



UNAP



FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN HUMANA

TESIS

**ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE *Plukenetia volubilis* L. (SACHA INCHI)
EN MATRICES DE PECTINA RECUBIERTAS CON SANGRE BOVINO Y
BIOACCESIBILIDAD DE PROTEÍNAS, LÍPIDOS Y HIERRO**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA EN BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN HUMANA**

PRESENTADO POR:

CARMENZA VALLES CASTILLO

CESIA DÁVILA ALVARADO

ASESORES

Ing. RAFAEL SEGUNDO VELA PAREDES, MSc.

Ing. RICARDO ABEL DEL CASTILLO TORRES, Dr.

Ing. FERNANDO TELLO CÉLIS, Dr.

IQUITOS, PERÚ

2022



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 004-CGT-FIA-UNAP-2022

A los 11 días del mes de febrero de 2022, a horas... 09:00 a.m...., en las instalaciones del Auditorio del Vicerrectorado de Investigación, sito en pasaje los Paujiles S\N, Nuevo San Lorenzo – San Juan Bautista dando inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada **“ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE *Plukenetia volubilis* L. (SACHA INCHI) EN MATRICES DE PECTINA RECUBIERTAS CON SANGRE BOVINO Y BIOACCESIBILIDAD DE PROTEÍNAS, LÍPIDOS Y HIERRO”**, presentado por las Bachilleres **CARMENZA VALLES CASTILLO** y **CESIA DÁVILA ALVARADO**, para optar el Título Profesional de Licenciado (a) en Bromatología y Nutrición Humana, que otorga la Universidad de acuerdo a Ley y Estatuto.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N° 0238-FIA-UNAP-2020 del 30 de diciembre de 2020, está integrado por:

Blga. JESSY PATRICIA VASQUEZ CHUMBE, Mtra.
Ing. ALFONSO SHAPIAMA VASQUEZ, MSc.
Lic. MIRIAM RUTH ALVA ANGULO, Mgr.

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas:... Adecuadamente

El Jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la tesis ha sido:... Aprobado... con la calificación Bueno (16).....

Estando el (la) bachiller apto(a) para obtener el Título Profesional Licenciado(a) en Bromatología y Nutrición Humana, Siendo las 10:00 am se dio por terminado el acto de sustentación.

Presidente
Blga. JESSY PATRICIA VASQUEZ CHUMBE, Mtra
CBP: 2584

Miembro
Ing. ALFONSO SHAPIAMA VASQUEZ, MSc
CIP: 60880

Miembro
Lic. MIRIAM RUTH ALVA ANGULO, Mgr.
CNP: 130

Asesor
Ing. FERNANDO TELLO CELIS, Dr.
CIP: 47489

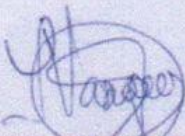
Asesor
Ing. RICARDO ABEL DEL CASTILLO TORRES, Dr.
CIP: 331646

Asesor
Ing. RAFAEL SEGUNDO VELA PAREDES, MSc.
CIP: 227829

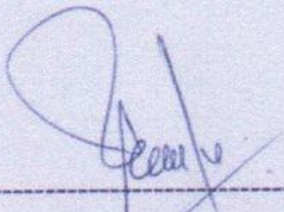


JURADO CALIFICADOR

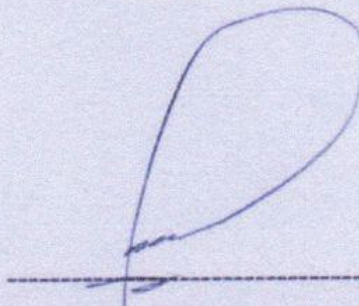
El jurado calificador certifica que el trabajo de investigación "ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE *Plukenetia volubilis* L. (SACHA INCHI) EN MATRICES DE PECTINA RECUBIERTAS CON SANGRE BOVINO Y BIOACCESIBILIDAD DE PROTEÍNAS, LÍPIDOS Y HIERRO" de responsabilidad de las bachilleres CARMENZA VALLES CASTILLO y CESIA DÁVILA ALVARADO; han sido detalladamente revisados por los miembros del jurado, quedando autorizado para la sustentación.



Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe, Mtra.
Presidente



Lic. Miriam Ruth Alva Angulo, Mgr.
Miembro



Ing. Alfonso Shapiama Vásquez, MSc.
Miembro

AUTORIZACIÓN DE LOS ASESORES

El Dr. Fernando Tello Célis, docente principal adscrito al Departamento de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias-UNAP, el Dr. Ricardo Abel del Castillo Torres, docente principal adscrito al Departamento académico de Ingeniería y Gestión Agroindustrial de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNACH y el MSc. Rafael Segundo Vela Paredes, docente adscrito al Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial – UNSM.

INFORMAN:

Que los Bachilleres CARMENZA VALLES CASTILLO y CESIA DÁVILA ALVARADO, han realizado bajo nuestra dirección, el trabajo contenido en la memoria intitulada: ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE *Plukenetia volubilis* L. (SACHA INCHI) EN MATRICES DE PECTINA RECUBIERTAS CON SANGRE BOVINO Y BIOACCESIBILIDAD DE PROTEÍNAS, LÍPIDOS Y HIERRO, considerando que el mismo reúne los requisitos necesarios para ser presentado, ante el Jurado Calificador, a tal efecto damos pase para su sustentación y posterior obtención del título de: Licenciado en Bromatología y Nutrición Humana.

AUTORIZAMOS: A los citados Bachilleres a presentar el Trabajo Final de carrera, para proceder a su sustentación cumpliendo así con la normativa vigente que regula el Reglamento de Grados y Títulos en la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.



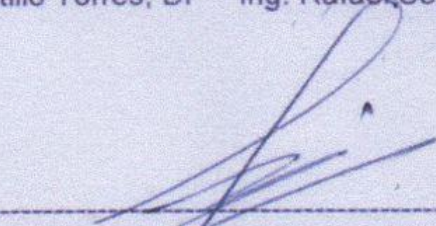
Ing. Ricardo Abel del Castillo Torres, Dr

Asesor



Ing. Rafael Segundo Vela Paredes, MSc

Asesor



Ing. Fernando Tello Celis, Dr.

Asesor

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a Dios, por darme la vida y ayudarme a cumplir esta gran meta. A mi padre que desde el cielo me guía y me protege, a mi madre por el apoyo incondicional y contribución a lo largo de mi vida y mis estudios, a mis hermanos que estuvieron motivándome siempre incondicionalmente y alentándome a luchar por mis sueños, a mi asesor principal por la paciencia y el apoyo que me brindo hasta el final y a mi hijito por ser mi mayor inspiración para seguir avanzando profesionalmente.

Carmenza

Dedico este trabajo a Dios por las bendiciones y la oportunidad que nos brindó para poder tener esta experiencia de investigación. A mis adorados padres por brindarme su amor y apoyo en los momentos que más los necesite. A todas las personas que contribuyeron a mi formación personal y profesional.

Cesia

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a mis padres y a mi hermana por su apoyo incondicional que me brindaron para lograr mi objetivo.

A Dios todopoderoso por su infinito amor y bendición

A mis amigos (as) que me apoyaron con sus tiempo y dedicación en el desarrollo del trabajo de investigación.

Al Dr. Fernando Tello Célis, por su orientación en la realización de este trabajo. Por su paciencia, amabilidad y carisma para enseñar las cosas, siendo ejemplo de dedicación y exigencia.

Al MSc. Rafael Segundo Vela Paredes, por su apoyo en la redacción de la tesis

A todos muchas gracias, ya que sin ellos no podría haber sido fácil lograr el objetivo de terminar el trabajo de investigación.

Cesia

Agradezco a Dios, ya que nos dio salud, fortaleza y capacidad para realizar este trabajo de investigación para poder lograr ser mejores profesionales.

A mis padres por todo su amor, comprensión y apoyo, pero sobre todo gracias infinitas por su paciencia. Gracias por darme la libertad de desenvolverme como ser humano y profesional.

A mi hijito quien es mi mayor inspiración, todos mis esfuerzos son recompensados con tu sonrisa y tu eterno cariño.

Al Dr. Fernando Tello Celis, por habernos dado la oportunidad de realizar este trabajo, por su enseñanza, su amabilidad de entrar en su equipo de estudiantes investigadores.

Al MSc. Rafael Segundo Vela Paredes por asesorarnos en la parte estadística y redacción de tesis.

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, por brindarme tantas oportunidades y enriquecerme en conocimiento.

Carmenza

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
JURADO CALIFICADOR	iii
AUTORIZACIÓN DE ASESORES	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1 Antecedentes	4
1.2 Bases teóricas	5
1.2.1 Consumo de proteínas y hierro y su impacto en la nutrición	5
1.2.2 La microencapsulación como herramienta en desarrollo de nuevos productos	6
1.2.3 Aplicaciones en la industria alimentaria	7
1.2.4 Técnicas de microencapsulación aplicados a alimentos	7
1.2.5.1 Gelificación iónica	7
1.2.5.2 Interacción electrostática	8
1.2.5 Biopolímeros utilizados como encapsulante	9
1.2.5.1 Pectina	9
1.2.5.2 Proteínas de sangre bovino	10
1.2.6 Bioactivos hidrofóbicos	11
1.2.7 Bioaccesibilidad de micro y macronutrientes	11
1.2.8 Simulación gastrointestinal <i>in vitro</i>	12
1.3 Definición de términos básicos	13
1.3.1 Ácidos grasos poliinsaturados	13
1.3.2 Bioaccesibilidad	13
1.3.3 Gelificación iónica	14
1.3.4 Hierro	14
1.3.5 Lípido	14
1.3.6 Encapsulación	14
1.3.7 Proteína	14
1.3.8 Sangre bovino	15
CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	16
2.1 Formulación de la hipótesis	16

2.2	Variables y su operacionalización	16
2.2.1	Variables independientes	16
2.2.2	Variables dependientes	16
2.2.3	Operacionalidad de variables	28
CAPITULO III: METODOLOGÍA		31
3.1	Tipo y diseño de estudio	33
3.1.1	Producción de micropartículas de pectina y recubrimiento proteico por interacción electrostática.	33
3.1.2	Estudio de bioaccesibilidad de macro y micronutrientes.	33
3.2	Diseño muestral	33
3.3	Procedimientos de recolección de datos	33
3.3.1	Caracterización de materiales	33
3.3.2	Determinación de hierro	34
3.3.3	Secado de la sangre bovino	34
3.3.4	Caracterización de la sangre bovino en polvo	34
3.3.5	Producción de micropartículas de pectina por gelificación iónica	34
3.3.6	Caracterización de micropartículas obtenidas por gelificación iónica	35
3.3.6.1	Tamaño medio de las micropartículas	35
3.3.6.2	Morfología y microestructura de las micropartículas	35
3.3.6.3	Determinación de humedad de las micropartículas	35
3.3.6.4	Análisis de ceniza	36
3.3.6.5	Determinación de proteína	36
3.3.6.6	Determinación de lípidos	36
3.3.6.7	Perfil de ácidos grasos	36
3.3.6.8	Eficiencia de encapsulación	37
3.3.6.9	Recubrimiento de las micropartículas con proteínas de sangre bovino	37
3.3.6.10	Secado de las micropartículas	38
3.3.7	Determinación de la bioaccesibilidad de proteínas, hierro y lípidos por simulación gastrointestinal <i>in vitro</i> .	38
3.3.7.1	Fase oral:	40
3.3.7.2	Fase gástrica:	40
3.3.7.3	Fase intestinal:	40
3.4	Procesamiento y análisis de los datos	42
3.5	Aspectos éticos	43
CAPÍTULO IV: RESULTADOS		44
4.1	Composición centesimal de sangre bovino	44
4.2	Composición centesimal de biopolímeros	44
4.3	Producción de micropartículas por gelificación iónica con y sin recubrimiento proteico	45
4.4	Características de las micropartículas de pectina	45
4.4.1	Composición de las micropartículas de pectina producidas por gelificación iónica	45
4.4.2	Morfología de micropartículas de pectina producidas por gelificación iónica y micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino	46

