unidades
<i>Composición química proximal</i>		
Rendimiento (R)	5.85	%
Cenizas	7.39 ± 0.04	%
Humedad	14.41 ± 0.16	%
Grasa	0.11 ± 0.01	%
Proteína	0.94 ± 0.003	%
Fibra DT	75.67 ± 4.14	%
<i>Propiedades funcionales</i>		
CAb	80	ml H ₂ O/g muestra
CRA	80	ml H ₂ O/g muestra
CRa	3.6	ml H ₂ O/g muestra
Gel	1.5	%
<i>Compuestos bioactivos</i>		
Compuestos fenólicos T.	10.36 ± 0.30	mg E <i>Ac. Gálico</i> /gr. de muestra
Taninos condensados	1.05 ± 0.08	mg E <i>Catequina</i> /gr. de muestra
Flavonoides T.	1.53 ± 0.32	mg E <i>Rutina</i> /gr. de muestra

Composición química proximal

Los principales constituyentes del mucílago de linaza son los polisacáridos y contiene cerca del 75.67% el mucílago de linaza MLA. El análisis elemental muestra el contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno presentes en la muestras de mucílago de linaza MLA (Figura 7.1). La cantidad de nitrógeno se utilizó para calcular el valor de proteína presente en la muestra.

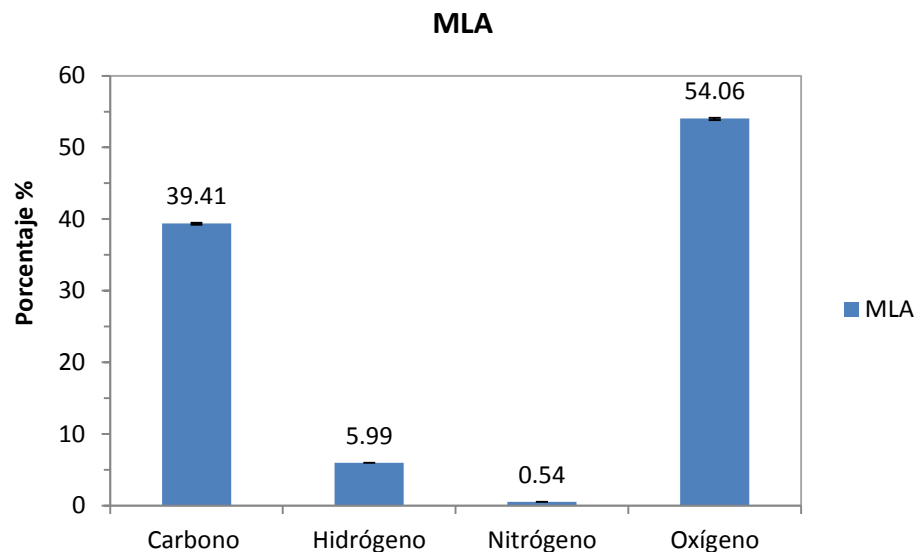


Figura 7.1. Composición elemental del mucílago de linaza MLA

Propiedades funcionales

En la Tabla 7.1 se muestran las propiedades funcionales del mucílago de linaza MLA. Esta fracción mucilaginosa puede contribuir en la CRA ya que los mucílago son conocidos por tener excelentes propiedades de retención de agua (Shabbir y col., 2014).

La capacidad de retención de agua es la capacidad de un material húmedo para retener el agua cuando se somete a una fuerza de gravedad centrífuga externa o de compresión. En la CRA no solo influye el tamaño de partícula, sino también la composición de la fibra, siendo la cantidad de fibra dietética soluble (FDS) la que posiblemente tenga mayor influencia independientemente del método de secado de las muestras. El valor de la CRA determina el grado en que una fibra se puede incorporar a un sistema alimenticio sin deteriorar la viscosidad, ni la apariencia del producto final (Laurrari y col., 1997).

La capacidad de retención de aceite (CRa) es una de las propiedades funcionales más notables de un hidrocoloide, representando la capacidad para absorber aceites, mientras que la capacidad de absorción de agua (CAb) se define como la cantidad de agua que una fuente de fibra es capaz de absorber cuando se le agrega un exceso de agua. MLA es comparable con la CRa en fracciones ricas en fibra (2.02 g aceite/g muestra) (Vázquez-Ovando y col., 2009).

En algunas ocasiones y dependiendo de la composición de la fibra no es posible distinguir entre CAb y CRA ya que el material retiene casi la totalidad del agua absorbida (Robertson y col., 1981; Chen y col., 1984). De acuerdo con los resultados presentados anteriormente en la Tabla 7.1, se observó que el mucílago de semilla de linaza MLA posee una gran capacidad de absorción de agua, así como de retención de agua debido a que se presentó el mismo resultado en dichas pruebas funcionales, absorbiendo en su totalidad la cantidad de agua añadida a la muestra.

Es posible relacionar CAb y CRA debido a que el agua se une a los sitios activos de manera similar, de acuerdo con la cantidad de enlaces que pueden establecerse entre los componentes de la fibra.

El mucílago de linaza forma soluciones muy viscosas, pero tiene la capacidad de formar un gel a determinadas concentraciones. Un factor crítico es la concentración de polisacáridos para formar un gel que pueda crear una red firme a una concentración mínima, conocida como concentración mínima de gelificación (CMG). Al utilizar la concentración mínima de gelificación (CMG) como un índice de gelificación, se obtuvo en este estudio la CMG de 1.5% para el mucílago de linaza obtenido por deshidratación solar (MLA) como se muestra en la Tabla 7.1. Los resultados de la capacidad de gelificación se presentan en la Tabla 7.2 dónde se muestran las concentraciones de mucílago de linaza MLA a la cual ocurre la transición de una solución viscosa a un gel y la identificación de la CMG. Al incrementar la concentración de mucílago, se facilitaron las propiedades de gelificación. Esto se puede deber a una mejor interacción producida entre las fuerzas de unión a medida que la concentración aumenta.

Tabla 7.2. Concentración mínima de gelificación (CMG) del mucílago de linaza MLA a diferentes concentraciones

Muestra	Concentración (%)						
	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5
MLA	-	-	CMG	+	+	+	+

(-) = no gelifica, (+) = gelifica y CMG = Concentración mínima de gelificación, mínima concentración a la cual el gel no se desliza al invertir el tubo.

La aplicación de diferentes métodos de secado modifica significativamente las propiedades funcionales del mucílago de linaza en polvo (Wang y col., 2010); es probable que la modificación en la estructura química del mucílago de linaza limite la interacción de las moléculas de polisacáridos, lo que conduce a la reducción de las propiedades de gelificación en el mucílago obtenido por método solar. Por otro lado, la alta capacidad de absorción y retención de agua encontradas en las muestras de mucílago de linaza se puede correlacionar con la capacidad de gelificación, debido a la facilidad de formación del gel.

Compuestos bioactivos

El contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos condensados en el mucílago de linaza MLA se muestra en la Tabla 7.1. Debido a una variedad de metodologías, los reportes sobre el contenido de polifenoles de la semilla de linaza son diversos. Valavanidis y col., (2009) reportan que la concentración de compuestos polifenólicos en las plantas se ve considerablemente influenciado por la variedad, el tipo de suelo, la etapa de crecimiento y las condiciones ambientales, especialmente la incidencia de la luz.

Propiedades fisicoquímicas

Los perfiles de viscosidad de las soluciones de mucílago de linaza MLA a diferentes concentraciones se muestran en las Figuras 7.2 y 7.3. Se observa un comportamiento No-newtoniano, donde la viscosidad presenta una relación directamente proporcional a la concentración e inversamente proporcional a la velocidad rotacional, a concentraciones que varían de 0.5% a 1% (p / v). La viscosidad de una solución de mucílago puede depender de la composición y su estructura química. Kaewmanee y col. (2014) reportan la variabilidad en la composición del mucílago de linaza en función de la variedad de cultivo en estudios realizados al mucílago de linaza de diversas variedades de semillas, mostrando valores de viscosidad en un rango de (78 a 562 Cps) en una solución al 1%.

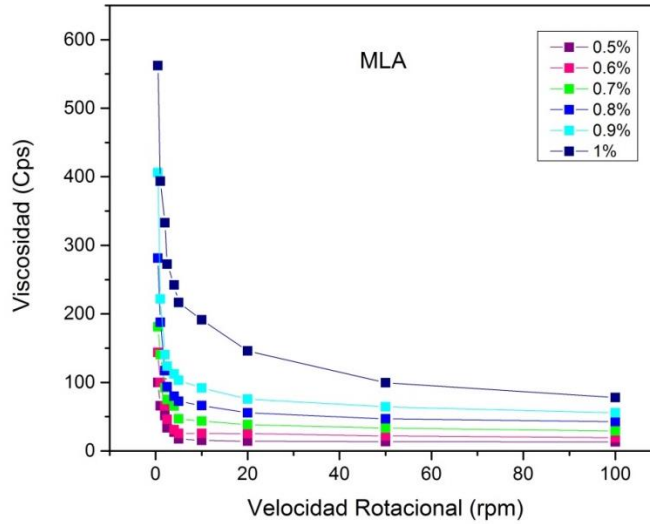


Figura 7.2. Perfil de viscosidad del mucílago obtenido por deshidratación solar

El torque, como la capacidad de la fuerza para producir un giro o rotación alrededor de un punto, como ocurre en un viscosímetro determina la exactitud de una lectura particular, y en general, la exactitud de la medida aumenta cuando nos aproximamos al 100%. Los valores de viscosidad son aceptables cuando el porcentaje de torque se encuentre entre 10% y 100% para cualquier combinación de aguja y velocidad de rotación. De igual manera se observó que el torque es directamente proporcional a la velocidad de rotación, como se muestra en la Figura 7.3 en mucílago de linaza por deshidratación solar.

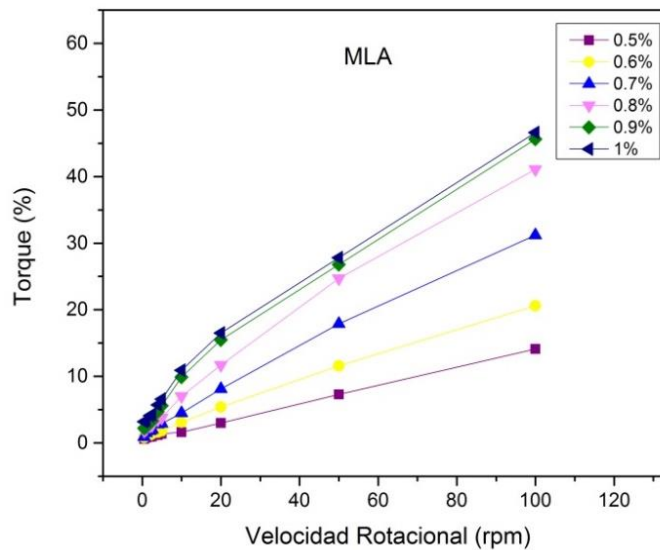


Figura 7.3. Velocidad de rotación vs. Torque de las muestras de mucílago de linaza MLA

Los polvos de mucílago de linaza se analizan con base al sistema Hunter lab para la determinación del color. En los parámetros a y b se obtuvieron coordenadas positivas, lo que indica la presencia de tonalidades rojas y amarillas, respectivamente, con mayor intensidad en el mucílago de linaza por deshidratación solar. En la Tabla 7.3 se muestran los parámetros obtenidos para la muestra MLA.

Tabla 7.3. Parámetros de color (L^* , a^* y b^*) de los polvos de mucílago de linaza MLA.

Parámetros de color			
Muestras	L^*	a^*	b^*
MLA	85.5 ± 0.09	0.6 ± 0.03	5.13 ± 0.05

El polvo obtenido por deshidratación solar presenta luminosidad de ($L = 70.14$) y alto enrojecimiento ($a = 3.16$), lo que puede ser atribuido a posibles reacciones de Maillard dada la presencia de carbohidratos y proteínas en la muestra y a la exposición del mucílago a un tiempo de secado considerablemente largo a temperaturas entre $35-70^{\circ}\text{C}$. El color de la semilla ha sido más relacionado con la presencia de mayor o menor cantidad de ácido α -linolénico (ALA). Sin embargo, no se han reportado estudios que correlacionen el color del mucílago con la presencia de compuestos polifenólicos, como ocurre en otros alimentos de origen vegetal. En la figura 7.4 se observa la fotografía del polvo de mucílago de linaza por deshidratación solar.



Figura 7.4. Coloración del polvo de mucílago de linaza por deshidratación solar.

7.1.2 *Diagrama visual de fases*

El diagrama visual de fases se elabora en función de la variación de la concentración del polímero contra la concentración del ión ligante, teniendo como objetivo definir la región donde ocurre la formación física del gel entre el polisacárido y el ión, así mismo se identifica la región donde el sistema permanece en la fase sol y la región donde ocurre la sinéresis. La elaboración del diagrama visual de fases es necesaria para definir la concentración del mucílago de linaza en combinación de la concentración de cloruro de calcio que presente la relación adecuada para la formación de microcápsulas en un sistema de gelificación iónica.

El sistema de mucílago de linaza MLA únicamente presentó la fase sol (Figura 7.5). En dicho sistema no hay formación de gel y tampoco se presenta sinéresis debido a su alta capacidad de absorción y retención de agua. El mucílago es capaz de formar geles a concentraciones elevadas, pero en presencia de sales divalentes a las concentraciones evaluadas no se consiguió la formación de gel. Sin embargo autores como Chen y col., (2006) sugirieron que las soluciones de mucílago de semilla de linaza pueden formar geles en frío mediante la adición de sales minerales con diferentes números de valencia.



Figura 7.5. Fotografía de la fase sol del sistema mucílago de linaza MLA.

En cuanto al sistema de alginato, se presentaron regiones bien definidas de sol, gel y sinéresis (Figura 7.6). La gelificación se consiguió a partir de la concentración de 1.5% de polisacárido con 0.5% del cloruro de calcio; la región del gel termina en 2.5% de concentración de alginato y 2.0% de CaCl_2 . En concentraciones elevadas de la sal de calcio se presentó sinéresis.

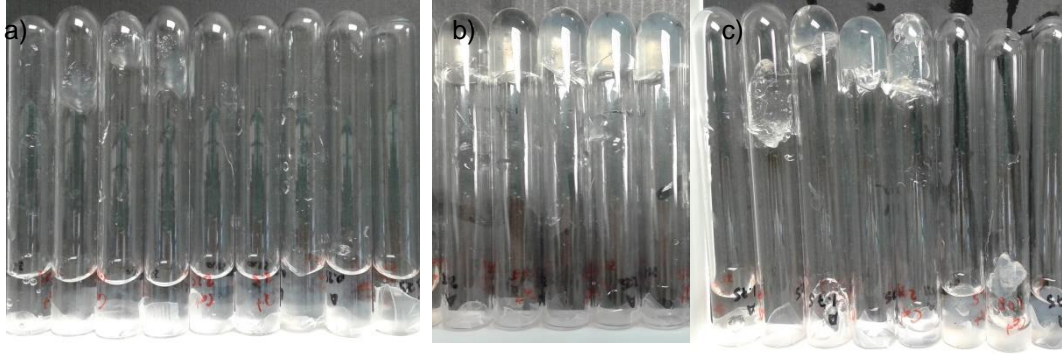


Figura 7.6. Fotografías de las fases del sistema alginato de sodio. a) Sol, b) Gel y c) Sinéresis

El diagrama de transición de fases de la mezcla de dos componentes (mucílago de linaza MLA + alginato) presenta las fases sol, gel y sinéresis, como se observa en la (Figura 7.7). De acuerdo con Draget y col. (1991), el fenómeno de sinéresis está fuertemente relacionado con la cantidad de calcio presente en el gel. En particular, la sinéresis es mayor cuando el contenido de calcio excede la cantidad de residuos de ácido gulurónico presente en el gel. La sinéresis fue observada en altas concentraciones de Ca^{2+} , indicando que los geles están próximos al límite de estabilidad, dando como resultado la separación de fases.