4.4.3	Microestructura de micropartículas de pectina sin y con recubrimiento de proteínas de sangre bovino	47
4.4.4	Bioaccesibilidad de proteínas de sangre bovino absorbidas en superficie de macropartículas de pectina	48
4.4.5	Bioaccesibilidad de hierro contenido en moléculas de proteínas de sangre bovino absorbidas en superficie de macropartículas de pectina	48
4.4.6	Bioaccesibilidad de lípidos contenido micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino	48
	CAPITULO V: DISCUSIONES	51
	CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	52
	CAPITULO VII: RECOMENDACIONES	53
	CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN	54

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Contenido de agua y materia seca de sangre bovino	44
Tabla 2. Composición centesimal de sangre bovino en base seca	44
Tabla 3. Composición centesimal de sangre bovino en polvo	44
Tabla 4. Composición de ácidos grasos de aceite de <i>Plukenetia volubilis L.</i>	45
Tabla 5. Composición centesimal de micropartículas de pectina	45
Tabla 6. Composición centesimal de micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Imagen obtenida por MICROSCOPIA ÓPTICA de micropartículas de pectina sin y con recubrimiento con proteínas de sangre bovino a 8% de proteína en solución: Barra MO = 100 μ m. Objetivo: 40x. 47

Figura 2. Imagen obtenida por MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (MEB). MPGI: micropartículas de pectina conteniendo gotas de aceite. MPRSB8: micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino 8% en solución. 47

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AOAC	: Association of Official Analytical Chemists
EDTA	: Ácido Etilendiaminotetraacético
FAO	: Food and Agriculture Organization
MEB	: Microscopía Electrónica de Barrido
MO	: Microscopía Óptica
MPGI	: Micropartículas Producidas por Gelificación Iónica
FSS	: Fluido Simulador de Saliva
FSG	: Fluido Simulador Gástrico
FSI	: Fluido Simulador Intestinal
ADH	: Anemia por Deficiencia de Hierro
TAME	: p-Tolueno-Sulfonil-L-Arginine Methyl Ester.
BTEE	: N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester
TBME	: Tert-Butyl methyl Ether

RESUMEN

En la actualidad, modelos de digestión *in vitro* son cada vez más utilizados por industrias como la alimentaria y la farmacéutica, para evaluar la biodisponibilidad de compuestos activos presentes y/o incorporados en los productos alimenticios y farmacéuticos. El objetivo del presente trabajo fue producir por gelificación iónica, micropartículas de pectina conteniendo aceite de sacha inchi recubiertas electrostáticamente con proteínas de sangre bovino. Además, fue determinada su bioaccesibilidad utilizando la digestión gastrointestinal *in vitro*. Los resultados para el tamaño y la eficiencia de encapsulación de las micropartículas sin recubrimiento fueron de $186.94 \pm 12.63 \mu\text{m}$ y $81.63 \pm 2.62\%$, respectivamente. Posterior al recubrimiento, fue observado que micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino disminuyeron de tamaño ($166.37 \pm 19.07 \mu\text{m}$). Asimismo, para micropartículas recubiertas, se registraron valores de $57.58 \pm 1.20\%$ y $22.20 \pm 0.64\%$ para proteínas y lípidos, respectivamente. Las cantidades bioaccesibles de proteínas, hierro y lípidos fueron de $6.5 \pm 0.85\%$, $12.55 \pm 0.75\%$ y $16.32 \pm 0.96\%$, respectivamente, las cuales, fueron cuantificados con relación a la cantidades contenidas en micropartículas inicialmente. Los datos encontrados en el presente estudio, demuestran que es posible desarrollar matrices de grado alimenticio para la liberación controlada de compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos, útiles en el desarrollo de alimentos funcionales.

Palabras claves: Bioaccesibilidad, sangre bovino, hierro, gelificación iónica.

ABSTRACT

At present, in vitro digestion models are increasingly used by industries such as food and pharmaceuticals, to evaluate the bioavailability of active compounds present and / or incorporated in food and pharmaceutical products. The aim of this work was to produce, by ionic gelation, pectin microparticles containing sachu inchi oil electrostatically coated with bovine blood proteins. Furthermore, its bioaccessibility was determined using in vitro gastrointestinal digestion. The results for the size and encapsulation efficiency of uncoated microparticles were $186.94 \pm 12.63 \mu\text{m}$ and $81.63 \pm 2.62\%$, respectively. After coating, it was observed that coated microparticles with bovine blood decreased in size ($166.37 \pm 19.07 \mu\text{m}$). Likewise, for coated microparticles, values of $57.58 \pm 1.20\%$ and $22.20 \pm 0.64\%$ were registered for proteins and lipids, respectively. The bioaccessible amounts of proteins, iron and lipids were $6.5 \pm 0.85\%$, $12.55 \pm 0.75\%$ and $16.32 \pm 0.96\%$, respectively, which were quantified in relation to the amounts contained in pectin microparticles. The data found in the present study, show that it is possible to develop food grade matrices for controlled release of hydrophilic and hydrophobic compounds, useful in the development of functional foods.

Key words: Bioaccessibility, bovine blood, iron, ionic gelation.

INTRODUCCIÓN

El papel que desempeña la Industria alimentaria de la mano de la nutrición sobre la “anemia”, como uno de los problemas de salud pública en países pobres, genera la necesidad de apostar por tecnologías que ayuden a mitigar esta problemática mundial. Los bajos índices de consumo de proteínas y hierro en la dieta de las personas incrementan año a año los indicadores sobre la anemia ferropénica. Esto, sumando a la necesidad por incrementar la ingesta de alimentos que contengan ácidos grasos poliinsaturados (omega-3) necesarios para el desarrollo cerebral, hacen imperante realizar investigación en la innovación de nuevos insumos y productos como alternativas para contrarrestar dichos males.

Actualmente, se desarrollan tecnologías innovadora que hacen posible la producción de alimentos con alto contenido de nutrientes indispensables para el funcionamiento del organismo humano. Dentro de estas tecnologías destaca la técnica de microencapsulación, que es un proceso de recubrimiento de materiales que pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos con la finalidad de protegerlos contra condiciones adversas del medio, incluyendo pH, oxígeno, luz, temperatura, entre otros (Comunian y Favaro-Trindade 2016).

Entre las técnicas de producción de micropartículas, encontramos a la “gelificación iónica” siendo una técnica simple y de bajo costo. Esta técnica utiliza un biopolímero en solución que al interactuar con una solución catiónica con carga forma una red tridimensional, atrapando sustancias de interés con diferentes formas y tamaños (Kurozawa y Hubinger 2017).

En lo que respecta a nuestra investigación, detallamos el proceso de microencapsulación del aceite de sacha inchi (ASI), la incorporación de proteína y hierro en la micropartícula y el proceso de liberación de nutrientes a través de la simulación gastrointestinal *in vitro* de proteínas, lípidos y hierro, para medir los porcentajes que pueden ser aprovechados por el organismo humano.

Frente a esto, es imperativo la búsqueda de alternativas alimenticias, que mitiguen los problemas de salud incluido la anemia, este producto a base de aceite de sacha inchi con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y fuentes de hierro como la sangre bovina. El aceite de sacha inchi posee alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados utilizados en la industria de alimentos

como suplemento dietético por su valor en el desarrollo cerebral infantil, además, ayuda a contrarrestar enfermedades cardiovasculares (Baldeón, Velásquez y Castellanos 2015).

Generalmente la matriz alimentaria no es presentada al consumidor de forma atractiva, consecuentemente los nutrientes no son aprovechados adecuadamente. De igual modo si estos nutrientes fuesen aprovechados por completo en el organismo humano, existen factores que modifican su absorción (Galán, Gonzáles y Drago 2013). Esto conlleva a realizar el proceso de absorción en dos etapas. La primera etapa es la bioaccesibilidad, definida como la capacidad que un nutriente de ser liberado de la matriz alimentaria y estar listo para su absorción en el tracto gastrointestinal (Shim et al. 2009). La segunda etapa es la biodisponibilidad es decir comprobar qué cantidad de estos compuestos bioactivos presentes o incorporados en diferentes matrices puede ser potencialmente absorbidos por el sistema digestivo (Holst y Williamson 2008). Por consiguiente, para que un compuesto sea potencialmente biodisponible, debe ser primero bioaccesible en la matriz del alimento (Tagliazucchi et al. 2010).

La bioaccesibilidad del hierro liberado de los alimentos depende de su forma química y de la presencia de factores potenciadores o inhibidores, que aumentan o disminuyen su solubilidad. El transporte de hierro no heme a través de la membrana intestinal involucra iones (Fe^{2+} + o Fe^{3+}). Las técnicas de digestión artificial, que simulan condiciones gastrointestinales, se utilizan ampliamente para evaluar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos en diferentes tipos de productos alimenticios. Por lo general, los métodos *in vitro* se utilizan para imitar los procesos que ocurren en dos (u ocasionalmente tres) áreas distintas pero vinculadas al sistema digestivo humano: el estómago y el intestino delgado (y algunas veces la boca) (Intawongse y Dean 2006; Do Nascimento da Silva et al. 2015).

La bibliografía científica indica que la sangre es una de las principales fuentes de hierro, además de tener alto contenido de proteínas. El valor nutricional del polvo de la sangre se debe a la presencia de proteínas (Mullen et al. 2017 ; Lynch et al. 2017). La sangre animal contiene en promedio 18% de proteínas y es fuente de aminoácidos esenciales como leucina, lisina y triptófano,

además de ser fuente de hierro hemínico (Lynch et al. 2017). Las proteínas de sangre bovino tienen propiedades funcionales deseables por la industria alimentaria, que incluyen capacidad de emulsificación, gelificación, retención de agua y colorante natural (Ofori y Hsieh 2012).

Las propiedades nutricionales y funcionales de las proteínas de diferentes fuentes se han investigado durante años. El valor nutricional de la proteína depende del contenido de aminoácidos esenciales y de la utilización de aminoácidos específicos después de la digestión y absorción (Friedman 1996). En términos de sus propiedades funcionales, las proteínas contribuyen a las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de varios alimentos. (Korhonen y Pihlanto 2003).

La pectina de acuerdo a su clasificación son polisacáridos que consisten en la cadena principal de ácido D-galacturónico y residuos, que están esterificados con diferentes proporciones de alcohol metílico o ácido acético en el ácido carboxílico, intercalados por la inserción de unidades de ramnosa y con las cadenas laterales de azúcares neutros unidos a la columna central (Wang et al. 2016; Thakur et al. 2019).

El objetivo de la investigación fue producir microcápsulas conteniendo aceite de sacha inchi en matriz de pectina, utilizando la gelificación iónica con recubrimiento de proteínas de sangre bovino y cuantificar los porcentajes bioaccesibles de proteínas, lípido y hierro contenidas en las micropartículas.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

En trabajo reciente se encapsuló extracto de arándano utilizando proteínas de suero de leche o pectina cítrica, obteniendo aumentó de la bioaccesibilidad y la accesibilidad intestinal de antocianinas en humanos (Mueller et al. 2018). Esto hace que la encapsulación sea un método viable para estabilizar los ingredientes bioactivos en alimentos (Fang y Bhandari 2010).

La gelificación iónica utiliza polisacáridos que incluyen la pectina que forma interacciones cationes divalentes como el calcio, siendo otra alternativa utilizar iones de hierro para reticular los grupos carboxilos de los polisacáridos, con la finalidad de mitigar la deficiencia de hierro, que es el déficit nutricional más común en todo el mundo y representa un problema de salud pública, tanto en países industrializados como no industrializados (Uauy, Hertrampf y Reddy 2018).

Por otro lado, la digestión de alimentos debería estudiarse *in vivo* en humanos, pero esto no siempre es posible desde el punto de vista ético y financiero. De acuerdo con Bohn et al. (2018) se han propuesto modelos simples de digestión *in vitro* que imitan el tracto gastrointestinal como alternativas a los experimentos *in vivo*. El método INFOGEST, es un método de digestión estática que utiliza proporciones constantes de alimentos a fluidos digestivos y un pH constante para cada paso de la digestión, esto hace que el método sea simple de usar, pero no adecuado para simular la cinética de la digestión; por ende, con este método, las muestras de alimentos se someten a una digestión secuencial oral, gástrica e intestinal, mientras que los parámetros tales como electrolitos, enzimas, bilis, dilución, pH y tiempo de digestión se basan en los datos fisiológicos disponibles (Brodkorb et al. 2019).

En estudio reciente se comparó la bioaccesibilidad del hierro de los suplementos nutricionales y hierro microencapsulado en condiciones que simulan la digestión gástrica e intestinal de sulfato ferroso o lactato ferroso y vitamina C, mostraron bioaccesibilidad de hasta el 100% cuando digeridos individualmente, y alrededor del 60% en presencia de una matriz alimentaria. La encapsulación parece limitar la interacción del hierro con la matriz alimentaria y

protegerlo contra la oxidación, haciéndolo más accesible para la absorción intestinal (Bryszewska 2019).

1.2 Bases teóricas

1.2.1 Consumo de proteínas y hierro y su impacto en la nutrición

El valor nutricional o la calidad de proteínas estructuralmente diferentes varían y se rige por su composición de aminoácidos, proporciones de aminoácidos esenciales, susceptibilidad a la hidrólisis durante la digestión, fuente, y los efectos del procesamiento. Para optimizar la utilización biológica de proteínas, una mejor comprensión se necesita de los diversos parámetros interrelacionados que influyen en su valor nutritivo (Friedman 1996).

Los minerales juegan un papel fundamental en la regulación metabólica y fisiológica. Como se ha mencionado anteriormente, se necesita una ingesta adecuada para mantener la homeostasis, su funcionalidad y salud. Hoy en día, las deficiencias en los niveles requeridos para ciertos minerales son más frecuentes que las debidas a déficits de vitaminas. El hierro es el cuarto elemento en abundancia en la corteza terrestre y un mineral esencial para casi todos los seres vivos. Juega un papel fundamental en los sistemas biológicos ya que participa en el transporte y almacenamiento de oxígeno en los organismos superiores (hemoglobina y mioglobina), generación de ATP (proteínas ferrosulfuradas y citocromos), síntesis de ADN (ribonucleótido reductasa) y de clorofila, síntesis de neurotransmisores, el funcionamiento de numerosas enzimas y del sistema inmune. Además, el metabolismo de las vitaminas que forman el complejo B es hierro-dependiente (Hänsch y Mendel 2009).

La anemia es una afección médica en la que la cantidad de glóbulos rojos o su capacidad de transporte de oxígeno es insuficiente para satisfacer las necesidades fisiológicas, el déficit de hierro repercute negativamente en la producción de hemoglobina, una de las patologías más frecuentes a nivel mundial (Abu-Baker, Eyadat y Khamaiseh 2021).

1.2.2 La microencapsulación como herramienta en desarrollo de nuevos productos

La microencapsulación es una tecnología que proporciona el recubrimiento de compuestos sólidos, líquidos o materiales gaseosos, a través de diferentes tipos de materiales biopoliméricos. Asimismo, a partir de esta técnica es posible alterar las propiedades coloidales y de superficie de materiales, siendo capaz de proporcionar protección ambiental y controlar sus características de liberación y biodisponibilidad (Jones y McClements 2011).

Los problemas de salud son una constante preocupación para la población mundial y, por lo tanto, la industria alimentaria busca nuevos productos alimenticios que contengan compuestos bioactivos que promueven la salud, con poco o ningún ingrediente sintético. Sin embargo, existen algunos desafíos en el desarrollo de alimentos funcionales, particularmente en que implica el uso directo de algunos bioactivos, que pueden mostrar problemas de inestabilidad, reaccionar con otros ingredientes de la matriz alimenticia o presentar olor y/o sabores desagradables. En este contexto, surge la microencapsulación como un enfoque potencial para superar estos problemas y, adicionalmente, para promover liberación controlada. El potencial de la microencapsulación es para proteger bioactivos y asegurar su biodisponibilidad, pero se requieren más estudios, teniendo en cuenta tanto su aplicabilidad (Dias, Ferreira y Barreiro 2015).

Las micropartículas tienen potencial para proteger y liberar agentes bioactivos, que incluyen fármacos, suplementos y nutraceuticos. La retención y liberación de los bioactivos encapsulados depende de las características que incluye la porosidad, interacción atractiva o repulsiva entre bioactivos y biopolímeros (Castro-Rosas et al. 2017; Ye, Georges y Selomulya 2018).

La microencapsulación es una técnica cada vez más estudiada para aplicaciones en la industria de alimentos para materiales como aceites poliinsaturados, enzimas, microorganismos, vitaminas, sales, aminoácidos, aceites esenciales y colorantes, cuyo objetivo es aumentar la estabilidad y bioaccesibilidad de los mismos. Entre sus aplicaciones, se refiere a la protección de los compuestos de aroma, que pueden ser perdidos por evaporación,

oxidación o interacciones con otros compuestos, y una liberación controlada de éstos (Ribeiro y Veloso 2021).

Un importante desafío en aplicaciones alimenticias es la identificación de matrices que pueden ser elaboradas con materiales de grado alimenticio como proteínas y polisacáridos, utilizando métodos económicamente viables, que garanticen que estas micropartículas mantengan su funcionalidad en los productos y en el tracto gastrointestinal humano (McClements 2017).

1.2.3 Aplicaciones en la industria alimentaria

Diferentes aplicaciones son utilizadas en la industria alimentaria que incluyen reducción de la reactividad del material de relleno con el ambiente externo, control de la liberación, enmascarar sabores; manipulación del producto y protección con relación a los agentes externos, como humedad, luz, pH y calor (Zhu 2017).

1.2.4 Técnicas de microencapsulación aplicados a alimentos

Las técnicas de microencapsulación se llevan a cabo a través de procesos físicos, físico-químicos o mecánicos que incluyen la co-cristalización, secado, congelamiento, enfriamiento, extrusión. En los procesos físico-químicos se encuentran la coacervación, polimerización interfacial, gelificación iónica, en los procesos físicos el más utilizado es el secado por aspersión (Parra 2011).

La caracterización de las micropartículas incluye el estudio de la morfología y microestructura utilizando microscopía óptica y electrónica de barrido, distribución de tamaño, composición de la membrana, relleno y mecanismos de liberación. Sin embargo, las características funcionales como capacidad de retención del compuesto encapsulado, integridad y digestibilidad deben evaluarse de acuerdo a la aplicación de la micropartícula (Jones y McClements 2010; Thies 1995).

1.2.5.1 Gelificación iónica

La gelificación iónica es una técnica basada en la capacidad de polielectrólitos para formar *crosslinking* en presencia de contraiones resultando matrices de gel (Patil et al. 2010).

La bibliografía se refiere dos tipos de gelificación iónica: interna y externa. La gelificación iónica interna produce micropartículas en una solución polimérica adicionando sales de calcio insolubles en una solución polimérica conteniendo material a encapsular, con posterior dispersión de esta mezcla en una fase oleosa que contiene surfactante. Para que se pueda llevar a cabo la gelificación, se añade una solución ácida para la reducción del pH, con el propósito de liberar los iones de calcio, permitiendo su interacción con los grupos carboxílicos (Poncelet et al. 1992).

La gelificación iónica externa es una técnica que consiste en que las gotas de una solución polimérica negativamente cargada son atomizadas en una solución catiónica, normalmente conteniendo calcio. La gelificación iónica consiste en la reacción química entre ciertos polisacáridos, como la pectina o el alginato de sodio y una solución de cationes divalentes (llamada solución reticulante o gelificante), siendo el más usado el CaCl_2 , que reaccionan formando estructuras tipo “*caja de huevos*” en donde quedan atrapados los compuestos que se pretenden encapsular (Grant et al. 1973).

La formación de micropartículas gelificadas incluye la formación de gotas de tamaño micrométrico por el proceso atomización, seguida del endurecimiento de esta. En el momento de la formación, las micropartículas permanecen bajo agitación por un período denominado tiempo de maduración, pues las conexiones cruzadas se desarrollan lenta y progresivamente de la superficie hacia el interior de la micropartícula gelificada (Ahmed 2015). Micropartículas obtenidas por gelificación iónica presentan propiedades como la cinética de la formación del gel, volumen, estabilidad y porosidad, así como el índice de difusión de solutos dentro o fuera de la matriz polimérica, son influenciadas por la concentración del polisacárido y de los cationes, por la fuerza iónica y el pH (Ouwerx et al. 1998).

1.2.5.2 Interacción electrostática

La tasa de liberación del material encapsulado se ve influenciado por la porosidad de las micropartículas, para mitigar este problema se ha sugerido la formación de complejos estables basada especialmente en la interacción electrostática entre biopolímeros de cargas opuestas, promoviendo la formación de un complejo en la superficie de la micropartícula (Thu et al. 1996). Las

micropartículas producidas por esta técnica presentan alta porosidad, característica inadecuada para encapsulación de compuestos de bajo peso molecular como compuestos hidrofílicos, resultando indicadas para inmovilización de compuestos mayores como células y enzimas (Gouin 2004). La porosidad de las micropartículas juega un rol importante en la determinación de su capacidad para retener, proteger y liberar el componente encapsulado.

1.2.5 Biopolímeros utilizados como encapsulante

Proteínas y polisacáridos son distribuidos en la naturaleza y se encuentran con gran frecuencia en estructuras que conforman diferentes organismos vivos. Cuando se encuentran presentes en solución pueden ser segregativas o asociativas, siendo un caso específico de las asociativas la coacervación compleja, con diferentes aplicaciones en la industria alimentaria. La naturaleza de la red de moléculas de los biopolímeros en el interior de las micropartículas juega un papel importante en la determinación de muchos de sus atributos funcionales, incluyendo retención, liberación, protección, reología, estabilidad y propiedades ópticas. Las cadenas del biopolímero pueden estar unidos entre sí por enlaces covalentes o interacciones físicas, como electrostática, puentes de hidrógeno, o fuerzas hidrofóbicas. La conformación y la organización de las cadenas dentro de la red de biopolímeros, así como el número, la fuerza y la ubicación de los enlaces cruzados entre ellos determinan muchas de sus propiedades, y por lo tanto deben ser entendidas y controlado para crear hidrogeles con atributos funcionales específicos (McClements 2017a)

1.2.5.1 Pectina

La pectina es un polisacárido formado por 150 a 500 unidades de ácidos galacturónicos parcialmente esterificados con grupos metílicos, unidos por iones glucosídicas α -1,4 en la cadena molecular. Es un coloide que tiene la capacidad de absorber gran cantidad de agua. Se encuentra en la mayoría de cáscara de cítricos.

La pectina puede ser clasificada como de alto o bajo contenido de esterificación, que se define por el porcentaje de ácidos galacturónicos que son metilesterificados (Ström, Schuster y Goh 2014). El grado de esterificación puede ser controlado durante el proceso de extracción de la pectina, variando entre 0-75% en el producto final. Los metil ésteres formados ocupan un espacio

similar, pero son más hidrofóbicos y consecuentemente tienen un efecto diferente en la estructuración (Thakur et al. 2009).

La formación de geles de pectinas de bajo contenido de metoxilación (<50% de grupos metil esterificados) es el resultado de conexiones cruzadas entre los iones divalentes, como el calcio, y los grupos carboxilo del ácido D-galacturónico. Para describir la formación de la red de gel con iones de calcio se hace uso del modelo "caja de huevos", siendo inducida de igual forma cuando se utiliza alginato (Braccini y Pérez 2012).