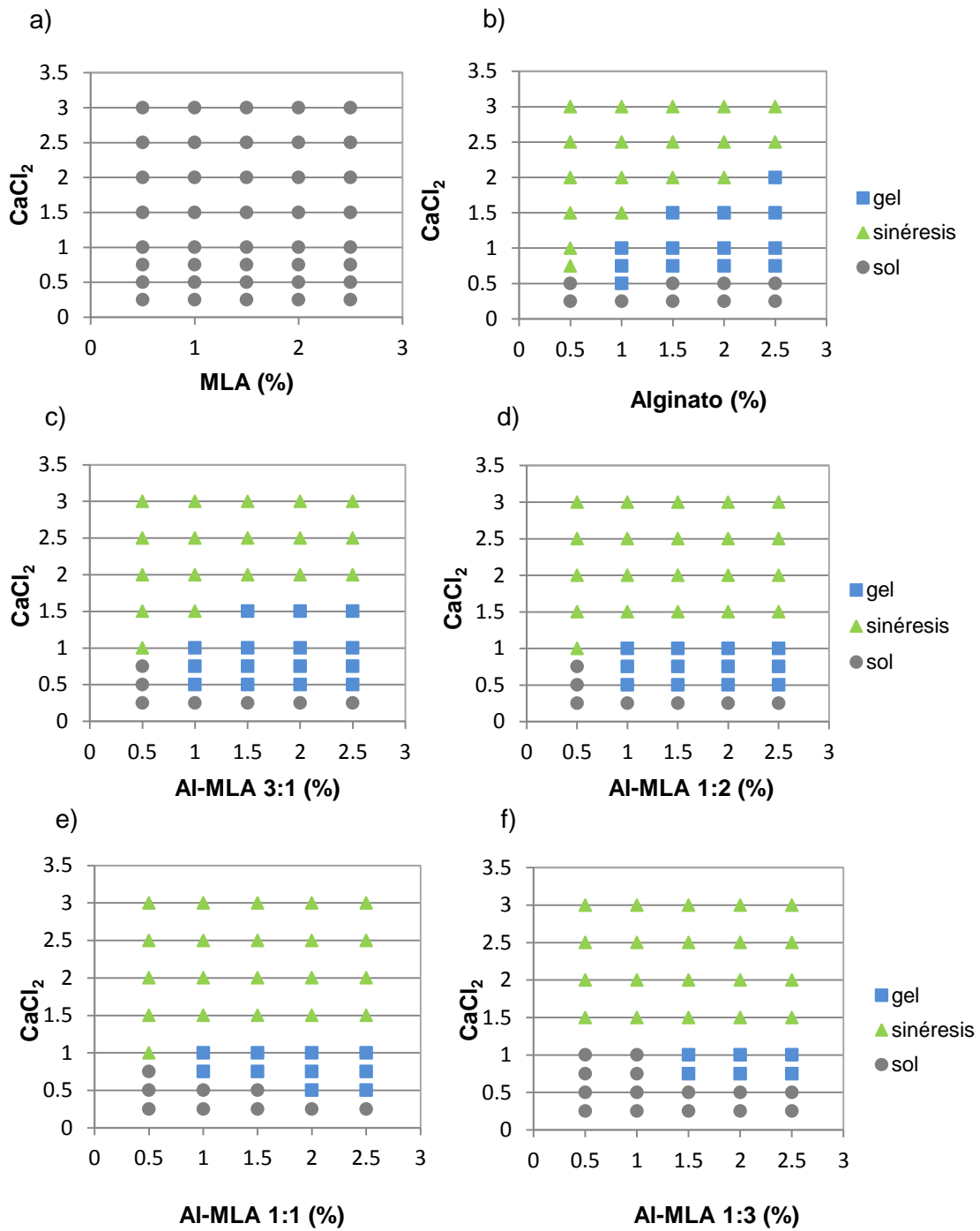


Figura 7.7. Diagramas de fases de mucílago de linaza, alginato de sodio, alginato-mucílago.

a) mucílago de linaza MLA b) alginato de sodio, c) Al-MLA 3:1, d) Al-MLA 1:2, e) Al-MLA 1:1, f) Al-MLA 1:3

7.1.3 Caracterización de microcápsulas de mucílago por deshidratación solar MLA: tamaño, morfología, microestructura y ubicación del aceite

Microscopía óptica

Las microcápsulas preparadas con mucílago de linaza MLA y alginato en sus diferentes formulaciones fueron observadas y analizadas por microscopía óptica (Figura 7.8). En general, la mayoría de las microcápsulas presentaron forma esférica, así como también formas irregulares como se indica en las imágenes por SEM. La incorporación de alginato dio lugar a estructuras lisas que envuelve alrededor y entre las microcápsulas. Estas características fueron más prevalentes en las microcápsulas de la formulación F1 así como también en la muestra control en comparación con las microcápsulas con menor cantidad de alginato F2.

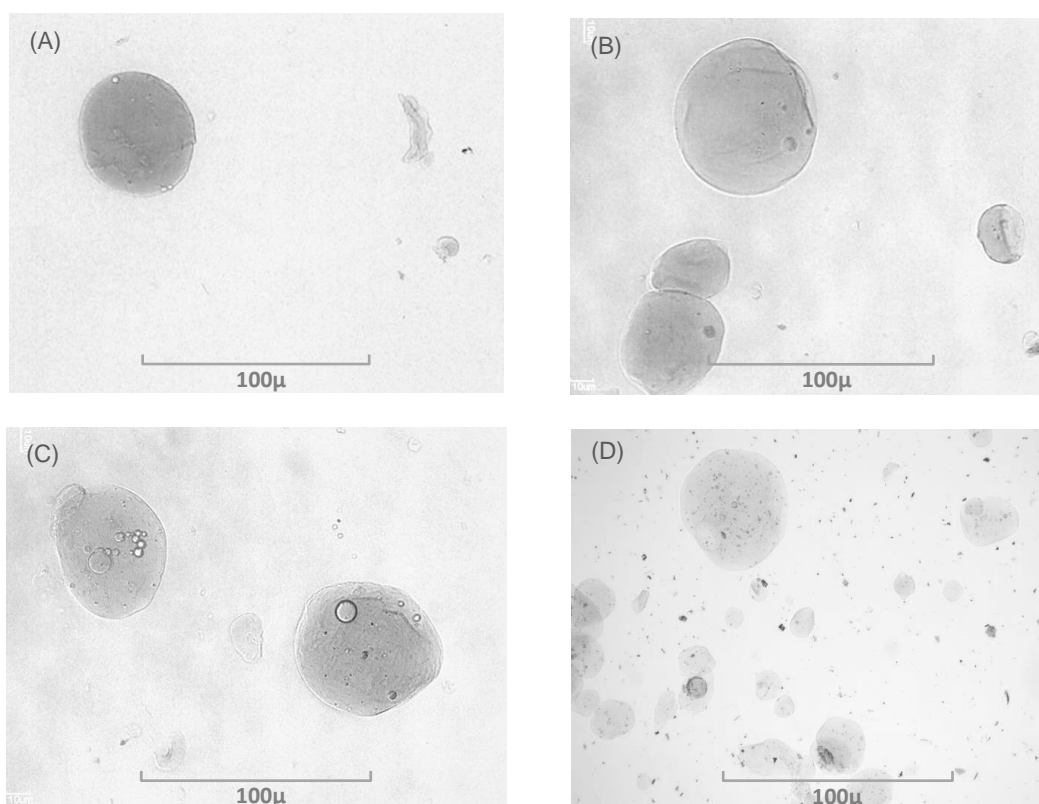


Figura 7.8. Imágenes por microscopía óptica de las microcápsulas preparadas con alginato y mucílago de linaza MLA. (A) Alginato (control), (B) Al:MLA 3:1 (F1), (C) Al:MLA 1:2 (F2), (D) Al:MLA 1:3 (imagen comparativa)

Las microcápsulas preparadas con mucílago de linaza MLA tienden a ser menos rígidas, es decir poseen mayor flexibilidad debido a su viscosidad y punto de gelificación. El diámetro registrado de las microcápsulas varía según la formulación. En la tabla 7.4 se muestra el rango y el promedio del diámetro de las microcápsulas de cada una de las formulaciones analizadas. Se registraron diferentes tamaños de microcápsulas, las más pequeñas corresponden a la muestra control de alginato seguido de las proporciones 3:1 y finalmente el mayor tamaño lo presentan las proporciones 1:2. Dado que el mucílago de linaza posee propiedades de hinchamiento o expansión de tamaño, así como alta capacidad de retención de agua, se explica la diferencia observada en las microcápsulas más grandes producidas bajo las mismas condiciones.

Tabla 7.4. Tamaño de las microcápsulas de mucílago de linaza MLA.

Muestra	Formulación		Proporción	Tamaño de las microcápsulas	
				Diámetro (μm)	
				Rango	Promedio
Alginato	Control	Al	1	15- 24.7	19.85
MLA	F1	Al:MLA	3:1	14.4-43.6	29
	F2	Al:MLA	2:1	43.7-59.6	26.65

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

El análisis superficial y morfológico de las microcápsulas preparadas por el método de gelificación iónica, se observó por microscopía electrónica de barrido con ampliificaciones de 2500X. Las micrográficas revelan que la superficie de las diferentes formulaciones varía en función del alginato añadido. La superficie de las microcápsulas de alginato (control) (Figura 7.9), muestra una estructura lisa y firme con crestas irregulares, mientras que las formulaciones F1 y F2 (Figura 7.10a y 7.10b) muestran una pared algo más suave y su estructura interna revela la aparición de pequeñas microcavidades.

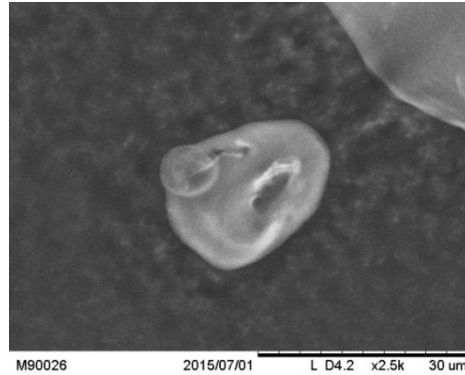


Figura 7.9. Micrografías de microcápsulas de alginato (muestra control)

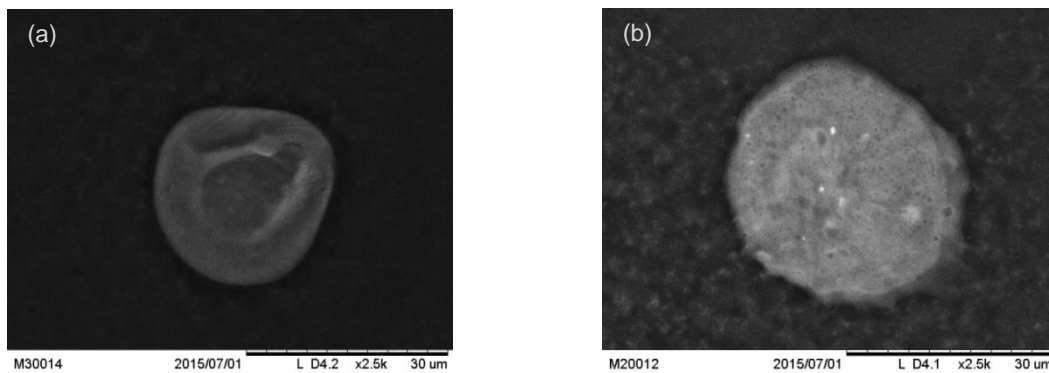


Figura 7.10. Micrografías de microcápsulas de mucílago de linaza MLA. (a) Al:MLA 3:1 (F1), (b) Al:MLA 1:2 (F2)

Microscopia láser confocal (MLC)

Para analizar la ubicación del (DHA/EPA) omega-3 por microscopía láser confocal se emplearon los colorantes Rojo de Nilo y Calcofluor® y se aplicaron como tinción fluorescente de las gotas de lípidos y de la mezcla polimérica, respectivamente. En general, el Rojo de Nilo sirve como un excelente fluorocromo de lípidos y ha sido utilizado para la detección cualitativa de grasas (Greenspan & Fowler, 1985). El Calcofluor® es un colorante específico para β -glucanos y quitina. Principalmente se enlaza a la celulosa y a la quitina de las paredes celulares.

Las imágenes obtenidas se muestran en dos canales de excitación láser más un tercer canal de transmisión Nomarski ó microscopía de interferencia diferencial (DIC). La fluorescencia del Rojo Nilo se muestra de color rojo y el Calcofluor® de color azul. El canal en fondo gris representa la microscopía de interferencia (DIC) o Nomarski. El Calcofluor® únicamente presentó afinidad por el mucílago de linaza, ya que las muestras control de microcápsulas de alginato con y sin aceite no presentan la tinción azul en el contorno de la microcápsulas como se observa en la Figura 7.12. Al comparar las imágenes de la microscopía Nomarski y la microscopía confocal, se observó el aceite distribuido en el interior de las microcápsulas. Por otro lado, los puntos en color rojo de las imágenes de microscopía confocal coinciden con los puntos más oscuros en las imágenes de microscopía de interferencia, representando al aceite disperso en las microcápsulas (Figura 7.13.).

Dos canales de fluorescencia, azul y verde fueron usados para representar la pared de la cápsula con los fluorocromos DAPI y EGFP y el canal de fluorescencia para la fase oleosa con Alexa 546, en color amarillo. El láser se ajustó en el modo de fluorescencia verde / azul/ amarillo, en dos rangos de longitudes de onda de excitación, reduciendo las barras de magnificación a 20 μm para separar cada canal (Figura 7.11).

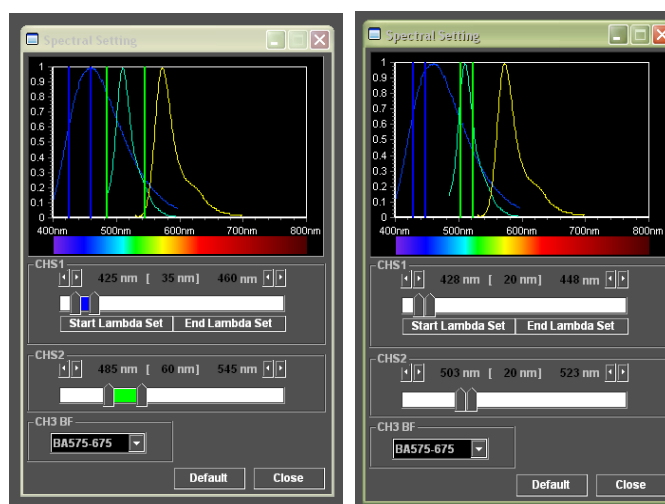


Figura 7.11. Ajuste del espectro de los canales de los fluorocromos en sus longitudes de excitación.

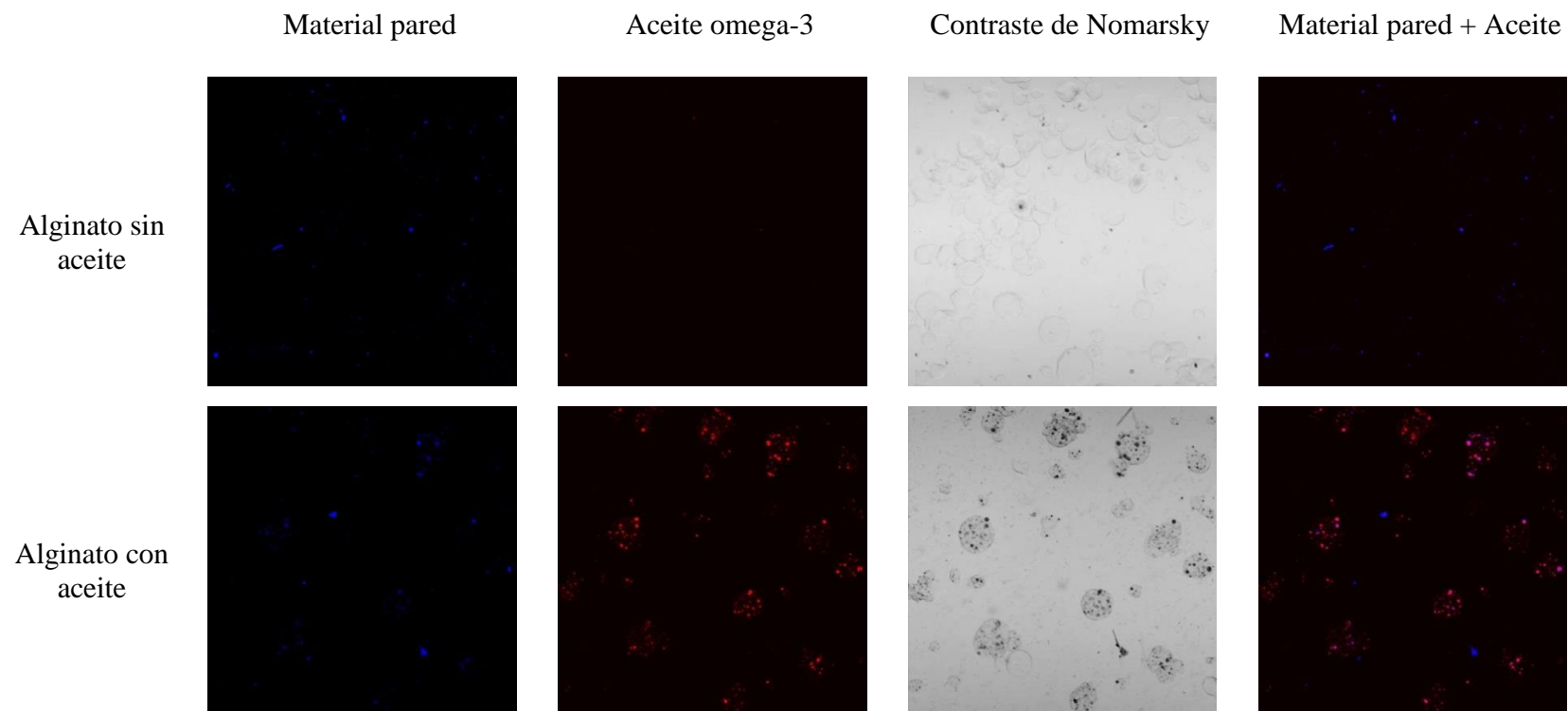


Figura 7.12. Micrografías de las microcápsulas Formulación control (alginato) y microcápsulasde alginato sin aceite como blanco.