La pectina también se clasifica de acuerdo con el grado de amidación, que consiste en el porcentaje de grupos carboxilo del ácido galacturónico que reaccionan con amoníaco. Pectina amidada con bajo contenido de esterificación, forma geles más firmes por la acción de iones calcio, que a la pectina no amidada necesitando, por lo tanto, de una menor concentración de calcio para gelificar (Ovodov 2009).

Su capacidad de formación de complejos con otros polímeros ocurre en función de su balance de cargas. En pH por encima de 2.9 se encuentra cargada negativamente, en pH por debajo de este valor, no hay disociación del polisacárido, por lo tanto, sin cargas, debido a su valor de pKa de 2.9. La pectina, intacta o modificada, a través de sus características electrostáticas y capacidad de formación de gel, la pectina asociada a otros polímeros naturales o sintéticos ha sido estudiada como material de recubrimiento en micropartículas (Ralet et al. 2001).

1.2.5.2 Proteínas de sangre bovino

La industria alimentaria en los últimos años ha recibido presión global para minimizar el impacto ambiental de sus actividades, consecuentemente mejorar su sostenibilidad. Esto ha llevado a un aumento de interés en la recuperación y utilización de subproductos generados de los procesos de producción (Otlés et al. 2015). La sangre bovino generada en los mataderos es uno de los materiales subutilizados y se ha identificado como una fuente de moléculas de alto valor para aplicaciones en áreas como la industria alimentaria, biomédica y farmacéutica (Lafarga et al. 2016).

Las aplicaciones de la microencapsulación son múltiples y ha sido ampliamente utilizada para proteger el hierro de la oxidación formando una membrana impermeable como barrera para difusión de oxígeno, así como enmascarar el sabor indeseable causado por la sal de hierro y para aumentar la biodisponibilidad (de Souza et al. 2013).

1.2.6 Bioactivos hidrofóbicos

En nuestro país el *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) se encuentra en estado silvestre en diversos lugares de San Martín, Ucayali, Huánuco, Amazonas, Madre de Dios y Loreto. La semilla de sacha inchi presenta fitoesteroles, compuestos fenólicos, y actividad antioxidante. Actualmente son de gran importancia los compuestos fenólicos por sus propiedades como antioxidantes y por sus atributos sensoriales que brindan a los alimentos como: sabor, color, y por brindar estabilidad por su resistencia a la oxidación lipídica. Asimismo, son excelentes conservadores naturales brindando estabilidad al alimento desplazando a otros conservadores sintéticos. La proyección en cuanto a su aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica está en aumento; evaluar sus propiedades antioxidantes y la presencia de polifenoles permitirá abrir nuevos posibles mercados (Chirinos et al. 2013).

La capacidad antioxidante exhibida por *Plukenetia volubilis* L. estaría asociada fundamentalmente a los ácidos grasos monoinsaturados (ω -9), poliinsaturados (ω -3 y ω -6) y funcionales (malválico, estercúlico y abiético), terpenos, esteroides, β caroteno y clorofila; a lo que contribuirían los fitofenoles provenientes de sus hojas. La variabilidad de éstos fitocompuestos presentes en la fracción hidrofílica de sacha inchi, podrían tener efecto protector frente al daño oxidativo de las macromoléculas y se constituirían en una ventana para nuevas aplicaciones de la planta (Chirinos et al. 2013 ; Castaño et al. 2012).

1.2.7 Bioaccesibilidad de micro y macronutrientes

Parte de los nutrientes contenidos en las matrices de alimentos se liberan a través del tracto gastrointestinal y están disponibles para absorción en el intestino (Tagliazucchi et al. 2010). Cuantificar la bioaccesibilidad nos permite evaluar el potencial nutricional de un alimento. Un estudio reciente de bioaccesibilidad requiere la utilización de un modelo de digestión *in vitro* que simule de manera adecuada el proceso de digestión humana. Las ventajas de

los métodos *in vitro* son su rapidez y su bajo costo; no obstante, debe tomarse con sumo cuidado los resultados obtenidos. Las industrias farmacéutica, parafarmacia y la industria alimentaria en su desarrollo de alimentos funcionales se apoyan en los modelos de digestión *in vitro*, modelos que simulan la digestión gastrointestinal, completados con cultivos celulares, que simulan nuestras células, para evaluar la biodisponibilidad de un compuesto activo (López 2016).

Micropartículas de biopolímeros pueden ser utilizados para encapsular agentes bioactivos que incluye sustancias hidrofóbicas, que pueden ser manipulados para proteger agentes bioactivos de degradación en productos durante almacenaje o en el tracto gastrointestinal (TGI) después de la ingestión y también se pueden diseñar para controlar el sitio liberación o la velocidad de la liberación del bioactivo dentro del TIG (McClements 2017; Zhang et al. 2015).

La bioaccesibilidad se define en términos de "la fracción de un nutriente que se libera de una matriz alimenticia en el tubo del tracto digestivo y queda disponible para la absorción" (Carbonell-Capella et al. 2014). Los componentes de los alimentos se hacen biodisponibles mediante transformaciones digestivas en material listo para la asimilación, absorción/asimilación en las células del epitelio intestinal. En el presente estudio, la fracción bioaccesible de un compuesto se define como la cantidad que se libera en el fluido corporal y está disponible para su absorción (Collins et al. 2015), mientras que la fracción biodisponible se define como la cantidad que puede atravesar una membrana biológica y alcanzar la circulación sistémica (Rostami y Juhasz 2011; Collins et al. 2015).

1.2.8 Simulación gastrointestinal *in vitro*

El método de simulación *in vitro* que se utiliza para determinar la bioaccesibilidad de los nutrientes presentes en la matriz alimenticia, se basa en un protocolo estandarizado que ha sido consensuado internacionalmente por la red COST INFOGEST para la simulación del proceso gastrointestinal, en el cual se consideran las tres etapas de la digestión: oral, gástrica e intestinal (Brodkorb et al. 2019; Minekus et al. 2014). El método está diseñado para usarse con equipo de laboratorio estándar y requiere una experiencia mínima para implementarlo. Es un método de digestión estática que utiliza proporciones constantes de alimento con fluidos digestivos y un pH constante para cada paso

de la digestión. Esto hace que el método sea simple de usar, aunque no adecuado para simular la cinética de la digestión (Gil-Izquierdo, Zafrilla y Tomás-Barberán 2002).

Micropartículas biopoliméricas conteniendo bioactivos destinadas a la ingestión oral es uno de los mecanismos más comunes utilizados para la liberación controlada utilizando la digestión enzimática. Micropartículas fabricadas a partir de proteínas pueden ser digeridos por proteasas en el estómago o en el intestino delgado (Sarkar et al. 2016), mientras que los fabricados a partir de almidones pueden ser digeridos por amilasas en la boca, el estómago o el intestino delgado (Liu et al. 2016). A la inversa, la erosión de microgeles en el tracto gastrointestinal (TGI) puede ser inhibida mediante la utilización de la dieta de fibras, ya que estas son las enzimas de resistencia en la boca, estómago e intestino delgado (Singh y Bala 2014). Por lo tanto, el conocimiento de la hidrólisis enzimática de diferentes biopolímeros puede utilizarse para fabricar sistemas de administración de microgeles con diferentes características de retención y liberación en el TGI (Zhang et al. 2015).

1.3 Definición de términos básicos

1.3.1 Ácidos grasos poliinsaturados

El aceite de sachá inchi posee alto contenido ácidos grasos poliinsaturados, siendo este de mayor relevancia en relación a otros ácidos grasos presentes en otros aceites, pudiendo llegar a contener hasta un 93.6 %; generalmente los ácidos grasos en el aceite de sachá inchi puede estar distribuido de la siguiente manera: 48.6 % linolénico, 36.8 % linoleico y 8.28 % de ácido oleico (Fanali et al. 2011).

1.3.2 Bioaccesibilidad

Bioaccesibilidad se refiere a la cantidad liberada de la matriz del alimento que está disponible para ser absorbido en el intestino y permite conocer la verdadera contribución que brinda el consumo de nutrientes específicos, así como también, para establecer los requerimientos, sobre todo cuando su absorción interfiere o es interferida por la presencia de otros componentes (Chang 2019).

1.3.3 Gelificación iónica

La gelificación iónica es un método de encapsulación simple, rápida y de bajo costo, basado en la capacidad de polielectrólitos de realizar interacciones electrostáticas (Patil et al. 2010).

1.3.4 Hierro

El hierro es un mineral abundante en la corteza terrestre y esencial para la vida humana. Reconocido como un micronutriente necesario para la recuperación de la anemia. Cuantitativamente, la principal función biológica del hierro es el transporte de oxígeno, ya que forma parte del núcleo heme en las proteínas hemoglobina y mioglobina, el hierro participa en más de 200 sistemas enzimáticos que son esenciales para las funciones celulares (Ward y Crichton 2016).

1.3.5 Lípido

Los lípidos son compuestos naturales, agrupados debido a su estructura no polar y su relativa insolubilidad en agua. Las ceras, los lípidos simples formados por la esterificación de ácidos grasos y alcoholes de cadena larga, se usan comúnmente para controlar la desecación de frutas y verduras frescas (Morillon et al. 2002).

1.3.6 Encapsulación

La encapsulación es un proceso para atrapar compuestos bioactivos dentro de un material portador como una herramienta útil para mejorar la entrega de compuestos bioactivos o células vivas en los alimentos. Es una tecnología donde los componentes bioactivos están completamente envueltos, cubiertos y protegidos por una barrera física (Bakry et al. 2016).

1.3.7 Proteína

Proteína es una macromolécula que generalmente consta de veinte aminoácidos diferentes (AA) unidos a través de enlaces peptídicos. La proteína es un componente principal de los tejidos animales. Por ejemplo, el contenido de proteínas en el músculo esquelético de ganado vacuno o porcino en crecimiento es aproximadamente el 70% en base a materia seca (Wu et al. 2016).

1.3.8 Sangre bovino

La sangre bovino es un líquido generalmente de color rojo, que circula por las arterias y venas del cuerpo del animal y que tiene importantes funciones fisiológicas como distribuir oxígeno y otras sustancias a las células del organismo, así como recoger de éstas los productos de desecho. Se compone de una parte líquida o plasma y de células en suspensión: eritrocitos, leucocitos y plaquetas. La sangre tiene varios usos importantes: consumo humano (alimenticio y farmacéutico), animal e industrial (Ofori y Hsieh 2012).

CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1 Formulación de la hipótesis

Mediante la técnica de gelificación iónica podríamos producir micropartículas conteniendo aceite de *Plukenetia volubilis* L, modificando su estructura recubriéndolas con proteínas de sangre bovino para mantener la estabilidad de nutrientes durante el tránsito gastrointestinal *in vitro*, promoviendo alta bioaccesibilidad de macro y micronutrientes.

2.2 Variables y su operacionalización

2.2.1 Variables independientes

- Micropartículas de pectina
- Proteínas de sangre bovino
- Aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.)