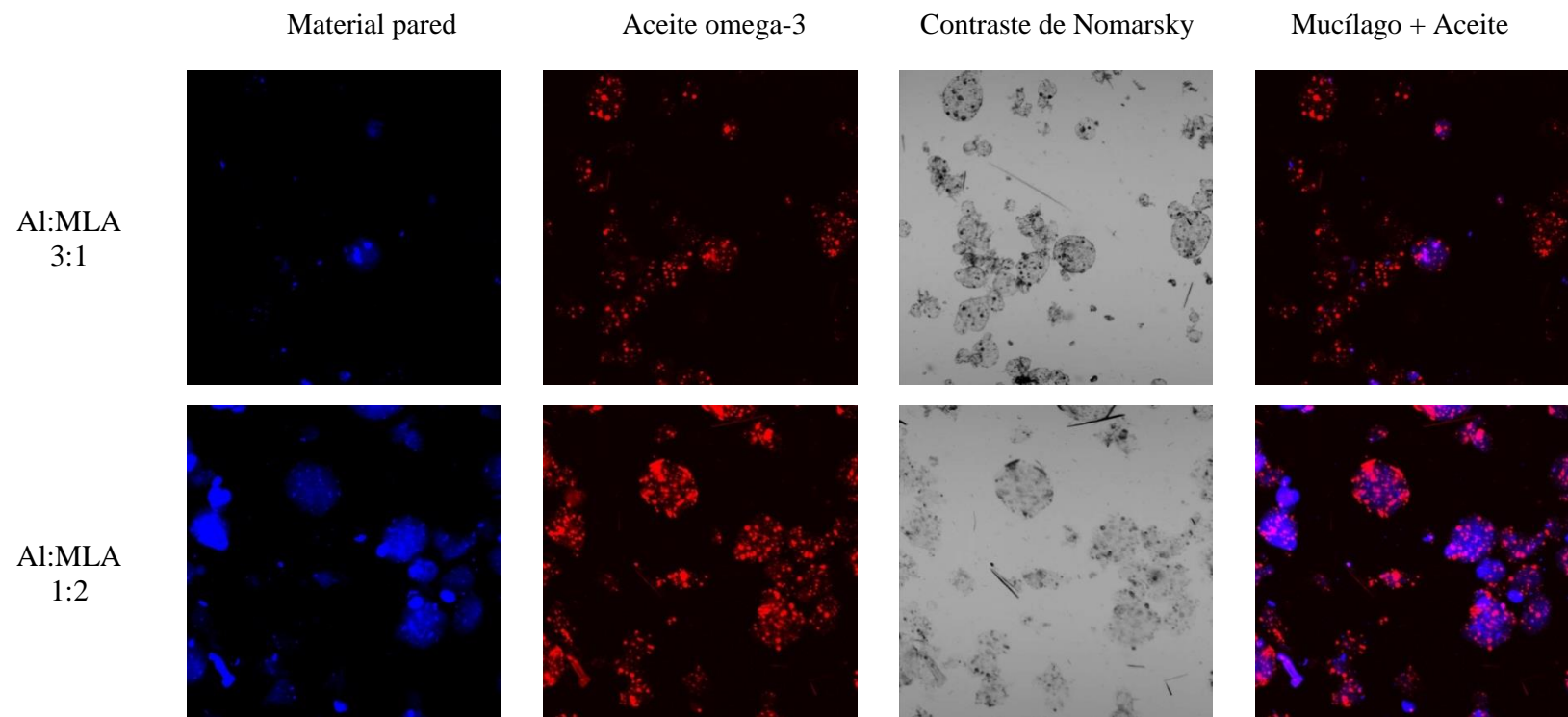


Figura 7.13. Micrografías de las microcápsulas Formulación F1 (Al:MLA 1:2) y F2 (Al:MLA 3:1).

Espectroscopia de infrarojo por transformadas de fourier (FTIR)

La espectroscopía FTIR ha sido aplicada ampliamente para caracterizar la estructura y el material molecular de un polímero. La caracterización mediante espectroscopía FTIR a menudo da lugar a la identificación de los grupos funcionales y la forma de enlace a la cadena principal del polímero (Baxter y col., 1992).

El espectro FT-IR del alginato en polvo presentó bandas de absorción destacables en 3231 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento O-H), 2894 cm^{-1} (vibraciones estiramiento C-H), 1593 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento asimétricas COO-) y 1405 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento simétricas COO-). De acuerdo a Jaya y col. (2009) las bandas alrededor de 1309 y 1084 cm^{-1} corresponden a estiramiento (C-O), 1027 cm^{-1} estiramiento (C-O-C) y alrededor de 942 cm^{-1} a estiramiento (C-O) que se presentan en el espectro IR de alginato de sodio se atribuyen a su estructura de sacárido (Figura 7.14).

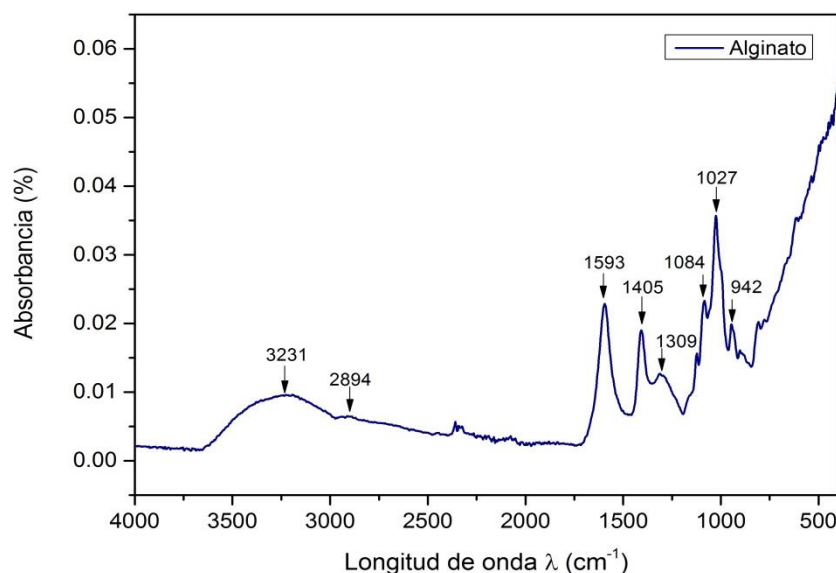


Figura 7.14. Espectro de alginato de sodio

El espectro del mucílago de linaza MLA se muestra en la Figura 7.15, el cual presenta bandas típicas y picos característicos del mucílago. La banda amplia que se presenta entre $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ resulta de la presencia de grupos hidroxilo (-OH), destacable en 3241 cm^{-1} . El pico obtenido en 2928 corresponde a vibraciones (C-H). El espectro de mucílago de linaza (MLA) presenta dos bandas, una mayor que aparece en 1596 cm^{-1} y otra de menor intensidad en 1029

cm^{-1} . Estas dos bandas corresponden respectivamente, a vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas debido al grupo ionizado COO^- de ácido poligalacturónico (Kamnev y col., 1998).

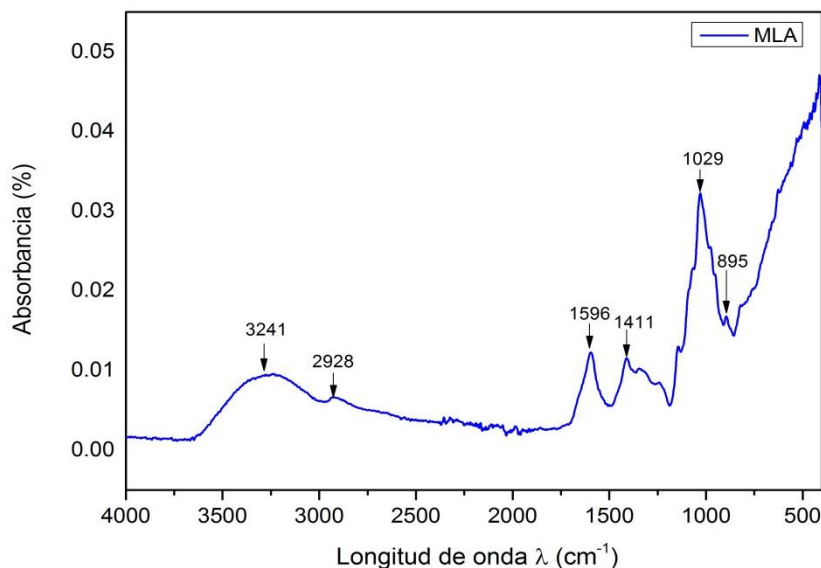


Figura 7.15. Espectro IR del mucílago de linaza MLA.

Las bandas de IR alrededor de $1160\text{-}30\text{ cm}^{-1}$ están dominadas por la presencia del enlace O-glucosídico (C-O-C), en 1070 y 1043 cm^{-1} se asocia al compuesto ramnogalacturano y a frecuencias más bajas ($1051\text{-}1039\text{ cm}^{-1}$) se encuentran polisacáridos con constituyentes como manosa, arabinosa y ramnosa, de acuerdo con Kacuráková y col. (2000). El tipo de bandas mencionadas anteriormente coinciden con la elevación del pico más alto del espectro de mucílago que inicia en 1185 cm^{-1} con su punto más alto en 1029 cm^{-1} . Kacuráková y col. (2000) concluyen en su estudio de FTIR en policácidos de tipo péctico y hemicelulosas, que cada polisacárido en particular tiene una banda máxima específica en la región entre $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, ésta región está dominada por las vibraciones de anillos que se superponen con las vibraciones de estiramiento (C-OH) de grupos laterales y las vibraciones de enlaces glucosídicos (C-O-C).

El espectro FTIR del DHA/EPA omega 3 presenta las vibraciones características de un ácido graso polinsaturado (Figura 7.16). Se observa una banda de absorción en 3012 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento C-H de dobles enlaces *cis* alqueno ($=\text{C-H}$). La

posición de ésta banda depende del número de dobles enlaces en la cadena de ácido graso. De acuerdo con Yoshida & Yoshida (2004) en su estudio realizado con ácidos grasos poliinsaturados, encontraron que las bandas de absorción comenzando en 3005 cm^{-1} indican un doble enlace sencillo (por ejemplo, C18:1) hasta 3012 cm^{-1} indican múltiples dobles enlaces (tales como C20:5 y C22:6), demostrando que la banda a 3012 cm^{-1} es causada principalmente por el aumento de los ácidos grasos poliinsaturados tales como EPA y DHA, y por lo tanto esta banda puede ser utilizada como un marcador para el análisis de ésteres totales de EPA y DHA en muestra de aceite de pescado. Las siguientes bandas a 2925 y 2855 cm^{-1} son características de vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico (-C-H-) de grupos CH_2 y CH_3 , respectivamente. A 1746 cm^{-1} se encuentran las vibraciones de estiramiento de grupos ester (-C=O), a 1465 cm^{-1} flexiones simétricas dentro del plano (-C-H) de grupos CH_2 , a 1154 cm^{-1} vibraciones de estiramiento (-C-O) y a 735 cm^{-1} vibraciones de flexión asimétrica dentro del plano (=C-H) de grupos $-(\text{CH}_2)_n$.

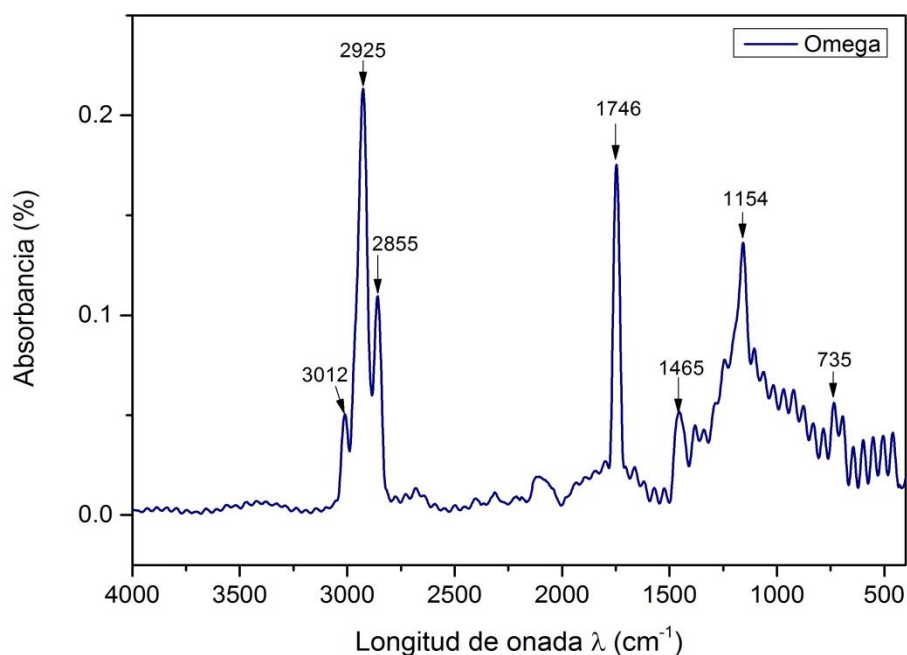


Figura 7.16. Espectro FTIR del aceite de atún omega-3 (DHA/EPA).

Los espectros FTIR del alginato de sodio y el mucílago en polvo presentaron bandas de absorción similares, dadas las características que comparten al formar parte del grupo de los

polisacáridos. En la Figura 7.17 se muestran los espectros de las microcápsulas Formulación control, F1 y F2, mucílago en polvo, alginato de sodio y aceite omega-3.

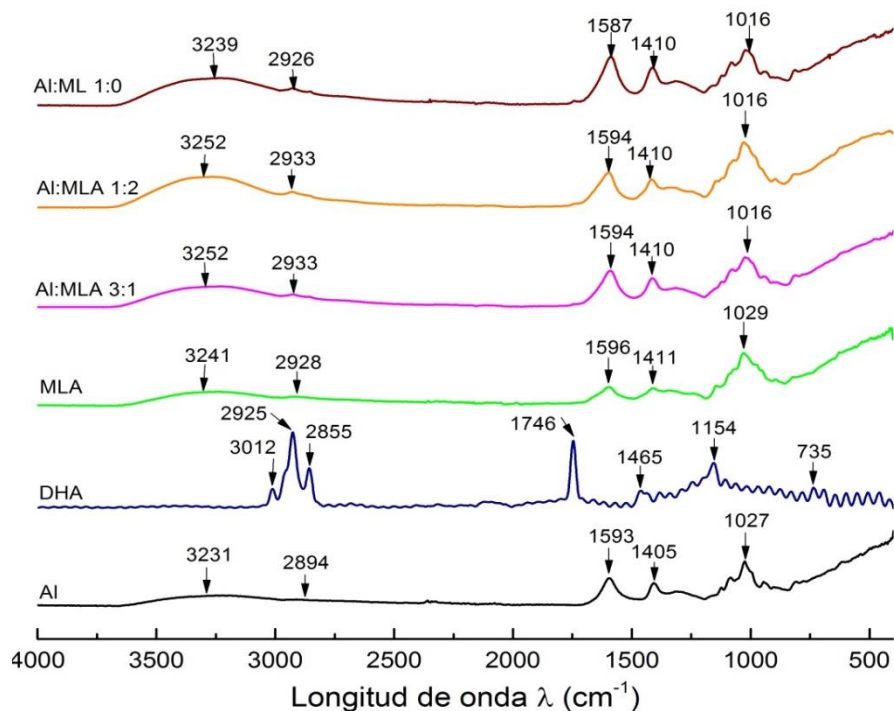


Figura 7.17. Espectros FTIR de los componentes de las microcápsulas: Alginato de sodio (Al), aceite de atún omega-3 (DHA/EPA), Mucílago de linaza por deshidratación solar (MLA), Microcápsulas formulación F1 (Al:MLA 3:1), Microcápsulas formulación F2 (Al:MLA 1:2), y Microcápsulas formulación control (Al:ML 1:0).

Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación del aceite de atún omega-3 en sus diferentes formulaciones se obtuvo en función del contenido de aceite superficial, que se refiere a la cantidad de aceite no encapsulado que se localiza espacialmente en la superficie de las cápsulas después del proceso de secado, causado por discontinuidades en el material pared debido a una emulsión inicialmente menos estable (Klinkesorn y col., 2006).