2.2.2 Variables dependientes

- % de proteína absorbida
- Estructura de micropartículas
- Morfología de micropartículas
- Eficiencia de encapsulación
- Diámetro medio de micropartículas
- % bioaccesibilidad de proteínas
- % bioaccesibilidad de lípidos
- % bioaccesibilidad de hierro

2.2.3 Operacionalidad de variables

Variable	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicador	Escala de medición	Categorías	Valores de las categorías	Medio de verificación
Independiente							
Micropartículas de pectina	Matrices a base de pectina de tamaño micrométrico.	Cuantitativa	Porcentaje o mg/gr	Razón	Eficiencia de encapsulación	>50	Reporte de análisis
					Proteína absorbida	>50	
					Hierro	>50 mg/gr	
Sangre bovino	Es generada en los mataderos es uno de los materiales subutilizados y se ha identificado como una fuente de moléculas de alto valor para aplicaciones en áreas como la industria alimentaria, biomédica y farmacéutica.	Cuantitativa	mg/gr	Razón	Proteína	>1500	Análisis de proteína
					Hierro	>120	Análisis de hierro
Aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L. (sacha inchi)	Aceite con capacidad antioxidante asociada fundamentalmente a los ácidos grasos monoinsaturados (ω -9), poliinsaturados (ω -3 y ω -6).	Cuantitativa	Porcentaje	Razón	Ácidos grasos monoinsaturados	~ 10	Perfil de ácidos grasos
					Ácidos grasos poliinsaturados	~90	Perfil de ácidos grasos
Cantidad de nutriente dializado	Es la cantidad de nutriente estudiado en relación con la cantidad de materia seca antes de someter al proceso de digestión in vitro a la muestra	Cuantitativa	Porcentaje	Razón	Proteína	>1	Análisis de proteína
					Hierro	>1	Análisis de hierro
					Lípido	>1	Análisis de lípido
Dependiente							
Bioaccesibilidad	Es la cantidad relativa del nutriente dializado en relación con la cantidad inicial del nutriente contenido en cada muestra de la matriz alimenticia.	Cuantitativa	Porcentaje	Razón	Nutriente	>1	Reporte de análisis

CAPITULO III: METODOLOGÍA

Los análisis y ensayos experimentales fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio de Investigación de Control de Calidad del CIRNA, ubicado en el distrito de San Juan y en el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Planta Piloto de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, ubicada en el distrito de Iquitos, provincia de Maynas. La bioaccesibilidad fueron determinadas en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con sede en Madrid, España.

Material y equipos

Material

El material encapsulante utilizado fue pectina cítrica de baja masa molar y bajo contenido de metoxilación amidada (Lote SK62227, CPKelco, Limeira, SP, Brasil). Para interacción electrostática se utilizó sangre bovino (SB), procedente del camal municipal de Punchana, Iquitos, Perú; aceite de *Plukenetia volubilis* (sacha inchi) como material de relleno, cloruro de calcio anhidro (lote: K47117278604, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), ácido clorhídrico (lote: K476888817611, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), ácido sulfúrico (lote: K47246131 545, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), cloroformo (lote: K47769245, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), hidróxido de sodio (lote: K47498778, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), metanol (lote: I821009608, Merck Peruana S.A., Lima, Perú), celite, acetona, terbutil metil éter dimetil éter, éter de petróleo. Agua destilada y los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Equipos

- **Agitador magnético** (VELP CIENTIFICA, MOD. ARE, CODIGO: F20500162, ITALIA).
Descripción: Construida en aleación de aluminio y revestida con una protección espacial. Velocidad: de 50 hasta 1500 rpm, temperatura: 370 °C, Potencia: 630 W, Voltaje: 115 V o 230 V / 50 -60 Hz, Peso: 2,6 kg.
- **Balanza analítica** (OHUAS, MOD. AX324, CODIGO: B734566620, USA).

Condiciones: controles de ajuste para el medio ambiente: tres filtros y seguimiento de cero. Capacidad: 210 g, sensibilidad: 0.1 mg, calibración: Digital externa, peso neto: 4.5 Kg.

- **Baño María** (MARCONI, MOD. MA184, CODIGO: 91510539, ITALY).
- **Baño con agitación orbital**
- **Centrífuga** (HETTICH MOD. 320R, CODIGO: 0004500-02, HOLANDA)
- **Congelador** (COLDEX, MOD. CH10P, CODIGO: 01610791102, PERÚ).
- **Destilador de nitrógeno** (GESSELLSEHA, MOD. GLF, CODIGO: 11993916, GERMANY)
- **Estufa** (MEMMERT, LOADING MODELS 30-750, CODIGO: E24 899).
- **Espatula**
- **Homogenizador Ultra Turrax** (IKA-WERKE, MOD. T25 DIGITAL, CODIGO: 03289027, GERMANY).
- **Mufla** (NABERTHERM, MOD.MORE THAN HEAT 30-3000°C, CODIGO: 67228077-0015, GERMANY)
- **Potenciómetro** (IWAUKCE, MOD. CODIGO: F0042163, USA). Descripción: Basada en medidor de pH/temperatura microprocesador con autonomía extendida (-2.00-16.00 pH), compensación automática de temperatura, calibración atómica en 2 puntos y \pm exactitud de 0.02 pH. El medidor se suministra con soluciones de electrodos de pH y de calibración.
- **Microscópio Óptico** (ZEISS, MOD. CARL ZEISS, CODIGO: 3150001630, GERMANY).
- **Refrigeradora (Respirómetro de aluminio)** (Marca MONTERO, MOD. ND, CODIGO: ND).
- **Secador Spray para Planta Piloto** (Modelo: SD-Basic Laboratory Scale Spray Dryer, Serie: SDB1117158).
- **Tamiz** (MOD. TEST SIEVE, CODIGO: 7061974).
- **Vortex (Mini Shake)** (IKA, MOD. MSI Mini Shaker CODIGO: 05-011148, GERMANY).

3.1 Tipo y diseño de estudio

El presente trabajo fue de tipo experimental, desarrollado en dos etapas:

3.1.1 Producción de micropartículas de pectina y recubrimiento proteico por interacción electrostática.

Las micropartículas fueron producidas utilizando pectina cítrica (2.5% m/m) conteniendo aceite de sachá inchi (2.065% m/m). Para el estudio de recubrimiento proteico sobre la superficie de las micropartículas se utilizó sangre bovino en polvo a concentración de 8% en solución, la respuesta estudiada fue porcentaje de proteína absorbida y materia seca.

3.1.2 Estudio de bioaccesibilidad de macro y micronutrientes.

El presente trabajo cuantificó los porcentajes bioaccesibles de proteína, lípidos y hierro.

		Micropartícula
Etapas	Inicial	
	Gástrico	
	Intestinal	

3.2 Diseño muestral

Se consideró como población a los ganados bovinos recepcionados en el Camal Municipal de Punchana, así como los aceites de *Plukenetia volubilis L.* (sachá inchi. La sangre fue obtenida de ganado bovino machos y hembras que presentaron condiciones óptimas de sanidad.

3.3 Procedimientos de recolección de datos

3.3.1 Caracterización de materiales

La sangre bovino y la pectina fueron analizadas con relación al contenido de proteína, materia seca y cenizas según metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC 2012) y con relación al contenido de lípidos, según la metodología de (Bligh y Dyer 1959).

3.3.2 Determinación de hierro

El contenido de hierro absorbido en micropartículas, en sangre bovino y dializado fue determinado de acuerdo a la metodología de AOAC Official Method 999.11 Lead, Cadmium, Co per, Iron, and Zinc in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing (AOAC 2006).

3.3.3 Secado de la sangre bovino

El secado de sangre bovino por pulverización se realizó en un equipo *Spray Dryer*, marca LabPlant, modelo SD-BASIC (Hunmanby Filey, North Yorkshire, Reino Unido), con aguja de 1,0 mm de diámetro, flujo de aire de 73 m³/h, 0,6 bar de presión de aire y 12 g/min de flujo de masa que se determinó en pruebas preliminares, siendo el flujo máximo donde no se produjo goteo de la muestra en la cámara de atomización. Este equipo está disponible en el Laboratorio de Ingeniería de la Facultad de Industrias Alimentarias. El pulverizador se alimentó a través de una bomba peristáltica con velocidad de rotación ajustada para la velocidad máxima, la temperatura de entrada de aire fue de 160 ± 2°C y la temperatura de salida de 105 ± 3°C.

3.3.4 Caracterización de la sangre bovino en polvo

La sangre bovino en polvo fue caracterizado con relación al contenido de proteína, materia seca y cenizas según metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC 2012) y con relación al contenido de lípidos, según la metodología de (Bligh y Dyer 1959).

3.3.5 Producción de micropartículas de pectina por gelificación iónica

Las micropartículas fueron producidas por gelificación iónica, utilizando emulsión de pectina (2.5% m/m), conteniendo aceite de *Plukenetia volubilis* (2.0625% m/m), a temperatura ambiente utilizando homogeneizador Ultra Turrax a 18000 rpm durante 5 minutos. La emulsión fue atomizada sobre una solución de cloruro de calcio (2.5% m/m) con pH ajustado para 4.0 utilizando un atomizador de doble flujo con orificio de 1.0 mm de diámetro, variando la altura de 12 cm entre el atomizador y la solución de cloruro de calcio, presión de aire de 0.250 kgf/cm² y velocidad de atomización de 555 mL/hora. Durante la atomización, la emulsión permaneció en agitación constante a temperatura

ambiente. Las micropartículas gelificadas fueron agitadas en solución de cloruro de calcio por 30 minutos. Posteriormente, las dietas fueron separadas y lavados en tamiz de malla de acero (Φ 75 μm) con agua destilada (pH 4.0). Fueron realizadas tres producciones independientes de micropartículas. Una fracción de las micropartículas húmedas fue congelada y liofilizada. Las micropartículas secas fueron acondicionadas en frascos con tapa y almacenadas en refrigeración.

3.3.6 Caracterización de micropartículas obtenidas por gelificación iónica

Las micropartículas fueron caracterizadas con relación al contenido de proteína, humedad y cenizas según metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC 2012) y en relación al contenido de lípidos, según Bligh y Dyer (1959).

3.3.6.1 Tamaño medio de las micropartículas

Las determinaciones del tamaño medio de las micropartículas fueron realizadas por microscopía óptica utilizando microscopio óptico (ZEISS – Primo Start) con captación de imágenes a través de cámara digital controlada por el software ZEN 2.1 SP1. Las imágenes digitalizadas de 300 micropartículas para cada muestra serán realizadas con auxilio del programa Microcal Origin pro 9.1 (Microcal Software, Inc., MA, USA).

3.3.6.2 Morfología y microestructura de las micropartículas

La observación de la morfología de las micropartículas coacervadas húmedas se realizó utilizando un microscopio óptico (ZEISS – Primo Start) provisto del software ZEN 2.1 SP1. Para evaluar microestructura de las micropartículas, las muestras se pulverizaron con una capa de oro de 30 nm y se absorbieron en un microscopio electrónico de barrido (LEO 435 VP, Leo Electron Microscopy Ltd., Cambridge, Inglaterra), a un voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras se fotografiaron con un aumento de 1500 X.

3.3.6.3 Determinación de humedad de las micropartículas

La humedad de las micropartículas gelificadas fue determinada por secado en estufa a 105°C por 6 horas, de acuerdo a la metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC 2012).

3.3.6.4 Análisis de ceniza

La determinación de la ceniza fue determinada según la metodología de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2012). Pesar 5 g de muestra y colocados en crisoles de porcelana previamente tarados para posterior incineración en mufla a temperatura de 550°C durante 5 horas. Pasado el período de tiempo, los crisoles serán colocados en una campana de desecación para enfriamiento, posteriormente fueron pesados para cuantificar.

3.3.6.5 Determinación de proteína

El contenido de proteína contenida en las micropartículas gelificadas y recubiertas fue determinado de acuerdo con el método KJELDAHL (AOAC 2012), utilizando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.