El aceite superficial y la eficiencia de encapsulación (EE) de las microcápsulas producidas como una función de polisacáridos y contenido de aceite se muestran en la figuras 7.18 y 7.19, respectivamente.

En general, el aceite superficial para la formulación de alginato (control) (0.68%) y la formulación F1 (0.86%) se encontraron por debajo del 1%, y menor que el observado para las formulaciones F2 (1.14%).

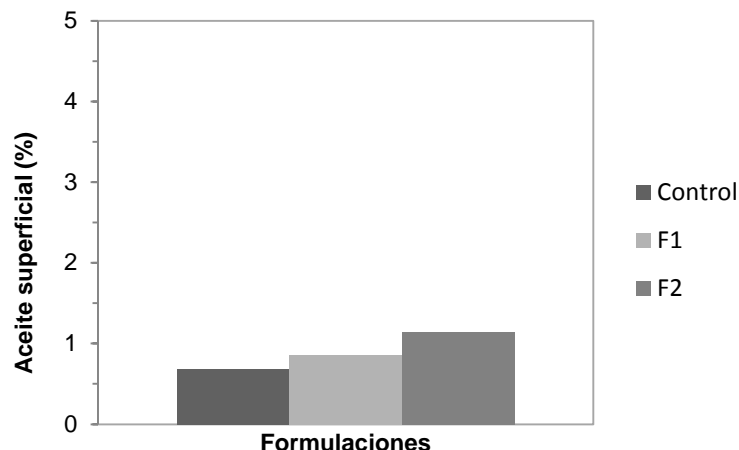


Figura 7.18. Aceite superficial extraído de las microcápsulas a diferentes formulaciones. Formulación control (Alginato), F1(Al:MLA 3:1) y F2 (Al:MLA 1:2).

En la Figura 7.19 se muestra la EE de las formulaciones preparadas con mucílago MLA. Las microcápsulas preparadas a partir de alginato (formulación control) mostraron significativamente menor grasa superficial y mayor EE que la formulación F1 y F2.

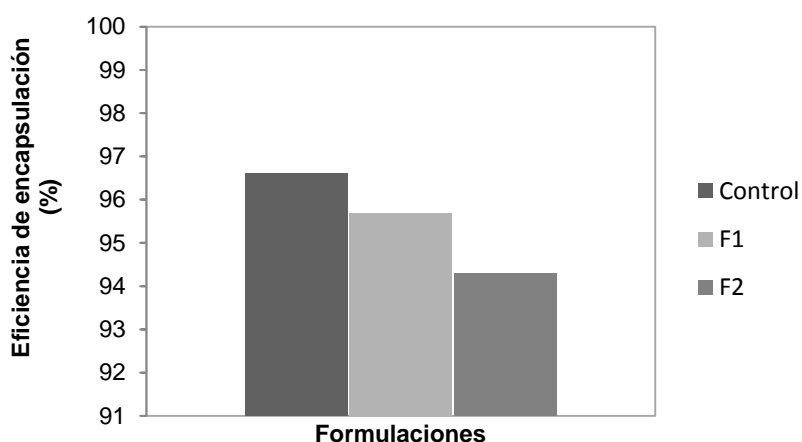


Figura 7.19. Eficiencia de encapsulación de microcápsulas producidas con diferentes combinaciones de material pared. Control (Alginato), F1(Al:MLA 3:1), F2 (Al:MLA 1:2)

La formulación control (Alginato) (96.61%) tiene la mayor EE que las microcápsulas formuladas con mucílago de linaza. La EE de la formulación con mayor cantidad de alginato F1 (95.68%) es mayor que la formulación preparada con mayor cantidad de mucílago F2 (94.28%).

7.2 Mucílago de linaza liofilizado MLB

La Tabla 7.5 muestra los resultados obtenidos de la composición química proximal, así como también el rendimiento de extracción de mucílago de linaza MLB de acuerdo con las condiciones de extracción establecidas en el diagrama de proceso (sección 6), se presentan las propiedades funcionales y el contenido de compuestos bioactivos.

7.2.1 Caracterización del mucílago de linaza MLB en polvo: Composición química proximal, propiedades funcionales y propiedades fisicoquímicas

Rendimiento de extracción

El rendimiento de mucílago de linaza obtenido en este estudio fue menor que los reportados en mucílago de linaza a 80°C (8%) (Ziolkovska, 2012), secado en horno a 45°C (3.65%, Linoal) (Kaewmanee y col., 2014), liofilizado (9.7%) (Qian y col., 2012); y mayor que el mucílago de linaza a 25°C (4%) y a 100°C (5.1%) (Fedeniuk & Biliaderis, 1994), lo cual puede atribuirse a la temperatura empleada, al volumen de alcohol utilizado y en cierta medida al método de secado empleado.

Composición química proximal

Al comparar los resultados obtenidos con los reportados en hidrocoloides de aplicación industrial, se observan diferentes cantidades de carbohidratos en su composición, por ejemplo la goma guar contiene cerca del 23.7% y la goma xantana contiene aproximadamente 98% (Ahmed y col., 2006). El contenido de cenizas obtenido concuerda con la variedad Norman (7.4 %), aunque resulta menor que las variedades Omega (8.2%) y Foster (8.4%) en los reportes de (Cui & Mazza, 1996) en mucílago de linaza de diversas semillas. Barbary y col. (2009) reportan un mayor contenido de grasa (0.45%) y menor proporción de humedad (7%) que en las muestras evaluadas en el presente estudio. Por otra parte, el valor de proteína

resultó igual para ambas muestras estudiadas (0.94%), siendo éste valor similar a las variedades Solal (0.89%) y Festival (0.92%) de mucílago de linaza reportadas por (Kaewmanee y col., 2014), y mayor a (0.1%) de proteína reportado por (Alix y col.,2008) en mucílago de linaza secado en horno a 45°C.

Tabla 7.5. Pruebas de caracterización química y rendimientos de extracción del mucílago de linaza MLB.

MLB		
Pruebas	Composición	Unidades
<i>Composición química proximal</i>		
Rendimiento (R)	5.9	%
Cenizas	4.91 ± 0.03	%
Humedad	12.67 ± 0.02	%
Grasa	1.14 ± 0.13	%
Proteína	0.94 ± 0.001	%
Fibra DT	75.46 ± 8.63	%
<i>Propiedades funcionales</i>		
CAb	80	ml H ₂ O/g muestra
CRA	80	ml H ₂ O/g muestra
CRa	8	ml H ₂ O/g muestra
Gel	1	%
<i>Compuestos bioactivos</i>		
Compuestos fenólicos T.	8.76 ± 1.39	mg E <i>Ac. Gálico</i> /gr. de muestra
Taninos condensados	1.97 ± 0.22	mg E <i>Catequina</i> /gr. de muestra
Flavonoides T.	10.11 ± 0.80	mg E <i>Rutina</i> /gr. de muestra

La presencia de nitrógeno puede indicar el contenido de proteína en el polvo de mucílago de linaza (Figura 7.20). Sin embargo, el bajo contenido de nitrógeno sugiere la presencia de aminoácidos o péptidos entrecruzados a la molécula. Ray y col. (2013) demuestran la asociación de proteínas con arabinogalactanos, formando una clase de glicoproteínas;

proteínas de arabinogalactanos (AGP), las cuales se se solubilizan en agua junto con el mucílago.

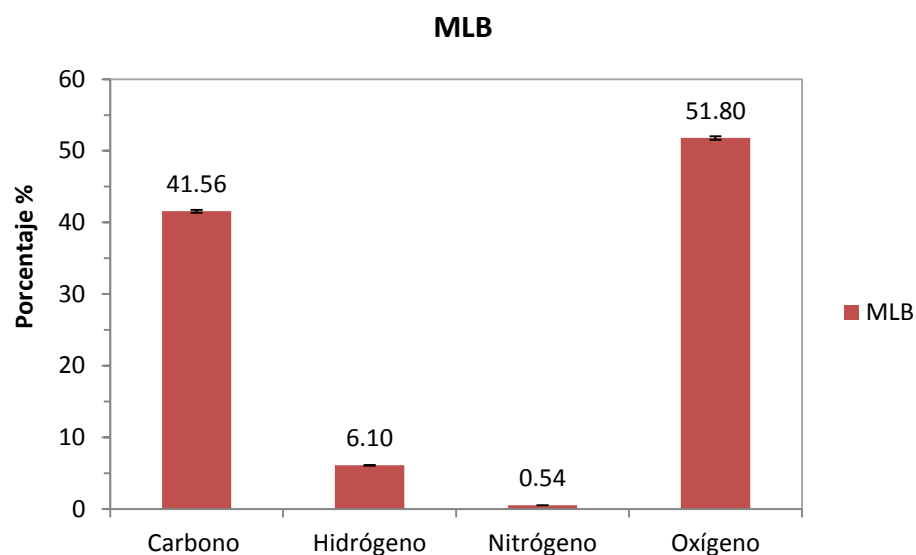


Figura 7.20. Composición elemental del mucílago de linaza MLB

Propiedades funcionales

La capacidad de retención de agua del mucílago de linaza fue de 80ml de agua /g de muestra; en estudios realizados al mucílago de la semilla de linaza se observó una menor CRA (3000 g H₂O/ 100g sólidos) (Fedeniuk & Biliaderis, 1994). Esta diferencia se le atribuye a los métodos utilizados para la determinación de la prueba, a la variedad de la especie utilizada, al tratamiento recibido, además al tamaño de partícula, ya que teóricamente a menor tamaño de partícula la facilidad de hidratación se aumenta, por la superficie de contacto que se tiene. En comparación con la CRA de goma guar y goma xantana (2200 g H₂O/ 100g sólidos y 32300 g H₂O/ 100g sólidos, respectivamente) (Fedeniuk & Biliaderis, 1994), se encuentra en un valor intermedio. En fracciones ricas en fibra de semilla de chía (Vázquez-Ovando y col., 2009; Capitani y col, 2012) se observó una menor CRA (9.19 y 15.41g de agua/g fibra).

La CRA del mucílago no sólo depende del grupo funcional de la fracción de polisacáridos que contiene grupos hidrofílicos, sino también de la fracción proteica presente en el mucílago. La capacidad de absorción de agua también depende del número y la naturaleza de los sitios de unión de moléculas de agua (Chau & Huang, 2004). El mucílago de linaza contiene

polisacáridos ácidos que poseen un gran número de grupos hidroxilos y carboxílicos, por lo tanto, la contribución de las gomas en la retención de agua es posible a través de las interacciones electrostáticas y los puentes de hidrógeno. La función de los grupos hidroxilo en la CRA de geles de mucílago de linaza se evalúa en la parte de las pruebas de FTIR en este trabajo.

Los dos mucílagos presentan una alta CRA, siendo ésta propiedad superior a la reportada por (Al-Sayed y col., 2012) en mucílago de linaza (2.58 ± 0.36) y menor a la encontrada para gomas de chía con grasa y desgrasada parcialmente (11.67 y 25.79 g aceite/g muestra, respectivamente) (Segura-Campos y col., 2014). El valor de MLB supera a la goma xantana (4.25 g aceite/g muestra) (Al-Sayed y col., 2012).

La CAb de la muestra MLB fue mayor que lo reportado por (Al-Sayed y col., 2012) en mucílago de linaza (22.63 ± 0.52 g agua/ 0.5 g muestra), mostrando un comportamiento similar de CAb que el comparativo con goma xantana (40.62 ± 0.22 g agua/ 0.5 g muestra). En contraste con la CAb en gomas, se reportan valores más bajos en harinas de chía (4.79 - 6.45 g/g) (Capitani y col., 2013) y harina de linaza (6.03 g/g) (Khattab & Arntfield, 2009). El contenido de fibra es un factor importante en el incremento de esta propiedad por su capacidad de formar geles y para retener el agua (Vázquez-Ovando y col., 2009); lo que justifica valores más altos de CAb en fracciones ricas en fibra como el mucílago.

Estos valores pueden estar relacionados con el tamaño de partícula (área de contacto), la composición química (cantidad de celulosa, hemicelulosa y pectina), en relación a la cantidad de grupos hidroxilos libres, capaces de interactuar con el agua externa y la cantidad de fibra dietética insoluble (Zambrano y col., 1998).

Las muestras de mucílago de linaza obtenidas por los dos diferentes métodos de secado presentan diferentes valores de CRA. Esto se podría explicar por el efecto significativo de los métodos de secado en la fracción hidrofóbica (es decir, lípidos y proteínas) presentes en la estructura del mucílago de semilla de linaza. De igual forma (Hayta y col., 2002) reportan cómo la capacidad de absorción de aceite de un alimento depende del tipo y contenido de la fracción hidrofóbica presente en su estructura química. La presencia de trazas de ácidos grasos y aminoácidos hidrófobos en la estructura del mucílago de semilla de linaza podrían ser algunos de los factores responsables de su tendencia a la absorción de aceite. La existencia de

varias cadenas laterales no polares pueden unir las cadenas hidrocarbonadas de aceites, lo que permite una mayor CRA (Thanatcha & Pranee, 2011) .

Al utilizar la concentración mínima de gelificación (CMG) como un índice de gelificación, se obtuvo en este estudio la CMG de 1% para el mucílago de linaza liofilizado (MLB), como se muestra en la Tabla 7.6.

Tabla 7.6. Concentración mínima de gelificación (CMG) del mucílago de linaza MLB a diferentes concentraciones.

Muestra	Concentración (%)						
	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5
MLB	-	CMG	+	+	+	+	+

(-) = no gelifica, (+) = gelifica y CMG = Concentración mínima de gelificación, mínima concentración a la cual el gel no se desliza al invertir el tubo.

Chau & Cheung (1997) en su investigación de tres semillas leguminosas reportaron la CMG entre (10 -13 % p/v), y en la harina de soja como referencia (17% p / v). Sathe y col. (1982) asocian la variación de las propiedades gelificantes a la proporción relativa de diferentes constituyentes tales como proteínas, lípidos e hidratos de carbono en diferentes leguminosas. Sin embargo, existen posibles asociaciones intermoleculares entre las moléculas de lixiviados y las moléculas de hidrocoloides que facilitan la formación de gel (Shi & BeMiller, 2002).

El mucílago en su concentración mínima de gelificación forma fácilmente un gel viscoso y denso, que aporta una textura firme. Se sugiere que una baja concentración de gelificación y una alta capacidad de expansión de área superficial de una sustancia mucilaginosas definen su naturaleza viscosa. La formación de gel y la fuerza del mucílago de linaza dependen de la concentración de la solución de mucílago de linaza. A mayor concentración, aumenta el número de moléculas y refuerza las interacciones moleculares, que dan lugar a la formación de más zonas de unión (Chen y col., 2006).

Compuestos bioactivos

La concentración de compuestos fenólicos totales es comparable con el valor reportado en estudios previos por (Nezhad y col., 2013) para mucílago de linaza (10.5 mgEAG/g). Por su

parte, Velioglu y col.,(1998) reportan una concentración de (1354 mg/100g) en mucílago de linaza, siendo éste valor mayor que el reportado en este estudio. Sin embargo, en mucílago de chía se observan valores menores de compuestos fenólicos totales en un rango de concentración de (0.757 a 0.881 mg/g) (Reyes-Caudillo y col., 2008). En contraste con los valores reportados en mucílago de linaza, la semilla entera muestra una concentración mucho menor de compuestos fenólicos totales, Velioglu y col. (1998) reportaron para la semilla de linaza variedad NorMan un contenido de polifenoles de 509 mg/100g y de 473 mg/100g para una variedad Solin. De igual forma, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la linaza presenta cantidades importantes de compuestos fenólicos totales ya que en fuentes vegetales de alimentos de importancia nutracéutica, como cereales, leguminosas y frutas se han reportado valores de 5.79, 17.43 y 28.38 mg/g, respectivamente (Saura-Calixto y col., 2007).

El contenido de flavonoides en semilla de linaza entera va desde 35 a 71 mg/100g y varía según la variedad de cultivo y factores ambientales (Oomah y col.,1996). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el mucílago de linaza presenta cantidades importantes de taninos condensados. En estudios realizados a la semilla entera de linaza, se observa un contenido de taninos de 179.5 mg/100g (Imran y col., 2014). La presencia de sustancias como taninos, y ocasionalmente la clorofila II en las células parenquimáticas de la superficie de la semilla de linaza, contribuyen en la coloración de la apariencia exterior de la semilla (Diederichsen & Richards, 2003). De igual forma Boesewinkel (1980) observó que los pigmentos de taninos de color amarillo-marrón depositados en las cavidades de las células de pigmento son responsables del color de la testa.

Propiedades fisicoquímicas

Los perfiles de viscosidad de las soluciones de mucílago de linaza MLB a diferentes concentraciones se muestran en la Figura 7.21. El comportamiento que presentan las soluciones de mucílago de linaza MLB es de tipo No-newtoniano, donde la viscosidad presenta una relación directamente proporcional a la concentración e inversamente proporcional a la velocidad rotacional, a concentraciones que varían de 0.5% a 1% (p / v).

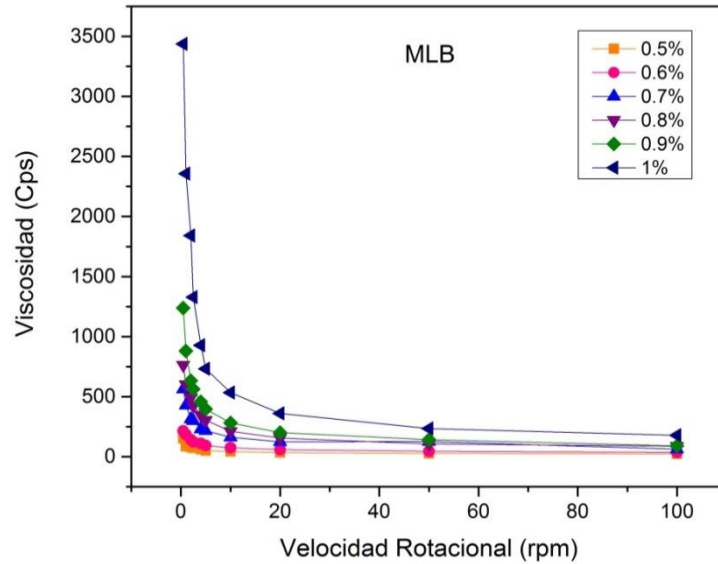


Figura 7.21. Perfil de viscosidad del mucílago de linaza MLB

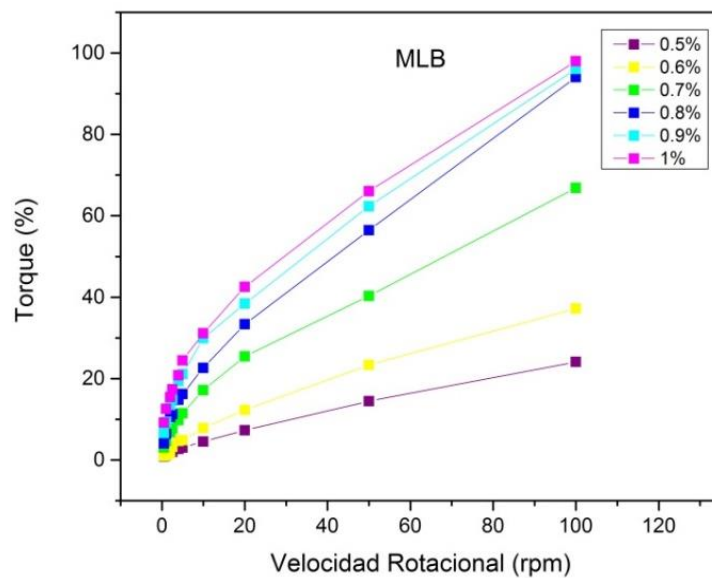


Figura 7.22. Velocidad de rotación vs. Torque de las muestras de mucílago de linaza MLB

Un comportamiento No-newtoniano en soluciones de mucílago de linaza ha sido observado por otros grupos de investigación (Wang, y col., 2008; Wang Y. y col., 2009; Nerkar & Gattani, 2013). Encontraron un aumento de pseudoplasticidad correspondiente a un aumento en la concentración de mucílago. Por lo tanto, los resultados de viscosidad mostrados en la Figura 7.21 parecen ser una función no sólo de la concentración de sólidos sino también del

tipo de proceso de obtención del mismo y de la variedad de cultivo. De igual manera se observó que el torque es directamente proporcional a la velocidad de rotación, como se muestra en la Figura 7.22 en mucílago de linaza liofilizado.

Los polvos de mucílago de linaza se analizan con base al sistema Hunter lab para la determinación del color (Tabla 7.7). El color del mucílago de linaza en polvo idealmente debe presentar una alta tendencia a tonalidades claras con el fin de evitar cualquier cambio de color en los productos alimenticios desde que es adicionado. El polvo secado por liofilización tiene significativamente alta luminosidad ($L = 85.00$) y bajo enrojecimiento ($a = 0,60$), lo que indica que este polvo tiene una buena calidad en términos de color y potencialmente buena aplicabilidad. Esto es debido al método el secado por liofilización, el cual trabaja a temperaturas por debajo de los 25°C y las condiciones de secado a las que se somete la muestra no permiten que se degraden sus componentes. En la Figura 7.23 se observa la fotografía del polvo de mucílago liofilizado.

Tabla 7.7. Parámetros de color (L^* , a^* y b^*) de los polvos de mucílago de linaza liofilizado.

Parámetros de color			
Muestras	L^*	a^*	b^*
MLB	70.14 ± 0.02^a	3.16 ± 0.03^b	13.84 ± 0.03^c



Figura 7.23. Coloración del polvo de mucílago de semilla de linaza MLB

7.2.2 Diagramas de fases MLB

El sistema de mucílago de linaza MLB únicamente presentó la fase sol. En dicho sistema no hay formación de gel y tampoco se presenta sinéresis debido a su alta capacidad de absorción y retención de agua. Autores como Chen y col., (2006) sugirieron que las soluciones de mucílago de semilla de linaza pueden formar geles en frío mediante la adición de sales minerales con diferentes números de valencia.

El diagrama de transición de fases de la mezcla de dos componentes (mucílago de linaza MLB + alginato) presenta las fases sol, gel y sinéresis, como se observa en la (Figura 7.24 y 7.25). De acuerdo con Draget y col. (1991), el fenómeno de sinéresis está fuertemente relacionado con la cantidad de calcio presente en el gel. En particular, la sinéresis es mayor cuando el contenido de calcio excede la cantidad de residuos de ácido gulurónico presente en el gel. La sinéresis fue observada en altas concentraciones de Ca^{2+} , indicando que los geles están próximos al límite de estabilidad, dando como resultado la separación de fases.

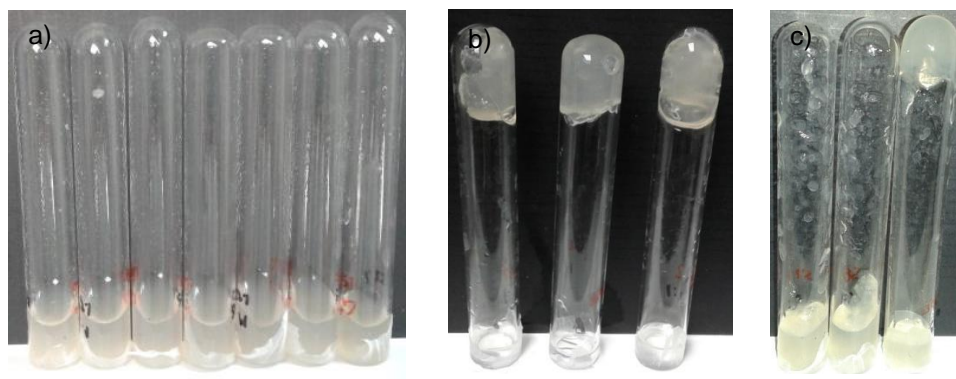


Figura 7.24. Fotografías de las fases de los sistemas alginato-mucílago de linaza. a) Sol, b) Gel y c) Sinéresis.

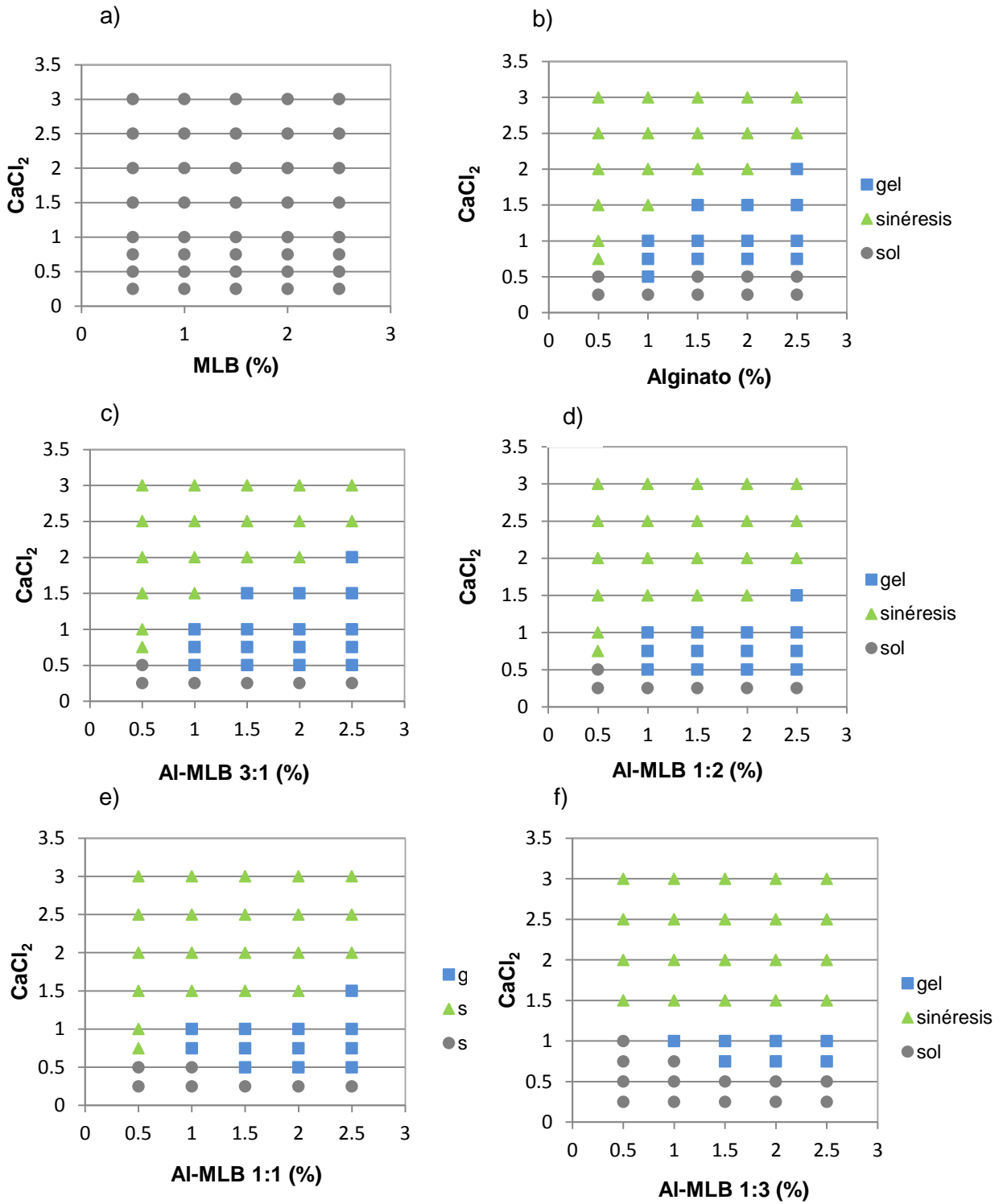


Figura 7.25. Diagramas de fases de mucílago de linaza MLB, alginato de sodio, algintato-mucílago. a) mucílago de linaza MLB b) alginato de sodio, c) Al-MLB 3:1, d) Al-MLB 1:2, e) Al-MLB 1:1, f) Al-MLB 1:3

7.2.3 Caracterización de microcápsulas con mucílago de linaza liofilizado MLB: tamaño, morfología, microestructura y ubicación del aceite microencapsulado

Microscopía óptica

Las microcápsulas preparadas con mucílago de linaza MLB y alginato en sus diferentes formulaciones fueron observadas y analizadas por microscopía óptica (Figura 7.26). En general, la mayoría de las microcápsulas presentaron forma esférica, así como también formas irregulares como se indica en las imágenes por SEM. La incorporación de alginato confiere a las microcápsulas una textura lisa, estas características fueron más prevalentes en la microcápsulas de la formulación F3, así como en la muestra control.

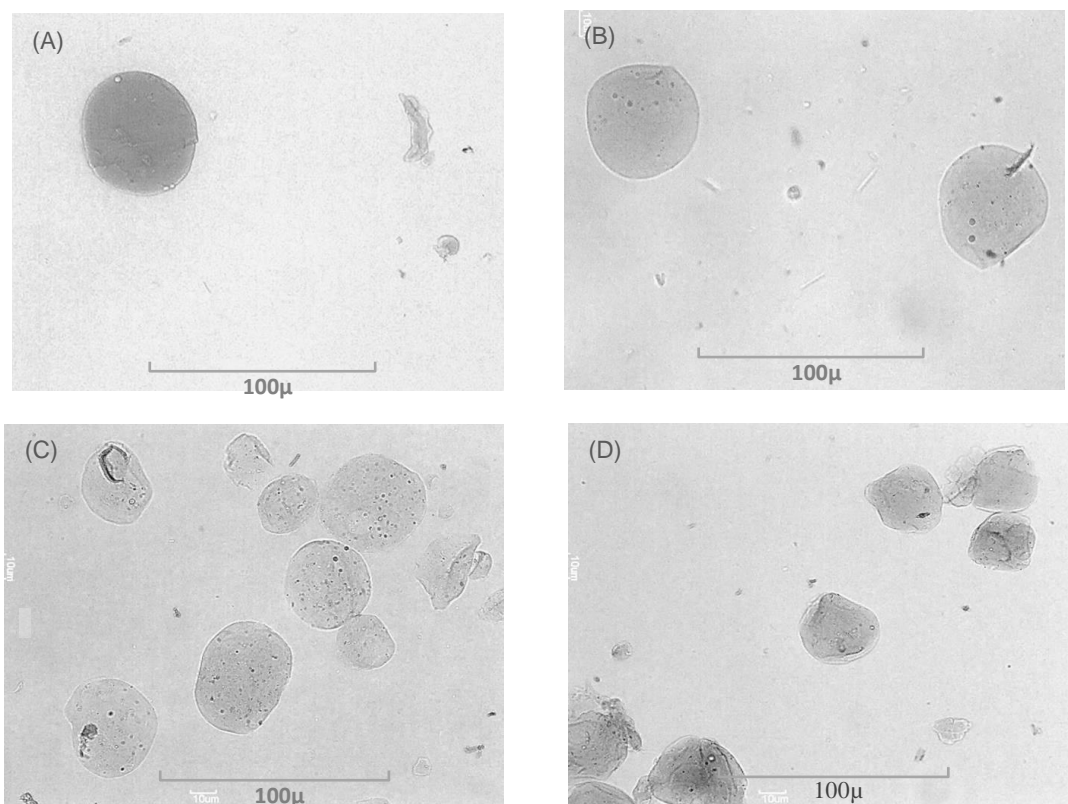


Figura 7.26. Imágenes por microscopía óptica de las microcápsulas preparadas con alginato y mucílago de linaza MLB. (A) Alginato (control), (B) Al:MLB 3:1 (F1), (C) Al:MLB 1:2 (F2), (D) Al:MLB 1:3 (imagen comparativa)

El diámetro registrado de las microcápsulas varía según la formulación. En la Tabla 7.8 se muestra el rango y el promedio del diámetro de las microcápsulas de cada una de las formulaciones analizadas. Se registraron diferentes tamaños de microcápsulas, las más pequeñas corresponden a la muestra control de alginato seguido de las proporciones 3:1 y finalmente el mayor tamaño lo presentan las proporciones 1:2. Dado que el mucílago de linaza posee propiedades de hinchamiento o expansión de tamaño, así como alta capacidad de retención de agua, se explica la diferencia observada en las microcápsulas más grandes producidas bajo las mismas condiciones.

Tabla 7.8. Tamaño de microcápsulas obtenidos de cada formulación

Muestra	Formulación	Proporción	Tamaño de las microcápsulas Diámetro (μm)		
			Rango	Promedio	
Alginato MLB	Control	Al	1	15- 24.7	19.85
	F3	Al:MB	3:1	20.2-56.5	38.35
	F4	Al:MB	2:1	33.7-68.2	50.95

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se observó la morfología y superficie de las microcápsulas preparadas con mucílago de linaza MLB por microscopía electrónica de barrido con ampliificaciones de 2500X. La superficie de las microcápsulas de alginato (control) (Figura 7.27), muestra una estructura lisa y firme con crestas irregulares, mientras que las formulaciones F1 y F3 (Figura 7.28A y 7.28B) muestran una pared algo más suave y su estructura interna revela la aparición de pequeñas microcavidades. En cuanto a las formulaciones F2 y F4 presentan poros distribuidos con regularidad y una apariencia menos densa y firme. Este resultado concuerda con imágenes de SEM de la superficie de microcápsulas de alginato y pectina de linaza que envuelve aceite de hígado de tiburón, mostrando poros distribuidos irregularmente (Díaz-Rojas y col., 2004).