3.3.6.6 Determinación de lípidos

Se realizó de acuerdo con la metodología de Bligh y Dyer (1959), se pesó 5g de muestra (micropartículas) en tubo de vidrio con capacidad 70mL. Seguidamente se adicionó 10mL de cloroformo, 20mL de metanol y 8 mL de agua, siendo agitado por 30 min para solubilizar de manera homogénea la muestra. Posteriormente, se adicionado 10mL de cloroformo y 10mL de sulfato de sodio al 1.5%, agitándolo vigorosamente por 2 min. Los tubos conteniendo la solución y muestra se centrifugo a 1000 rpm por 2 min para formar la separación de fases. Fue retirada la fase metanólica quedando la fase clorofórmica para filtrar. Finalmente, con la ayuda de una pipeta volumétrica fue separado 5mL de la fase clorofórmica y depositada en un vaso precipitado de 10 mL previamente secado. Se dejó volatizar el solvente en una estufa a 100 °C por 2 horas.

$$\text{Lípidos Totales (\%)} = \frac{\text{Peso de lípidos (g)} \times 4 \times 100}{\text{Peso de la muestra (g)}} \quad \text{Ecu. (1)}$$

3.3.6.7 Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos será determinado por la metilación previa del aceite según el método de Hartman y Lago (1973) basado en la saponificación y esterificación, con adaptaciones basadas en el método Ce 1b-89 (AOCS, 2003). En la mayoría de los casos, los ésteres metílicos pasarán a la etapa de análisis por cromatografía gaseosa de alta resolución, utilizando un cromatógrafo de

Gases Perkin Elmer GC-2010 Clarus 690 con detector Fid, equipado con una columna RTX-Wax (30 m, 0,32 mm, 0,25, μm) - Crossbond Carbowax de polietilenglicol, a un detector de ionización de llama, con auto inyector e inyección Split. Una solución de patrón interno de 0,1 mg / ml de concentración será preparada en hexano, y 100 μl de esta solución se añadirá directamente a 1mL de la muestra metilada en tubo de Eppendorf. El volumen de inyección será de 1 μl . Las temperaturas del inyector y el detector se fijarán a 250 °C. El gas de arrastre será el nitrógeno con velocidad lineal promedio de 1,2 mL / min. La muestra se inyectará a una razón de 1:20 en el modo Split. El horno de la columna se ha programará de la siguiente manera: 60 °C (mantenido por 0 minutos), 20 °C/minuto hasta 210 °C (mantenido por 7 minutos), 30 °C/minuto hasta 240 °C (mantenido durante 15 minutos). Los ésteres metílicos saturados e insaturados producidos serán identificados por comparación del tiempo de retención con el de los ésteres metílicos de ácidos grasos estándares.

3.3.6.8 Eficiencia de encapsulación

Para la determinación del aceite total en las micropartículas se realizó de acuerdo al procedimiento siguiente. Adicionar una solución de citrato de sodio en la concentración de 3% (m/m) a 5 g de micropartículas húmedas, para liberación del aceite. Después de esta etapa, la cuantificación del aceite fue realizada según la metodología de Bligh y Dyer (1959). La eficiencia de encapsulación fue determinada por la relación:

$$EE (\%) = \frac{\text{Aceite en las micropartículas (g) / Sólidos totales (g)}}{\text{Aceite inicial (g) / sólidos totales (g)}} \times 100 \quad \text{Ecu. (2)}$$

3.3.6.9 Recubrimiento de las micropartículas con proteínas de sangre bovino

El recubrimiento de las micropartículas gelificadas húmedas obtenidas en el ítem 3.3.5, fue realizado adicionando 50 g de micropartículas para 200 mL de solución acuosa de proteínas (sangre bovino) ajustado a pH 4.0. Las micropartículas se mantuvieron en las soluciones conteniendo proteína durante 30 minutos, en agitación constante (400 rpm) a temperatura ambiente. Las micropartículas fueron posteriormente lavadas en tamices de mallas de acero (Φ 75 μm) con agua destilada (pH 4.0) para remover la proteína que no fue

adsorbida en la superficie de las micropartículas. Fueron realizadas tres producciones independientes de micropartículas. Las micropartículas fueron analizadas en triplicado con relación a su contenido de hierro, lípidos y proteína.

3.3.6.10 Secado de las micropartículas

El secado de las micropartículas gelificadas fue realizado en un Liofilizador LABCONCO FreeZone 12 plus. Las condiciones de secado fueron: Temperatura inicial: -40 °C, Temperatura final: 25°C/2 horas, tiempo total del ciclo de secado: 48 horas y Presión: 0.125 minibar.

3.3.7 Determinación de la bioaccesibilidad de proteínas, hierro y lípidos por simulación gastrointestinal *in vitro*.

El proceso de simulación de la digestión gastrointestinal (DGI) *in vitro* de proteínas, hierro y lípidos de micropartículas comprende tres etapas: oral, gástrica e intestinal. La etapa oral se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Brodkorb et al. (2019) con modificaciones:

Preliminarmente, se desarrollaron las fases de rehidratación, pre-extracción y extracción.

Fase 1: Rehidratación

Las micropartículas liofilizadas contienen ~ 3.5% de agua, por lo que requieren ser hidratadas; adicionar 30 mL de agua ultrapura, preliminarmente agitar manualmente con la finalidad de facilitar la hidratación con posterior agitación magnética hasta completa hidratación (~ 30 minutos).

Fase 2:Pre-extracción

- a. Pesar por triplicado la muestra (5g micropartículas secas) previamente homogenizada
- b. Mezclar en mortero: muestra + punta de espátula de Celite y extraer con ~20 mL Acetona mediante trituración por 1 min aprox. Adicionar a la mezcla 3,5 mL Acetato: Etanol como padrón interno como indicador que será verificado en la inyección del extracto final para la determinación de proteína.

- c. Filtrar el contenido con la ayuda de un Matraz Kitasato con succión de vacío, proteger los materiales de la luz en lo posible con la ayuda de papel aluminio.
- d. Coger el sedimento del filtro y colocar en el mortero + ~20 mL Acetona extraer mediante mezcla y trituración por 1 min aprox.
- e. Repetir el procedimiento c y d hasta que la acetona sea incolora.
- f. Recoger el solvente filtrado en un vaso de precipitado protegido de la luz.

Fase 3: Extracción

- a. Transferir el extracto obtenido de la Fase 1 a embudo de decantación.
- b. Añadir al embudo de decantación el doble de volumen de DE:EP que de la muestra.
- c. Agitar energéticamente ~1 min y dejar reposar hasta la separación de fases (acuosa y orgánica).
- d. Descartar la fase acuosa y secar la punta del embudo de decantación con papel.
- e. Retirar la fase orgánica en matraz de fondo redondo y colocar en rotaevaporador entre 35 - 40° C máx. para la eliminación del solvente.
- f. Retirar el extracto obtenido con TBME:Met-OH (50:50) en balón volumétrico de 5 mL.
- g. Almacenar a – 20° C o preparar para la determinación de cantidad de proteína.

Simulación gastrointestinal *in vitro*

Preparación

- Pesar por triplicado en el falcón, 5g aproximadamente de muestra previamente homogeneizada.
- Pre-incubar todos los reactivos de fase oral (soluciones stock FSS, solución α amilasa, solución CaCl_2) a 37°C.

3.3.7.1 Fase oral:

Para 5 gramos de muestra, añadir los siguientes reactivos a 37°C.

- 3,5 mL de solución stock **FSS** a pH 7.
- 0,5 mL de solución **α amilasa** 1500 U/ml (disuelta en la solución SSF).
- 25 µL de **CaCl₂** a 0,3M.
- **Agua** 975 µL para volumen final de 10 mL (consideramos que los 5 g de muestra pueden equivaler a 5mL).
- Agitar (agitación suave) 2 minutos a 37°C.

3.3.7.2 Fase gástrica:

Sacar las muestras del baño y colocarlas en hielo.

- Añadir 7,5 mL de solución stock **FSG** a pH 3.
- 1,6 mL de solución de **pepsina** 25000U/mL (disuelta en la solución SGF).
- 5 µL de **CaCl₂** a 0,3M.
- Ajustar el pH a 3 ± 0.2 con X mL de **HCL** ** 6M.
- Agitar durante 2 horas a 37°C.

3.3.7.3 Fase intestinal:

- Sacar las muestras del baño y colocarlas en hielo (para parar la acción enzimática).
- Añadir 10mL de **FSI** a pH 7 a 37°C (Según COST son 11mL, pero añadiremos 10mL porque 1mL se pone al añadir el colesterol esterasa).
- Añadir la solución de **colesterol esterasa** 1mL de una solución 3,077U/mL
- Añadir la solución de **pancreatina** 5mL de 800U/mL en actividad tripsina.
- Añadir 2,5 mL de **solución de bilis** (mM en bilis fresca).

- Añadir 40 μL de **CaCl₂** a 0,3M (En el protocolo COST hay que determinar la concentración de Ca²⁺ en la pancreatina para descontar la cantidad de CaCl₂ que será añadida (concentración final a 0,0 mM).)
- Ajustar el pH a $7 \pm 0,2$ con X mL de **NaOH**** 1M.
- Añadir (1,46 – X) de **agua** (volumen final mL).
- Agitar durante 2 horas a 37°C.
- Retirar el tubo/ frasco del baño y enfriar (hasta alcanzar unos 10-15°C) en baño de hielo o en agua.

Separación de la fase micelar:

- Centrifugar (10000g, 10 min a 4°C)
- Recoger el sobrenadante, pasarlo a otro falcón de 50 mL y congelar hasta extracción (máximo una semana s/BOA). Si queda bien cohesionado al fondo, se puede decantar, si no, con chupón de plástico.

Soluciones: preparación y almacenamiento

Preparar los stocks de las soluciones por separado en agua:

KCL 37.3 g/L (=0.5mol/L).

KH₂PO₄ 68 g/L (=0,5mol/L).

NaHCO₃ 84 g/L (=1mol/L): después de preparada, la solución se filtró al vacío con filtro de 0.22 μm . Almacenado a 2-5°C.

NaCl 117 g/L (=2mol/L).

MgCl₂(H₂O) 30.5 g/L (=0.15mol/L).

(NH₄)₂CO₃ 48 g/L (= 0.15mol/L).

MgCl₂(H₂O)₂ 44.1 g/L (=0.3 mol/L).

NaOH 1M e HCL 1M para ajustar el pH.

Almacenar en temperatura de refrigeración.

Las soluciones finales de FSS, FSG y FSI se llevan a un volumen final de 400mL. Se almacenan a -20°C.

Fluido simulador de saliva (FSS)

15.1 mL de KCL + 3.7 mL de KH₂PO₄ + 6.8 mL de NaHCO₃ + 0,5 mL MgCl₂ (H₂O)₆ + 0.06 de (NH₄)₂CO₃. Ajustar el pH a 7,0 (~90 µL HCl 1M) y completar el volumen hasta 400 mL con agua ultrapura. Almacenar a -20°C.

Fluido simulador gástrico (FSG)

6.9 mL de KCl + 0.9 mL de KH₂PO₄ + 12.5 mL de NaHCO₃ + 11.8 mL de NaCl + 1.1 mL de MgCl₂ (H₂O)₆. Ajustar el pH a 3,0 (~1,3 mL de HCl 1M) y completar el volumen hasta 400 mL con agua ultrapura. Almacenar a -20°C.

Fluido simulador intestinal (FSI)

6.8 mL de KCl + 0.8 mL de KH₂PO₄ + 42.5 mL de NaHCO₃ + 9.6 mL de NaCl + 1.1 mL de MgCl₂ (H₂O)₆. Ajustar el pH a 7.0 (~700 µl HCl 1M) y completar el volumen hasta 400 mL con agua ultrapura. Almacenar a -20°C.

La bioaccesibilidad de los bioactivos será expresada en porcentaje del nutriente dializado en relación a la cantidad inicial (contenido en la micropartícula) basado en la cantidad recuperada después de la digestión de cada muestra utilizando la siguiente relación:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = [D / I] \times 100 \quad \text{Ecu. (3)}$$

Donde:

D = Contenido de compuesto dializado (µg.g⁻¹ o mg.g⁻¹ materia seca),

I = Contenido del nutriente inicial (µg.g⁻¹ o mg.g⁻¹ materia seca).

3.4 Procesamiento y análisis de los datos

Para los diseños experimentales, se realizó análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar las posibles variaciones y las interacciones entre los factores. De existir diferencias entre los promedios, se realizó el test de comparación múltiple (Tukey) a 5% de significancia (Alves Nogueira *et al.*, 2013).

3.5 Aspectos éticos

La información recolectada y generada en el presente trabajo de investigación se obtuvo directamente de fuentes científicas, siendo procesadas de manera responsable, seria y honesta con el objetivo de salvaguardar la integridad y confiabilidad de la misma.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Composición centesimal de sangre bovino

Los resultados de la caracterización de la sangre bovino en este estudio son mostrados en la Tabla 1, destacamos principalmente el alto contenido proteico en su estado natural (17.26 ± 0.82 %).