En general, se observó en el aspecto de las microcápsulas una pérdida aparente de la forma esférica debido a la deshidratación con etanol. Sin embargo, las microcápsulas dispersadas en etanol no pierden totalmente su integridad. Las microcápsulas presentaron un tamaño aproximado de 30 μm , dicho resultado concuerda con los obtenidos por la microscopía óptica.

Para analizar las características morfológicas de las microcápsulas, se recurre normalmente a técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM) que también permiten detectar la posible agregación de las partículas, así como determinar el tamaño de las mismas y su estructura interna.

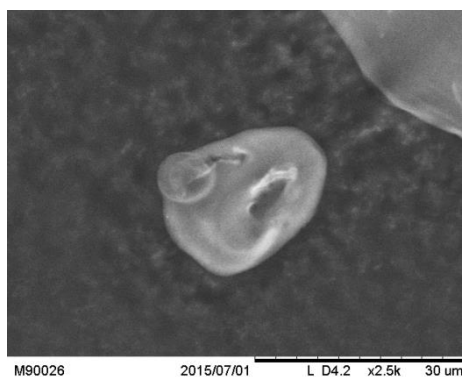


Figura 7.27. Micrografías de microcápsulas de alginato (muestra control)

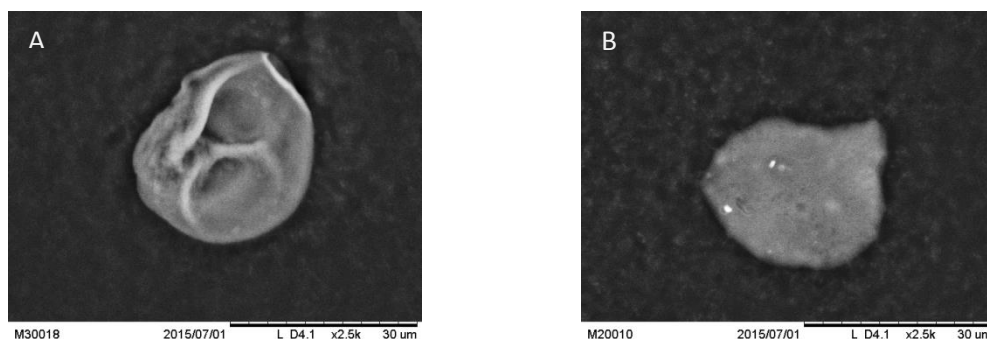


Figura 7.28. Micrografías de microcápsulas de mucílago de linaza MLB. (A) Al:MLB 3:1 (F3), (B) Al:MLB 1:2 (F4).

Microscopia láser confocal (MLC)

Las Figuras 7.29 y 7.30 muestran las partículas rojas sobre el fondo negro a la longitud de excitación del Rojo de Nilo. La tinción de aceite con rojo Nilo permite distinguir entre el aceite encapsulado y la matriz polimérica, ya que el microscopio confocal proporciona una sola imagen del plano de enfoque con las partes fuera de foco apareciendo como fondo negro. El análisis de las imágenes permite la inspección de la estructura no sólo en la superficie sino también del interior del material (Lamprecht y col., 2000).

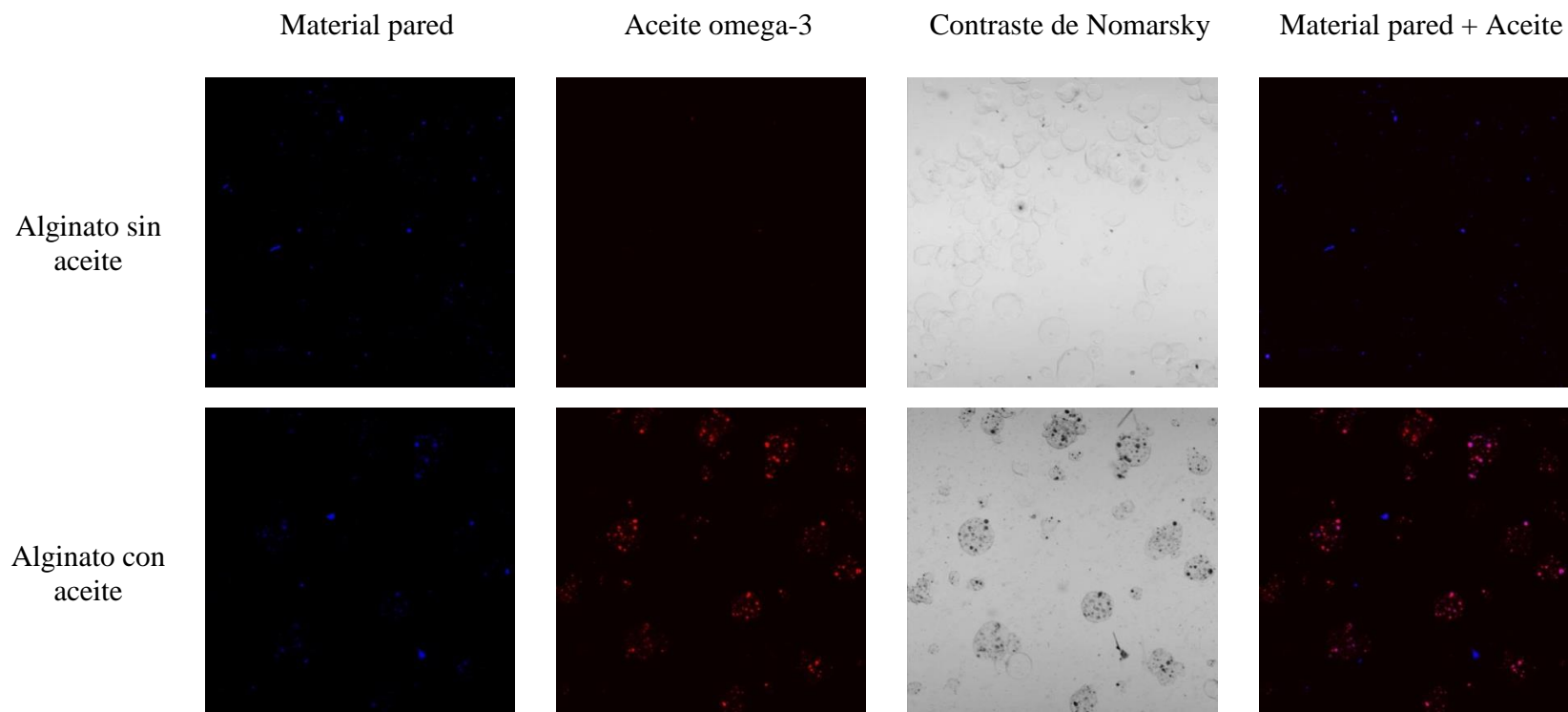


Figura 7.29. Micrografías de las microcápsulas Formulación control (alginato) y Alginato sin aceite como blanco.

El análisis por microscopía confocal permitió una mejor visualización de las microcápsulas, siendo posible, localizar el aceite de atún omega-3 (DHA/EPA) distribuido en las microcápsulas debido a la especificidad del colorante.

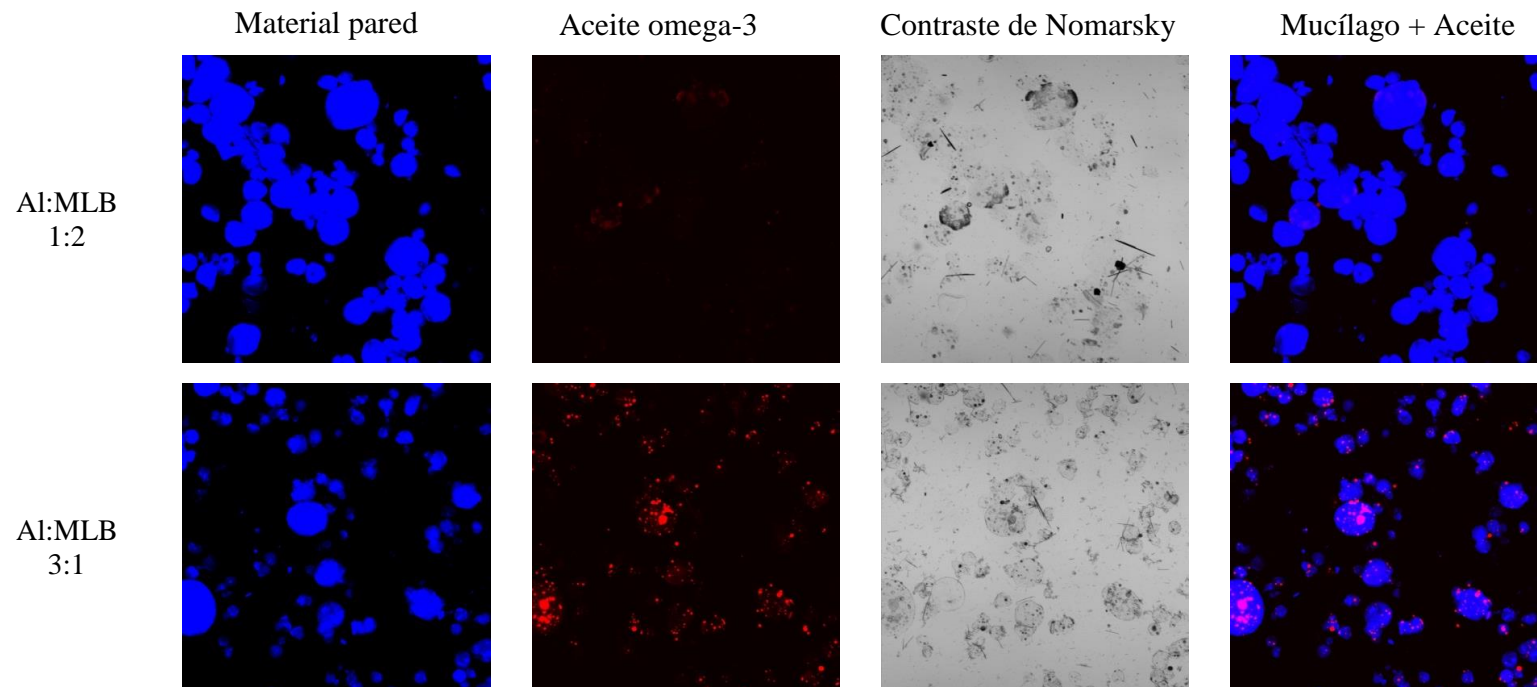


Figura 7.30. Micrografías de las microcápsulas Formulación F3 (Al:MLB 1:2) y F4 (Al:MLB 3:1).

Espectroscopia de infrarrojo por transformadas de fourier (FTIR-ATR)

Los espectros de FTIR muestran las bandas típicas y picos característicos del mucílago. El espectro FTIR del mucílago de semilla de linaza MLB se presenta en la Figura 7.31, mostrando bandas típicas y el pico característico de los polisacáridos. Se presentan bandas de absorción destacables en 3320 cm^{-1} (vibraciones O-H) y 2926 cm^{-1} (vibraciones C-H) de grupos metilo. El espectro de mucílago de linaza MLB presenta dos bandas, una mayor que aparece en 1601 cm^{-1} y otra de menor intensidad en 1417 cm^{-1} . Estas dos bandas corresponden respectivamente, a vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas debido al grupo ionizado COO^- de ácido poligalacturónico (Kamnev y col., 1998).

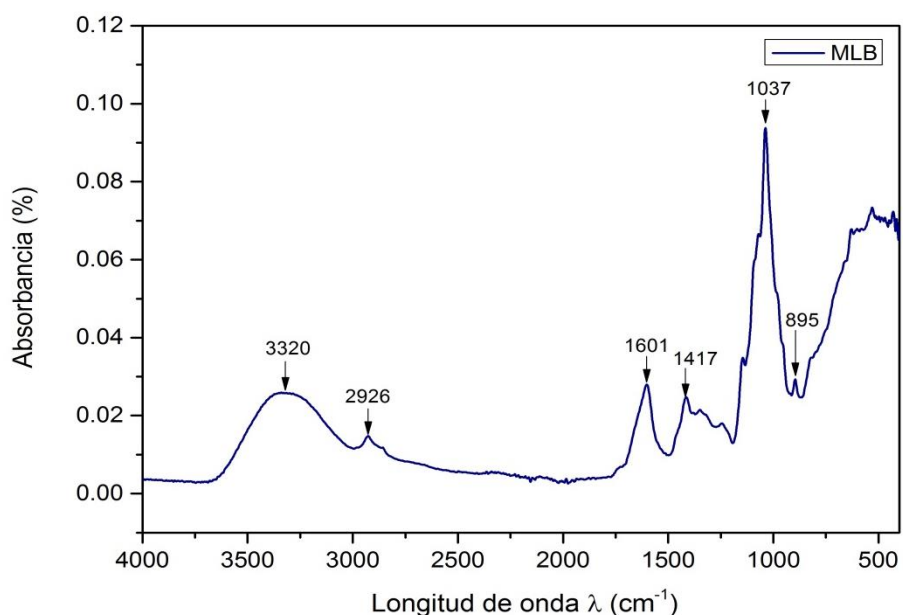


Figura 7.31. Espectro FT-IR del mucílago de linaza MLB.

Las gomas naturales generalmente contienen fracciones de unidades ácidas de azúcar, que por lo general imparten un carácter aniónico débil a la macromolécula de mucílago (Wang, Ellis, & Ross-Murphy, 2003). Los números de onda entre 800 y 1200 cm^{-1} representan el área de la “huella digital” para los carbohidratos. De acuerdo con Kacuráková y col. (2000), las bandas de IR alrededor de 1160 - 30 cm^{-1} están dominadas por la presencia del enlace O-glucosídico (C-O-C), en 1070 y 1043 cm^{-1} se asocia al compuesto ramnogalacturano y a frecuencias más bajas (1051 - 1039 cm^{-1}) se encuentran polisacáridos con constituyentes como manosa,

arabinosa y ramnosa. El tipo de bandas mencionadas anteriormente coinciden con las muestras de mucílago MLB, presentando bandas de absorción en 1145 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} (vibraciones C-C), 1037 cm^{-1} (vibraciones C-O) y 895 cm^{-1} .

Los espectros FT-IR del alginato de sodio y del mucílago de linaza MLB en polvo presentaron bandas de absorción similares, dada las características que comparten al formar parte del grupo de los polisacáridos. En los espectros FTIR de las microcápsulas de alginato-mucílago no se observaron cambios en la aparición de las bandas de absorción, sin embargo el cambio en la intensidad en los picos representativos si fue evidente. En los espectros de las formulaciones de microcápsulas de la formulación F3 y F4 la longitud de onda mostró cambios en el pico de COO^- , cambió de 1607 y 1424 cm^{-1} a 1601 y 1417 cm^{-1} , respectivamente.

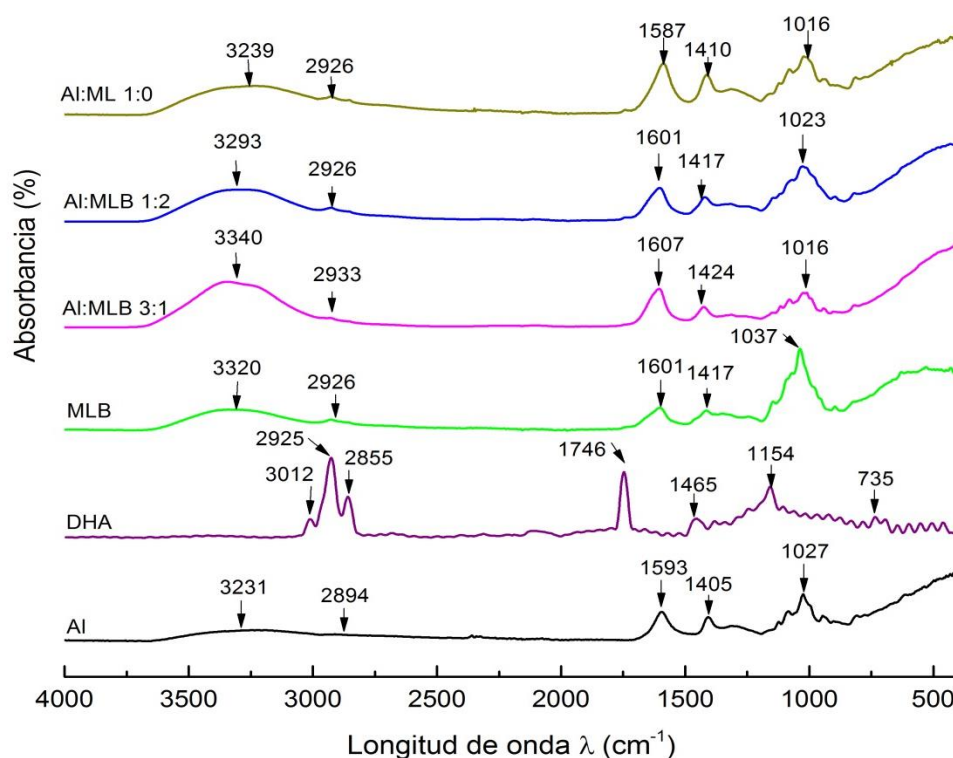


Figura 7.32. Espectros FTIR de los componentes de las microcápsulas MLA: Alginato de sodio (Al), Ácido graso omega 3 (DHA), Mucílago de linaza por deshidratación solar (MLB), Microcápsulas formulación F3 (Al:MLB 3:1), Microcápsulas formulación 4 (Al:MLB 1:2), y Microcápsulas formulación control (Al:ML 1:0).

Eficiencia de encapsulación (EE)

El aceite superficial y la eficiencia de encapsulación (EE) de las microcápsulas producidas como una función de polisacáridos y contenido de aceite se muestran en la figuras 7.33 y 7.34, respectivamente.

En general, el aceite superficial para la formulación de alginato (control) (0.68%) y la formulación F3 (0.98%) se encontraron por debajo del 1%, y menor que el observado en la formulación F4 (1.38%).

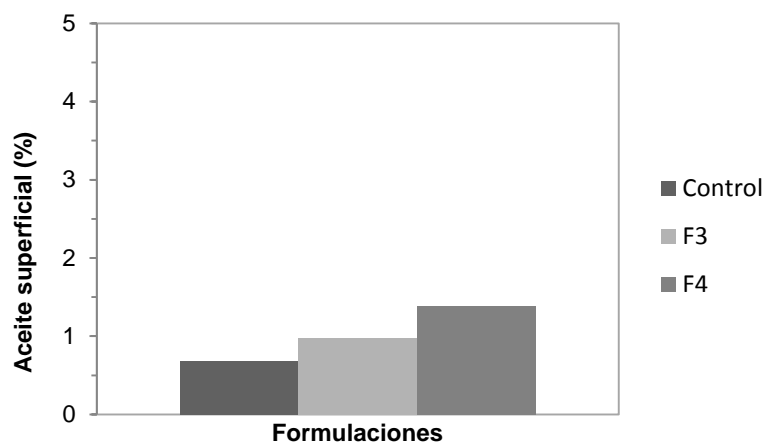


Figura 7.33. Aceite superficial extraído de las microcápsulas a diferentes formulaciones.

Formulación control (Alginato), F3(Al:MLB 3:1) y F4 (Al:MLB 1:2).

En el presente estudio, las microcápsulas preparadas a partir de alginato (formulación control) mostraron significativamente menor grasa superficial y mayor EE que las formulaciones F3 y F4. La formulación control (Alginato) (96.61%) tiene la mayor EE que las microcápsulas formuladas con mucílago de linaza. La EE de las formulación con mayor cantidad de alginato F3 (95.08%) es mayor que las formulación preparada con mayor cantidad de mucílago F4 (93.11%).

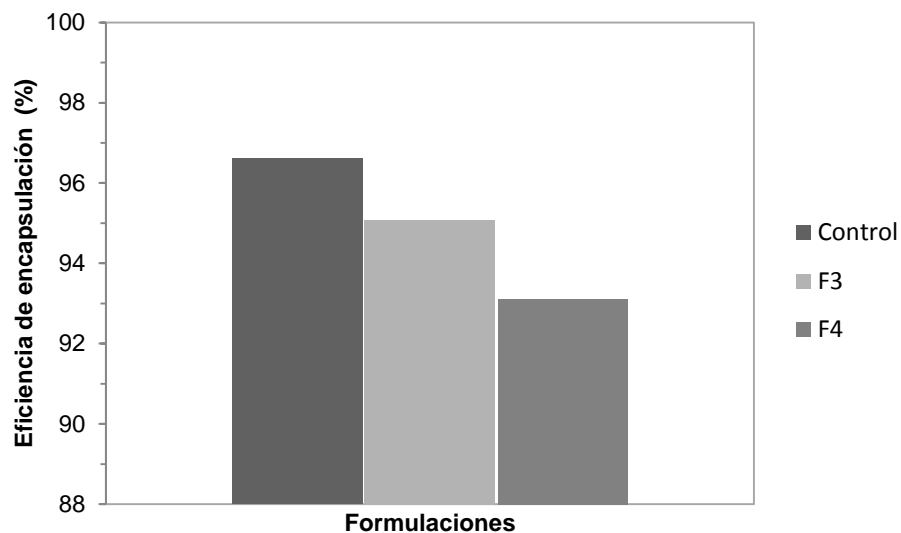


Figura 7.34. Eficiencia de encapsulación de microcápsulas producidas con diferentes combinaciones de material pared. Control (Alginato), F3(Al:MLB 3:1), F4 (Al:MLB 1:2)

Este excelente rendimiento se relaciona bien con la estabilidad mostrada por las emulsiones preparadas con el mucílago de linaza, que puede haber protegido a las gotas de aceite de la desintegración durante el proceso de atomización. Por otra parte, los mucílagos en general son conocidos por su capacidad de absorción de aceite, lo que puede influir positivamente el proceso de microencapsulación, evitando la migración de aceite a las partículas de la superficie.

La estabilidad de la emulsión es una propiedad importante a ser considerada en un proceso de microencapsulación. La estabilidad de la emulsión surge de la repulsión estérica de los agregados por una capa hidratada (Willats y col., 2006). La pectina estabiliza una emulsión mediante la creación de una capa de alrededor de las partículas en la interfaz. También se ha reportado que las emulsiones estables se forman utilizando la pectinas de bajo peso molecular (70 kDa) (Akhtar y col., 2002) y también debido a la interacción entre las moléculas cargadas (pectina) y proteínas (Leroux y col., 2003).

De acuerdo a Tonon y col. (2012), la eficiencia de encapsulación está significativamente influenciada tanto por el tipo de material pared como la concentración de aceite, siendo los

materiales de tipo proteico menos eficientes para la encapsulación de aceites que los basados en carbohidratos.

El contenido de aceite superficial es un factor determinante para la eficiencia de encapsulación de las formulaciones de microcápsulas. Cabe señalar que la cantidad de aceite de la superficie determinada en cápsulas en forma de polvo depende en gran medida del método de extracción utilizado y de las condiciones (Klinkesorn y col., 2006). Una tendencia común que se encuentra entre los estudios implicados en la encapsulación de aceite ha sido que al aumentar la carga de aceite dentro del polvo encapsulado, hay un aumento correspondiente en el contenido de aceite de la superficie y una disminución en la EE (Tonon y col., 2012; Kagami y col., 2003; Quispe-Condori y col., 2011)

El método de secado también se ha demostrado que desempeñan un papel influyendo en el aceite superficial y la EE. Quispe-Condori y col. (2011) utilizaron tanto secado por aspersión como liofilización para encapsular aceite de linaza dentro de la proteína zeína a niveles de carga de aceite de 8 y 20%. Los autores encontraron que el contenido de aceite superficial en los polvos por secado por aspersión y liofilizados fueron 90 y 79% y 60 y 33%, para las cápsulas con cargas de aceite de 8 y 20%, respectivamente.

7.3 Discusión general

La realización de las pruebas de caracterización fisicoquímica y funcional del mucílago de linaza en polvo, así como su aplicación en el desarrollo de emulsiones O/W (DHA/EPA y solución polimérica) en la preparación de microcápsulas, revela información útil para el uso del mucílago de linaza, ya que la elección de un hidrocoloide para una determinada aplicación depende básicamente de la viscosidad o fuerza de gel deseado, de sus características reológicas, del pH del sistema, de las interacciones con otros ingredientes, de la temperatura durante el procesado, textura y del coste de las cantidades requeridas para obtener los resultados que se desean. Esta información representa un aporte significativo a las características y posibles aplicaciones de productos derivados de la semilla de linaza en la microencapsulación de ácidos grasos omega-3, de acuerdo a los requerimientos de la industria y las tendencias actuales de los consumidores con respecto a consumir alimentos funcionales vinculados con la relación nutrición-salud.

Con base en los diagramas de fases de los sistemas alginato-mucílago presentados, se observó la gelificación en todas las concentraciones evaluadas. Sin embargo, a medida que se incrementa la cantidad de alginato de sodio, la formación del gel es más fuerte que a concentraciones bajas del polímero. De esta manera se eligió usar dos concentraciones: alginato-mucílago 3:1 representando la mayor proporción de alginato y alginato-mucílago 1:2 representando la mayor proporción de mucílago de linaza. En cuanto a la concentración de cloruro de calcio se eligió 1% por que el sistema alginato tanto puro como en los sistemas mixtos presenta la formación de gel bajo ésta concentración de la sal.

La caracterización de las microcápsulas por MLC mostró que la fluorescencia de lípidos con Rojo de Nilo es muy sensible a la fase de aceite y éste puede ser fácilmente localizado. En comparación con un microscopio de luz transmitida, la MLC puede proporcionar información adicional, como la localización tridimensional y la distribución espacial de los elementos que componen a las microcápsulas. La superficie externa determinada por SEM mostró cierta porosidad de acuerdo a la variación de alginato de sodio, ofreciendo pruebas razonables de la capacidad de los materiales pared para ayudar a reducir la velocidad de oxidación en comparación con aceite sin encapsular. El nuevo concepto de la aplicación de FTIR se ha sugerido para encontrar si la fase oleosa se encapsula físicamente en la matriz del material

pared. Sin embargo, el efecto de la interacción entre los materiales utilizados para las microcápsulas necesita un mayor estudio en relación a la formación de enlaces durante la preparación de microcápsulas.

La combinación de alginato y mucílago de linaza entre sí permiten obtener resultados específicos en la textura y morfología de las microcápsulas de DHA/EPA. En general, se puede afirmar que el uso de mezclas de hidrocoloides es una práctica general, que presenta numerosas ventajas tanto desde el punto de vista de desarrollo e investigación, como desde el industrial. Por una parte, es posible la aparición de una sinergia que permite la reducción de las cantidades totales y, por otro lado, pueden elaborarse formulaciones específicas dirigidas a diferentes condiciones de uso como un espesante, emulsificante, agente de textura, etc.

La característica más importante del mucílago de linaza es la modificación que introducen en las propiedades reológicas de los alimentos a los que se añaden. El mucílago de linaza ofrece un particular interés, derivado del hecho de presentar simultáneamente las propiedades de los polisacáridos lineales y los ramificados. Existe una relación entre la estructura de estos polímeros y sus propiedades reológicas en disoluciones acuosas, las cuales con agua, producen disoluciones muy viscosas, suspensiones o geles. Los polisacáridos del mucílago de linaza son moléculas hidrófilas, interaccionan con las del agua adyacente y las inmovilizan. Las moléculas adquieren así mayor volumen debido a su diámetro aparentemente agrandado.

8. CONCLUSIONES

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo confirmaron algunas conclusiones anteriores hechas por otros investigadores y ha generado algunos nuevos hallazgos que apoyan los objetivos de la investigación inicial.

Las siguientes fueron las principales conclusiones:

- El mucílago de linaza fue un encapsulante efectivo en términos de eficiencia encapsulación y requiere la adición de alginato de sodio para usar el método de gelificación iónica. Se comprobó que el uso de alginato/mucílago como material encapsulante en las proporciones 3:1 y 1:2 presenta buenas características para encapsular los aceites esenciales omega-3 (DHA/EPA) provenientes del aceite de pescado, sin embargo fue posible conseguir la formación de microcápsulas desde proporciones 1:3 de alginato/mucílago.
- El cuanto a la utilización del mucílago de linaza como único material pared no fue posible bajo el método de gelificación iónica, puesto que el efecto del entrecruzamiento con los iones de Ca^+ no forma una red tridimensional fuerte, no obstante continua siendo un material idóneo para ser aplicado como encapsulante bajo otras técnicas de encapsulación ya sea a través de métodos químicos o físicos, como es el caso del secado por aspersión, donde existen reportes sobre la utilización del mucílago de linaza como material pared en el área de la investigación de aplicaciones farmacéuticas (Patel y col., 2013).
- A través de microscopía confocal (MLC) se observó la forma en que se incluyen las partículas de aceite en la estructura de la microcápsula. Al preparar la emulsión el aceite queda disperso en la solución polimérica formando micelas, y al inducir la gelificación iónica a través de los iones de CaCl_2 , el alginato de sodio forma la capa envolvente dejando en su interior el mucílago de linaza y el aceite. Ésta distribución se identificó con los fluorocromos Rojo de Nilo y Calcoflour®, observándose por separado la tinción de ambos en una sola microcápsula. Al combinar los canales de excitación de cada fluorocromo se superponen los colores y se llegó a la conclusión

que tanto el mucílago de linaza como el aceite se encuentran dentro de las microcápsulas.

- A través de microscopía electrónica de barrido (MEB) así como la microscopía óptica permitió determinar la morfología y tamaño de las microcápsulas que fueron del orden de 9µm a 51µm. El uso de espectroscopia de infrarrojo permitió ver los modos vibracionales de los enlaces que van asociados con los ácidos grasos omega-3 (DHA/EPA) ubicados en 3012 cm⁻¹ y los modos de vibración asociados al mucílago de linaza en 1070 y 1043 cm⁻¹, y el alginato de sodio en 1309 y 1084 cm⁻¹.

9. PERSPECTIVAS

Este estudio identificó la posible aplicación del mucílago de linaza como una matriz alimentaria, evaluando su capacidad como material encapsulante para proteger los ácidos grasos omega-3 (DHA/EPA). Se podría sugerir medir la capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos presentes en el mucílago de linaza de manera natural y evaluar su contribución en la estabilidad oxidativa de los ácidos grasos omega-3, optimizando los parámetros del proceso para estabilizar las microcápsulas. Se recomienda también para estudios posteriores centrarse en ingredientes naturales de los alimentos ricos en antioxidantes como fitosteroles que podrían ser útiles para proteger los aceites de la oxidación. Además, un análisis in vitro de las microcápsulas podría plantearse para examinar la liberación de los ácidos grasos omega-3 en la simulación gástrica y digestión intestinal. Finalmente el uso de otro método de encapsulación podría determinar si es posible usar el mucílago de linaza por sí solo como material pared.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, J. (2005). Why food microstructure? *Journal of Food Engineering* , 67, 3-11 .
- Aguilera, J., & Stanley, D. (1990). *Microstructural principles of food processing y engineering* . England: Elsevier Applied Science.
- Ahmed, M., Hamed, R., Ali, M., Hassan, A., & Babiker, E. (2006). Proximate composition, antnutritional factors and protein fractions of guar gum seeds as influenced by processing treatments . *Pakistan Journal of Nutrition* , 5, 340-345.
- Akhtar, M. D., Mazoyer, J., Langendorff, V., Valle, G., & Popineau, Y. (2002). Emulsion-stabilizing properties of depolymerised pectin. *Food Hydrocolloids*, 16, 249-256.
- Alix, S., Marais, S., Morvan, C., & Lebrun, L. (2008). Biocomposite materials from flax plants: Preparation and properties. *Composites: Part A*, 1793–1801.
- Al-Sayed, H., Rasmy, N., & Rizk, I. a. (2012). Functional properties of some fat-replacers and their uses in preparation of reduced-fat mayonnaise. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 7 (1): 109- 119.
- American Association of Cereal Chemists, A. D. (2010). The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46, 112-126.
- Badui, D. (2006). *Química de los Alimentos 4ta. Edición*. Ciudad de México: Pearson Educación.
- Bae, E. K., & Lee, S. J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25, 549–560.
- Barbary, O., Al-Sohaimy, S., El-Saadani, M., & Zeitoun, A. (2009). Extraction, composition and physicochemical properties of flaxseed mucilage. *Journal of Advance Agricultural Research*, 14, 605–620.
- Barbosa-Canovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., & Yan, H. (2005). Encapsulation. In G. V. Barbosa-Canovas, *Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality* (p. 372). New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Barnes, H. A., Hutton, J. F., & Walters, K. (1989). *An introduction to rheology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Baxter, A., Dilllon, M., Taylor, K., & Roberts, G. (1992). Improved method for IR determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14, 166-169.