Tabla 1. Composición centesimal de sangre bovino

Material	Composición centesimal (%)				
	Agua	Proteína	Lípido	Ceniza	Carbohidrato(*)
Sangre bovino	81.79 ± 1.06	17.26 ± 0.82	0.38 ± 0.09	0.32 ± 0.09	0.15

Promedio \pm desvío estadístico (n=3).

4.2 Composición centesimal de biopolímeros

Los resultados de la caracterización de los materiales utilizados en este estudio se muestran en la Tabla 2, destacamos principalmente el alto contenido proteico de la sangre bovino en base seca (88.53 ± 0.53). La Tabla 2 muestra alto contenido de ceniza (3.63 ± 0.74), este resultado es probablemente a la cantidad de hierro presente en las moléculas de proteína.

Tabla 2. Composición centesimal de biopolímeros

Material	Composición centesimal (%)				
	Humedad	Proteína	Lípido	Ceniza	Carbohidrato (**)
Sangre bovino (*)	3.90 ± 0.12	88.53 ± 0.53	0.92 ± 0.04	3.63 ± 0.74	3.01 ± 1.23
Pectina citrica	12.79 ± 0.81	1.08 ± 0.05	2.91 ± 0.23	83.22 ± 0.75

Promedio \pm desvío estadístico (n=3)

(*) Sangre bovino en polvo

(**) Por diferencia

Tabla 3. Composición de ácidos grasos de aceite de *Plukenetia volubilis* L.

Aceite	Ácidos grasos (%)				
	Palmito	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolénico
<i>Plukenetia volubilis</i> L.	4.84 ± 0.25	3.74 ± 0.26	9.80 ± 0.38	37.34 ± 0.86	44.28 ± 0.61

Promedio \pm desvío estadístico (n=3).

4.3 Producción de micropartículas por gelificación iónica con y sin recubrimiento proteico

Las micropartículas de pectina recubiertas, presentaron coloración marrón oscuro cuando comparado con la coloración de las micropartículas sin recubrimiento que presentaron coloración próxima de blanco. El recubrimiento de las micropartículas con proteínas fue ampliamente utilizado para numerosas aplicaciones, con el propósito de modificar su funcionalidad, los mecanismos de adsorción de proteínas, la cinética y la termodinámica es esencial para mejorar el diseño de nuevos materiales biocompatibles y para controlar la interacción de proteínas con superficies sólidas (Höhn, Virtanen y Boccaccini 2019).

4.4 Características de las micropartículas de pectina

4.4.1 Composición de las micropartículas de pectina producidas por gelificación iónica

Tabla 4. Composición centesimal de micropartículas de pectina

Tratamiento	Humedad (%)	Ceniza (%)	Lípidos (%)	Tamaño (μm)(*)	EE (%)
M _{PEC}	95.05 \pm 0.36	0.26 \pm 0.02	36.90 \pm 1.18	186.94 \pm 12.63	81.63 \pm 2.62

Promedio \pm desvío estadístico (n=3); (*) Promedio \pm desvío estadístico (n=300).

El contenido de humedad de las micropartículas de pectina sin recubrimiento muestra el valor de 95.05 \pm 0.36%, ese resultado es un indicador que las micropartículas obtenidas son redes tridimensionales hidrofílicas, con elevada retención de agua, reproduciendo tejidos biológicos. Las pectinas se consideran los componentes más prometedores para dosificación de fármacos en el colon, ya que son estables en los medios gastrointestinales cambiantes y se degradan fácilmente por las pectinasas producida por microflora colónica (Khotimchenko 2020).

Tabla 5. Composición centesimal de micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino

Micropartículas Recubiertas	Composición centesimal (%)					
	Humedad	Proteína	Lípido	Hierro (*)	Carbohidrato (**)	Tamaño (μm)(***)
Proteínas de sangre bovino	82.09 \pm 0.37	57.58 \pm 1.20	22.20 \pm 0.64	105.42 \pm 1.17	20.22 \pm 1.57	166.37 \pm 9.07

Promedio \pm desvío estadístico (n=3).

- (*) Contenido de hierro en mg/100g
(**) Por diferencia
(***) Promedio \pm desvío estadístico (n=300).

La Tabla 5 muestra la composición de las micropartículas recubiertas mostrando que el $82.09 \pm 0.37\%$ es agua frente a $95.05 \pm 0.36\%$ antes del recubrimiento proteico, este resultado probablemente al contenido de proteína absorbida alcanzando el $57.58 \pm 1.20\%$ en base seca. Las proteínas se adsorben en diferentes cantidades, densidades, conformaciones y orientaciones, dependiendo de las características químicas y físicas de la superficie. Los orígenes de la adsorción de proteínas en superficies sólidas es compleja, implica interacciones de van der Waals, hidrofóbicas y electrostáticas, así como enlaces de hidrógeno (Haynes y Norde 1994; Rahmati y Mozafari 2018).

4.4.2 Morfología de micropartículas de pectina producidas por gelificación iónica y micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino

Las observaciones visuales de las micropartículas muestran estructuras firmes y compactas. La concentración de pectina en solución utilizada para producir las micropartículas fue levemente mayor a 2.0%, debido a la frágil interacción entre las cargas negativas de la pectina con los cationes del calcio. La imagen de la micropartícula húmeda producida por gelificación iónica (Figura 1), permite evaluar las características morfológicas, en la que se observa la formación de una matriz multinucleada, con gotas de aceite distribuidas en toda la extensión de la matriz.

Las observaciones también muestran las imágenes de la morfología de las micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino cuando fue utilizado 8% de proteína en solución obtenidas por microscopía óptica. El recubrimiento proteico no afectó las estructuras de las micropartículas. Sin embargo, se puede apreciar claramente la proteína que fue adsorbida en la superficie de las micropartículas. Micropartículas recubiertas con proteínas de sangre bovino muestran una aparente superficie rugosa. Asimismo, se observó que las micropartículas recubiertas con sangre bovino adquirieron una coloración marrón intensa.

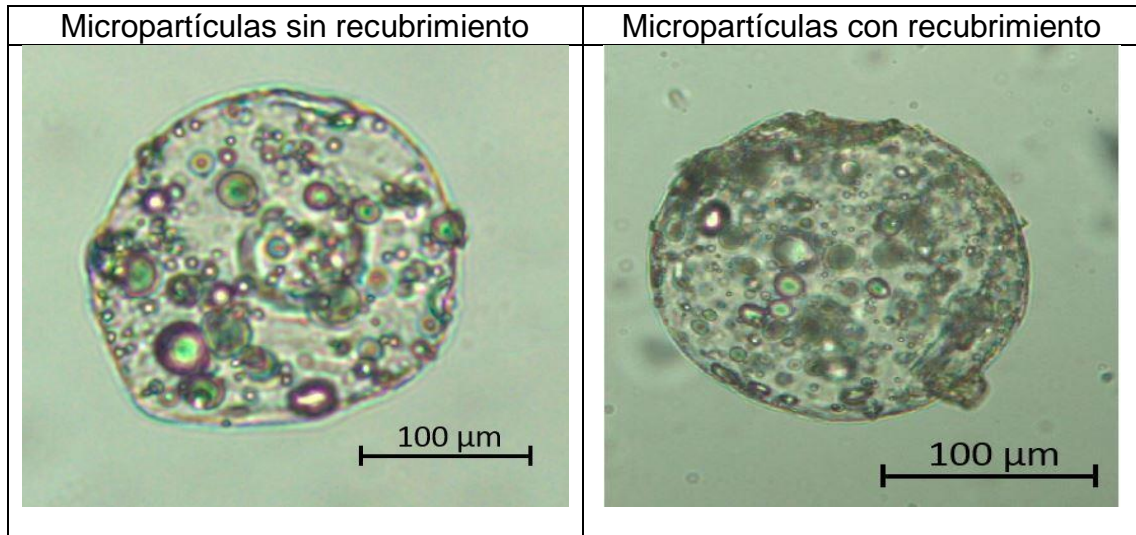


Figura 1: Imagen obtenida por MICROSCOPIA ÓPTICA de micropartículas de pectina sin y con recubrimiento con proteínas de sangre bovino a 8% de proteína en solución: Barra MO = 100 μm . Objetivo: 40x.

4.4.3 Microestructura de micropartículas de pectina sin y con recubrimiento de proteínas de sangre bovino

La observación de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido muestra que, las micropartículas aparentemente soportaron el proceso de secado, sin embargo, es posible observar que las macropartículas sin recubrimiento muestran alta fragilidad y aglomeración. Con relación a las micropartículas recubiertas, la Figura 2 muestra rugosidad en la superficie de las micropartículas, aparentemente podría estar relacionado con la proteína absorbida.

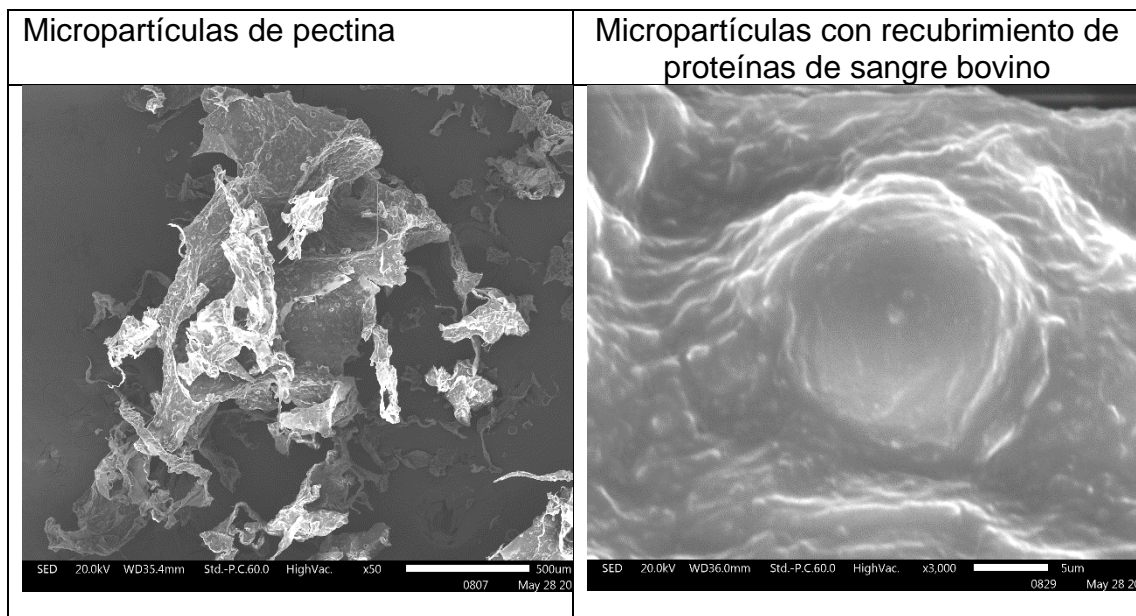


Figura 2: Imagen obtenida por MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (MEB). MPGI: micropartículas de pectina conteniendo gotas de aceite. MPRSB8: micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino 8% en solución.

4.4.4 Bioaccesibilidad de proteínas de sangre bovino absorbidas en superficie de micropartículas de pectina

El porcentaje de bioaccesibilidad varió entre los compuestos analizados contenidos en micropartículas de pectina, para lípidos>hierro>proteínas. La eficacia nutricional de los productos alimenticios puede garantizarse mediante la determinación de la bioaccesibilidad, que proporciona información valiosa para seleccionar la dosis adecuada y la fuente de las matrices alimentarias

El porcentaje de bioaccesibilidad de proteínas de sangre bovino adsorbidas en micropartículas de pectina desde la digestión gástrica hasta la dialización. Los resultados muestran que solo el $6.5 \pm 0.85\%$ es bioaccesible del contenido de proteínas adsorbidas en las micropartículas. Los resultados obtenidos en este estudio indican que posiblemente los contenidos de las proteínas encontrados inicialmente no siempre corresponden a mayor bioaccesibilidad.