- Bemiller, J. N., & Whistler, R. L. (1996). Carbohydrate. In O. R. Fennema, *Food Chemistry 3rd. Edition* (pp. pp. 157–223). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Boesewinkel, F. D. (1980). Development of ovule and testa of *Linum usitatissimum* L. . *Acta Botanica Neerlandica*, 29, 17-32.
- Borwankar, R., & Shoemaker, F. (1992). *Rheology of Foods*. Londres: Elsevier Science Publishers, LTD.
- Capitani, M., Nolasco, S., & Tomás, M. (2013). Effect of Mucilage Extraction on the Functional Properties of Chia Meals. In I. Muzzalupo, *Food Industry* (pp. 421-437). Croacia: InTech.
- Capitani, M., Spotorno, V., Nolasco, S., & Tomás, M. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT- Food Science and Technology*, 45, 94–102.
- Carneiro, H., Tonon, R., Grosso, C., & Hubinger, M. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115, 443–451.
- Champagne, C., & Fustier, P. (2007). Micro encapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology*, 18, 184-190.
- Chau, C., & Cheung, P. (1997). Functional properties of flours prepared from three Chinese indigenous legume seeds. *Food Chemistry*, 61, 429-433.
- Chau, C., & Huang, Y. (2004). Characterization of passion fruit seed fibres-a potential fibre source. *Food Chemistry* 85, 189–194.
- Chen, H. H., Xu, S., & Wang, Z. (2006). Gelation properties of flaxseed gum. *Journal of Food Engineering*, 77, 295–303.
- Chen, J., Piva, M., & Labuza, T. (1984). Evaluation of water binding capacity (WBC) of food fiber sources. . *Journal of Food Science* , 49, 59-63.
- Cui, W., & Mazza, G. (1996). Physicochemical characteristics of flaxseed gum. *Food Research International*, 29, 397-402.
- Cui, W., Mazza, G., & Biliaderis, C. G. (1994). Chemical structure, molecular size distributions and rheological properties of flaxseed gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1891-1895.
- Cunnane, S. C., & Thompson, L. U. (1995). *Flaxseed in human nutrition 1st. edition* . Champaign, Illinois: AOCS Press.

- Daun, J. K., Barthet, V. J., Chornick, T. L., & Duguid, S. (2003). Structure, composition, and variety development of flaxseed. In L. Thompson, & S. Cunanne, *Flaxseed in Human Nutrition* (pp. pp. 1-40). Champaign, Illinois: 2nd ed. AOCS Press.
- Development and Characterization of Mucoadhesive Microspheres of. (n.d.). *Indian Journal of Novel Drug Delivery*.
- Díaz-Rojas, E., Pacheco-Aguilar, R., Lizardi, J., Argüelles-Monal, W., & Valdez, M. (2004). Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocolloids* , 18, 293–304.
- Diederichsen, A., & Richards, K. (2003). Cultivated flax and the genus *Linum* L. Taxonomy and germplasm conservation. In A. D. Westcott, *Flax The Genus Linum*. New York: Taylor & Francis Inc.
- Dikeman, C., & Fahey, G. (2006). Viscosity as related to dietary fiber: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 26, 649-63.
- Draget, K., Oestgaard, K., & Smidsroed, O. (1991). Homogeneous alginate gels: A technical approach. *Carbohydrate Polymers*, 14, 159-178.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose. In T. Heinze, *Polysaccharides I - Structure, Characterization and Use* (pp. 1-68). Berlin: Springer.
- Fedeniuk, R. W., & Biliaderis, C. G. (1994). Composition and Physicochemical Properties of Linseed (*Linum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 240-247.
- Figuerola, F. E., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I., & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry* , 91, 395-401.
- Figuerola, F., Muñoz, O., & Estévez, A. F. (2008). La linaza como fuente de compuestos bioactivos para la elaboración de alimentos. *Agro Sur*, 36, 49-58.
- Flax Council of Canada. (2015). *Chapter 1 - Description and Composition of Flax*. Retrieved from Flax Council of Canada: http://flaxcouncil.ca/wp-content/uploads/2015/03/FlxPrmr_4ed_Chpt1.pdf
- Fleury, N., & Lahaye, M. (1991). Chemical and physico-chemical characterization of fibres from laminaria digitata (kombu breton): a physiological approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 33, 389-400.
- Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M., & Dumoulin, E. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 27-35.

- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330–347.
- Greenspan, P., & Fowler, S. D. (1985). Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of Lipid Research*, 26, 781–789.
- Guilloux, K., Gaillard, I., Courtois, J., Courtois, B., & Petit, E. (2009). Production of Arabinoxylan-oligosaccharides from Flaxseed (*Linum usitatissimum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 11308–11313.
- Hall, C., Tulbek, M., & Xu, Y. (2006). Flaxseed. *Advances in Food and Nutrition Research*, 51, 1–97.
- Hayta, M., Alpslam, M., & Baysar, A. (2002). Effects of drying methods on functional properties of tarhana: a wheat flour yoghurt mixture. *Journal of Food Science*, 67:740–744.
- Herchi, W., Arráez-Román, D., Boukhchina, S., Kallel, H., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutierrez, A. (2012). A review of the methods used in the determination of flaxseed components. *African Journal of Biotechnology*, 11, 724–731.
- Hunt, K., & Jones, J. (1962). The structure of linseed mucilage. *Canadian Journal of Chemistry*, 40, 1266–1279.
- Imran, M., Anjum, F. M., Butt, M. S., & Sheikh, M. A. (2014). Influence of Extrusion Processing on Tannin Reduction and Oil Loss in Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Meal. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38, 622–629.
- Iwe, M., Obaje, P., & Akpapunam, M. (2004). Physicochemical properties of cissus gum powder extracted with the aid of edible starches. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 161–168.
- Izydorczyk, M., Cui, S. W., & Wang, Q. (2005). Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications. In S. W. (Ed.), *Polysaccharide Gums: Structures, Functional Properties, and Applications* (pp. pp. 293–295). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Jaya, S., Durance, T. D., & Wang, R. (2009). Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules. *Journal of Microencapsulation*, 26, 143–153.
- Junter, G., & Vinet, F. (2009). Compressive properties of yeast cell-loaded Ca-alginate hydrogel layers: comparison with alginate- CaCO₃ microparticle composite gel structures. *Chemical Engineering Journal*, 145, 514–521.

- Kacuráková, M., Capeka, P., Sasinková, V., Wellner, N., & Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43, 195-203.
- Kaewmanee, T., Bagnasco, L., Benjakul, S., Lanteri, S., & Morelli, C. (2014). Characterisation of mucilages extracted from seven Italian cultivars of flax. *Food Chemistry*, 148, 60–69.
- Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., & Matsumura, Y. (2003). Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of Food Science: Food Engineering and Physical Properties*, 8, 2248-2255.
- Kamnev, A. A., Colina, M., Rodríguez, J., Ptitchkina, N. M., & Ignatov, V. V. (1998). Comparative spectroscopic characterization of different pectins and their sources. *Food Hydrocolloids*, 12, 263–271.
- Khatab, R., & Arntfield, S. (2009). Functional properties of raw and processed canola meal. *LWT- Food Science and Technology*, 42: 1119-1124.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*, 39, 449-457.
- Lamprecht, A., Schäfer, U., & Lehr, C.-M. (2000). Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49, 1-9.
- Lands, W. E. (2005). *Fish, Omega-3 and human health*. Illinois: AOCS Press.
- Laurrari, J., Bárbara, B., & Saura-Calixto, F. (1997). Seasonal changes in the composition and properties of a high dietary fiber powder from grapefruit peel. *Journal of the Science and Agriculture*, 74, 308-312.
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17, 455–462.
- Maddams, W. F., & Hendra, P. J. (1996). Fourier transform infrared and raman spectroscopies in the study of polymer orientation. . In A. H. Fawcett, *Polymer Spectroscopy* (pp. 173-202). England: John Wiley & Sons Ltd.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79, 727-747.

- Mishra, P., Srivastava, V., Verma, D., Chauhan, O., & GK, R. (2009). Physicochemical properties of chakiya variety of amla (*emblica officinalis*) and effect of different dehydration methods on quality of powder. *African Journal of Food Science*, 3, 303–306.
- Nerkar, P., & Gattani, S. (2013). Oromucosal delivery of venlafaxine by linseed mucilage based gel: in vitro and in vivo evaluation in rabbits. *Archives of Pharmacal Research*, 36:846–853.
- Nezhad, M., Duc, C., Han, N., & Hosseinian, F. (2013). Flaxseed Soluble Dietary Fibre Enhances Lactic Acid Bacterial Survival and Growth in Kefir and Possesses High Antioxidant Capacity. *Journal of Food Research*, 2, 152-163.
- Ochoa-Villarreal, M., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I., & Martínez-Téllez, M. (2012). Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In D. A. Gomes, *Polymerization*,. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/polymerization/plant-cell-wall-polymers-function-structure-and-biological-activity-of-their-derivatives>: InTech.
- Onwulata, C., Smith, P., Craig Jr, J., & Holsinger, V. (1994). Physical properties of encapsulated spray dried milks. *Journal of Food Science*, 59, 316-320.
- Oomah, B. D. (2003). Processing of flaxseed fiber, oil, protein, and lignan. In F. i. edition, *Thompson, L.U.; Cunnane, S.C.* (pp. pp. 363-386). Champaign, Illinois. : AOCS Press.
- Oomah, B., & Mazza, G. (1998). Flaxseed products for disease prevention. In G. Mazza, *Functional foods: Biochemical & Processing aspects*. (pp. 91-138). Pennsylvania, USA: Technomic Pub. Co.
- Oomah, B., Mazza, G., & Kenaschuk, O. E. (1996). Flavonoid content of flaxseed. Influence of cultivar and environment. *Euphytica*, 90, 163-167.
- Patel, D., Patel, N., Thakkar, V., Modi, A., & Gandhi, T. (n.d.).
- Patel, D., Patel, N., Thakkar, V., Modi, A., & Gandhi, T. (2013). Development and Characterization of Mucoadhesive Microspheres of. *Indian Journal of Novel Drug Delivery*, 5, 38-52.
- Perrechil, F., Sato, A., & Cunha, R. (2011). k-Carrageenan–sodium caseinate microgel production by atomization: Critical analysis of the experimental procedure. *Journal of Food Engineering*, 104, 123–133.
- Pothakamury, U. R., & Barbosa-canovas, G. V. (1995). Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 397-406.

- Qian, K., C. S., Wub, Y., & Goff, H. (2012). Flaxseed gum from flaxseed hulls: Extraction, fractionation, and characterization. *Food Hydrocolloids*, 28, 275-283.
- Quispe-Condori, S., Saldana, M. D., & Temelli, F. (2011). Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1880-1887.
- Rana, V., Rai, P., Tiwary, A. K., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Knill, C. J. (2011). Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1031–1047.
- Ray, S., Paynel, F., Morvan, C., Lerouge, P., Driouich, A., & Ray, B. (2013). Characterization of mucilage polysaccharides, arabinogalactanproteins and cell-wall hemicellulosic polysaccharides isolated from flax seed meal: A wealth of structural moieties. *Carbohydrate Polymers*, 93, 651– 660.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107, 656–663.
- Ribbe, A. (1997). Laser scanning confocal microscopy in polymer science. *Trends in polymer science*, 5, 333-337.
- Rickard, S., & Thompson, L. (1997). Health effects of flaxseed mucilage, lignans. *Inform*, 8, 860-865.
- Ricky, W. F., & Biliaderis, C. G. (1994). Composition and physicochemical properties of linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 240-247.
- Robertson, J., Eastwood, M., & Yeoman, M. (1981). Investigation into the physical properties of prepared from several carrot varieties and different stages of development. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31, 633-638.
- Rodrigues, J., Leitão, N., Chaves, K., Gigante, M., Portella, M., & Grosso, C. (2014). High protein microparticles produced by ionic gelation containing *Lactobacillus acidophilus* for feeding pacu larvae. *Food Research International*, 63, 25–32.
- Rohn, C. (1995). *Analytical polymer rheology: structure-processing-property*. Cincinnati: Hanser/Gardner Publications, Inc.
- Salta, F., Chiou, A., Mylona, A., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. (2005). Enrichment of vegetable oils with polyphenolic extract from olive leaves . In F. P. F., *Proceedings of EFFOST Intradfood 2005, Innovations in Traditional Foods Vol. II* (pp. 971-974). Valencia, España: Elsevier.

- Sathe, S. K., Deshpande, S. S., & Salunkhe, D. K. (1982). Functional properties of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus gonolobus* L. DC) proteins. *Journal of Food Science* , 47, 503-506.
- Saura-Calixto, F. (2011). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 43-49.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101, 492–501.
- Segura-Campos, M., Ciau-Solís, N., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2014). Chemical and Functional Properties of Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Gum. *International Journal of Food Science*, 1-5.
- Shabbir, M., Khana, M. R., Shehzada, A., Dinb, A., Khana, M., & B., a. H. (2014). Flaxseed segregations as an imperative tool for its nutraceutical implication. *Pakistan Journal of Food Sciences* , 24, 64-74.
- Shahidi, F. (2008). Omega-3 oils: sources, applications, and health effects. In C. B. Shahidi, *Marine Nutraceuticals and Functional Foods* (pp. 3-61). New York: CRC Press: 2.
- Shahidi, F., & Han, X. (1993). Encapsulation of food ingredients. . *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501– 547.
- Shi, X., & BeMiller, J. (2002). Effects of food gums on viscosities of starch suspensions during pasting. *Carbohydrate Polymers*, 50: 7-18.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Srinivasan, D. (1996). Amino Acids, Peptides, and Proteins. In O. R. Fennema, *Food Chemistry 3rd. Ed* (pp. 322-416). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Stephen, A., Phillips, G., & Williams, P. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications*. Boca Raton, FL.: Taylor & Francis Group.
- Tan, L., Chan, L., & Heng, P. (2009). Alginate/starch composites as wall material to achieve microencapsulation with high oil loading. *Journal of Microencapsulation* , 26, 263–271.
- Thanatcha, R., & Pranee, A. (2011). Extraction and characterization of mucilage in ziziphus mauritiana Lam. *International Food Research Journal* , 18, 201–212.

- Tonon, R. V., Rânie, B. P., Grosso, C. R., & Hubinger, M. D. (2012). Microencapsulation of Flaxseed Oil by Spray Drying: Effect of Oil Load and Type of Wall Material. *Drying Technology: An International Journal*, 30, 1491–1501.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Psomas, A., Zovoili, A., & Siatas, V. (2009). Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices. *International Journal of Food Science & Technology*, 4, 1167–1175.
- Vázquez-Ovando, A., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2009). Physicochemical properties of a fibrous fraction from chía (*Salvia hispanica* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 42, 168-173.
- Velasco, J., Dobarganes, C., & Marquez, G. (2000). Oxidación de fracciones de aceite libres y encapsuladas en aceites de pescado microencapsulados. . *Grasas y Aceites* , 51, 439-446.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 46, 4113-4117.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., & Harding, S. (2010). Materials for Encapsulation. In N. J. Shimoni, *Encapsulation Technologies For Active Food Ingredients and Food Processing* (pp. 31-100). New York: Springer.
- Wang, Q., Ellis, P., & Ross-Murphy, S. (2003). Dissolution kinetics of guar gum powders 2: Effects of concentration and molecular weight. *Carbohydrate Polymers* , 53, 75-83.
- Wang, Y., Li, D., Wang, L., Li, S., & Adhikari, B. (2010). Effects of drying methods on functional properties of flaxseed gum powders. *Carbohydrate Polymers*, 81, 28–133.
- Wang, Y., Wang, L., Li, D., Özkan, N., Chen, X., & Mao, Z. (2008). Effect of Flaxseed Gum Addition on Rheological Properties of Native Maize Starch. *Journal of Food Engineering*, 89, 87-92.
- Wang, Y., Wang, L., Li, D., Xue, J., & Mao, Z. (2009). Effects of drying methods on rheological properties of flaxseed gum. *Carbohydrate Polymers*, 78, 213–219.
- Warrand, J., Michaud, P., Picton, L., Muller, G., Courtois, B., Ralainirina, R., & J., C. (2005). Structural investigations of the neutral polysaccharide of *Linum usitatissimum* L. seeds mucilage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 35, 121-125.
- Willats, W. G., Knox, J., & Mikkelsen, J. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 97-104.

- Williams, P., & Phillips, G. (2000). *Introduction to food hydrocolloids*. New York: CRC Press.
- Yáñez, J., Salazar, J., Chaires, L., J., J., Márquez, M., & Ramos, E. (2005). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Mundo alimentario*, 2, 24-30.
- Yong Wanga et al., D. L.-J.-J. (2010). Effects of drying methods on the functional properties of flaxseed gum powders. *Carbohydrate Polymers*, 128-133.
- Yoshida, S., & Yoshida, H. (2004). Noninvasive analyses of polyunsaturated fatty acids in human oral mucosa in vivo by fourier-transform infrared spectroscopy. *Biopolymers*, 74, 403–412.
- Young, J. (2001). *Guide to Functional Food Ingredients*. Surrey, UK, : Leatherhead Publishing.
- Zambrano, Z. M., Hernández, H., & Gallardo, N. Y. (1998). *Caracterización fisicoquímica del Nopal*, En: *Temas de Tecnología de alimentos*. Instituto Politécnico Nacional, México, 29-41.: Vol.2 Fibra Dietética; editado por Lajolo, M. y E. Wenzel CYTED .
- Ziolkowska, A. (2012). Laws of flaxseed mucilage extraction. *Food Hydrocolloids*, 26, 197-204.
- Zuidam, N., & Nedovic, V. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In & E. Nicolaas Jan Zuidam, *Encapsulation Technologies For Active Food Ingredients and Food Processing* (pp. 3-29). New York: Springer .