4.4.5 Bioaccesibilidad de hierro contenido en moléculas de proteínas de sangre bovino absorbidas en superficie de micropartículas de pectina

La bioaccesibilidad del hierro contenido en las micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino, calculado teniendo en cuenta la cantidad determinada inicialmente (105.42 ± 1.17 mg/100g). El cálculo fue determinado de acuerdo con la ecuación 2, resultando en $12.55 \pm 0.75\%$.

4.4.6 Bioaccesibilidad de lípidos contenido micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino

La bioaccesibilidad de los lípidos contenido en las micropartículas de pectina recubiertas con proteínas de sangre bovino, calculado teniendo en cuenta la cantidad determinada inicialmente ($1,11$ g; $22.20 \pm 0.64\%$). El cálculo fue determinado de acuerdo con la ecuación 2, resultando en 16.32% la cantidad bioaccesible. El resultado mostrado corresponde a la fase intestinal, siendo que en la fase oral y fase gástrica la bioaccesibilidad del aceite no cuantificado.

La bioaccesibilidad de los lípidos se puede definir como la fracción de un compuesto que es soluble en el ambiente gastrointestinal (GI) y está disponible para la absorción, la fracción de dosis externa liberada de su matriz en el tracto gastrointestinal (Cardoso et al. 2015). En particular, la bioaccesibilidad de los ingredientes lipofílicos se ha relacionado con la fracción de los compuestos que se incorpora en la fase micelar mixta formada durante la digestión en el intestino delgado (Qian et al. 2012). Por lo tanto, en este trabajo se calculó la bioaccesibilidad como la fracción del contenido original de lípido en las micropartículas frente a la cantidad de lípido que se recuperó de la fase intestinal después de la digestión *in vitro* (dializado). El contenido de lípido inicial calculado teniendo en cuenta la carga teórica de las micropartículas y la eficiencia de encapsulación, como se expresa en la ecuación (1). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Los resultados mostraron que la bioaccesibilidad del compuesto lipídico microencapsulado es baja, no es posible comparar el efecto de la microencapsulación del compuesto debido a que no se realizó la bioaccesibilidad del aceite libre. Vale la pena señalar que, aunque la capacidad de carga de las micropartículas es de 22.20%, un mayor porcentaje quizás podría resultar en mayor porcentaje de bioaccesibilidad. En consecuencia, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras micropartículas conteniendo aceite de pescado. En este sentido, la incorporación de lípidos en las micropartículas muestra mayor porcentaje de bioaccesible cuando comparado con los porcentajes bioaccesibles de proteínas y hierro. Diferentes estudios han demostrado que el sistema gastrointestinal que el tránsito de los lípidos puede estar fuertemente influenciado por el tránsito por el sistema de la boca, y depende de la naturaleza y extensión del procesamiento oral. Los líquidos permanecen poco tiempo en la boca. Sin embargo, las propiedades de cualquier partícula de lípido puede ser modificado debido a interacciones con componentes de saliva, como minerales, enzimas, proteínas y mucina (Mun y McClements 2017 ; Mosca y Chen 2017). El estómago es el lugar donde los alimentos se descomponen por la acción ácidos, fuerzas mecánicas y enzimas digestivas, que facilitan la liberación de cualquier lípido atrapado en matrices de comida. Los investigadores han desarrollado una serie de simuladores gástricos

para modelar el complejo ambiente del estómago humano para entender mejor cómo se descomponen y liberan los alimentos cualquier lípido atrapado (Kozu et al. 2017; Barros et al. 2016).

Los investigadores en el área de alimentación y nutrición deben continuar identificando componentes en los alimentos (nutracéuticos) que tienen efectos beneficiosos para la salud, como reducir el cáncer, enfermedad cardíaca, diabetes e hipertensión, o positivamente el impacto en el estado de ánimo, el sueño, la atención y el rendimiento (La Frano et al. 2014). En consecuencia, el diseño de alimentos que pueden aumentar la biodisponibilidad de estos componentes alimenticios beneficiosos puede conducir a mejoras en la calidad de vida y salud de consumidores a través de la dieta. Por lo tanto, el progreso futuro será depender de investigadores de diferentes disciplinas trabajando juntos para abordar estos problemas complejos.

Los resultados de este estudio serán útiles para diseñar sistemas de liberación de bioactivos encapsulados y estabilizar compuestos proteicos, lipídicos y minerales como el hierro para aplicación en alimentos y productos farmacéuticos.

CAPITULO V: DISCUSIONES

En estudio reciente de Lynch et al. (2017), reportaron valores próximos de proteínas presentes en sangre bovino, las proteínas de fuente sangre de bovino tiene alto valor biológico razón por lo que es utilizado para consumo humano y animal. En otro estudio Bah et al. (2013) indicó que las características técnicas y funcionales de la sangre bovino puede ser debido a la combinación de proteínas: albúmina sérica, globulinas y fibrinógeno. Asimismo, los autores indican que la sangre integral está limitada para su uso como insumo alimenticio debido al sabor y color intenso que transfieren al producto final. No obstante, Walter et al. (1993), reportaron que la sangre bovino es una fuente de hierro de alta biodisponibilidad cuando comparado con el hierro no heme por lo cual es necesario que se desarrollen nuevas aplicaciones, para que su consumo tenga alta aceptación por los consumidores.

Diferentes estudios sobre microencapsulación de hierro utilizando pectina de baja metoxilación como material encapsulante han demostrado que la encapsulación aumenta la bioaccesibilidad del hierro (Bryszewska et al. 2019). Aunque la cantidad total de un mineral en un alimento no refleja su cantidad disponible en el cuerpo a través de la absorción, solo una cierta cantidad está biodisponible (Gharibzahedi, Seyed Mohammad Taghi y Jafari 2017). La accesibilidad biológica o biodisponibilidad de macrominerales y microminerales se define como la fracción del mineral ingerido que se absorbe y, en consecuencia, se utiliza para funciones fisiológicas habituales (Fairweather-Tait y Hurrell 1996).

La anemia por deficiencia de hierro (ADH) es un trastorno nutricional común en todo el mundo. Enfoques sostenibles basados en alimentos se aboga por el uso de fuentes de hierro dietéticas altas y biodisponibles para prevenir la deficiencia de hierro. El estudio investigó la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del hierro de algunos productos vegetales (Khoja et al. 2021).

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

La gelificación iónica es una técnica que permite incorporar compuestos hidrofóbicos como el aceite de sachá inchi, mostrando alta eficiencia de encapsulación ($81.63 \pm 2.62\%$) y tamaño de $186.94 \pm 12.63 \mu\text{m}$.

Alto contenido proteico fue absorbido en las micropartículas mostrando que $105.42 \pm 1.17 \text{ mg}$ de hierro/100 gramos de micropartículas y $22.20 \pm 0.64\%$ de contenido lipídico.

Cantidades de $6.5 \pm 0.85\%$, $12.55 \pm 0.75\%$ y $16.32 \pm 0.96\%$ fueron cuantificados con relación a las cantidades bioaccesibles de proteínas, hierro y lípidos contenidos en micropartículas pectina, en la fase de simulación intestinal.

En este contexto, el estudio de la bioaccesibilidad de proteínas, lípidos y minerales y otros nutrientes contenidos en micropartículas puede contribuir al conocimiento del valor nutricional real de estos alimentos que serían absorbidos en el organismo humano, así como evaluar la forma de procesamiento, agregando valor económico a los alimentos nativos peruanos.

En estudio con aceite de sachá inchi de Vicente et al. (2017) encontraron alto contenido de ácido linolénico (omega-3) aproximadamente 48% porcentaje ligeramente superior a lo encontrado en el presente estudio. Resultado de alta importancia para la industria nutracéutica porque se asocia con una serie de beneficios para la salud, como la prevención de enfermedades cardiovasculares, prevención de enfermedades coronarias, prevención de diabetes, prevención de hipertensión y otros (Poole et al. 2013).

CAPITULO VII: RECOMENDACIONES

Formular productos alimenticios utilizando sangre bovino en polvo como fuente de hierro heme y aceite de sacha inchi para mitigar deficiencias de micronutrientes y macronutrientes.

Promover estudios para determinar la bioaccesibilidad de micro y macronutrientes de alimentos procesados a base de fuentes vegetales amazónicas.

Desarrollar investigaciones utilizando la técnica de gelificación iónica para incorporar materias primas como el camu camu, huasai, aceite de especies hidrobiológicas amazónicas.

Realizar ensayos de bioaccesibilidad de compuestos libres y microencapsulados para efectos de comparación.

CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

AHMED, E.M., 2015. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, vol. 6, pp. 105-121. ISSN 2090-1232. DOI 10.1016/j.jare.2013.07.006.

AOAC, 2006. *AOAC Official Method 999.11*. 2006. S.l.: s.n.

AOAC, 2012. *Official methods of analysis of AOAC International*. 2012. S.l.: s.n. ISBN 0935584544.

BAKRY, A.M., ABBAS, S., ALI, B., MAJEED, H., ABOUELWAFI, M.Y., MOUSA, A. y LIANG, L., 2016. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits , Techniques , and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 15, pp. 143-182. DOI 10.1111/1541-4337.12179.

BALDEÓN, D., VELÁSQUEZ, F. y CASTELLANOS, J.E., 2015. Utilización de plukenetia volubilis (sacha inchi) para mejorar los componentes nutricionales de la hamburguesa. *Enfoque UTE*, vol. 6, no. 2, pp. 59-76. ISSN 1390-9363. DOI 10.29019/enfoqueute.v6n2.60.

BARROS, L., RETAMAL, C., TORRES, H., ZÚÑIGA, R.N. y TRONCOSO, E., 2016. Development of an in vitro mechanical gastric system (IMGS) with realistic peristalsis to assess lipid digestibility. *Food Research International*, vol. 90, pp. 216-225. ISSN 18737145. DOI 10.1016/j.foodres.2016.10.049.

BLANCO-ROJO, R. y VAQUERO, M.P., 2019. Iron bioavailability from food fortification to precision nutrition. A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 51, no. January 2018, pp. 126-138. ISSN 14668564. DOI 10.1016/j.ifset.2018.04.015.

BLIGH, E.G. y DYER, W.J., 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, vol. 37, no. 8, pp. 911-917.

BRACCINI, I. y PÉREZ, S., 2001. Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*,

vol. 2, no. 4, pp. 1089-1096. ISSN 15257797. DOI 10.1021/bm010008g.

BRODKORB, A., EGGER, L., ALMINGER, M., ALVITO, P., ASSUNÇÃO, R., BALLANCE, S., BOHN, T., BOURLIEU-LACANAL, C., BOUTROU, R., CARRIÈRE, F., CLEMENTE, A., CORREDIG, M., DUPONT, D., DUFOUR, C., EDWARDS, C., GOLDING, M., KARAKAYA, S., KIRKHUS, B., LE FEUNTEUN, S., LESMES, U., MACIERZANKA, A., MACKIE, A.R., MARTINS, C., MARZE, S., MCCLEMENTS, D.J., MÉNARD, O., MINEKUS, M., PORTMANN, R., SANTOS, C.N., SOUCHON, I., SINGH, R.P., VEGARUD, G.E., WICKHAM, M.S.J., WEITSCHIES, W. y RECIO, I., 2019. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, vol. 14, no. 4, pp. 991-1014. ISSN 17502799. DOI 10.1038/s41596-018-0119-1.

BRYZSEWSKA, M.A., 2019. Comparison Study of Iron Bioaccessibility from Dietary Supplements and Microencapsulated Preparations. *Nutrients*, vol. 11, no. 273, pp. 1-14. DOI 10.3390/nu11020273.

BRYZSEWSKA, M.A., TOMÁS-COBOS, L., GALLEGO, E., VILLALBA, M.P., RIVERA, D., TANEYO SAA, D.L. y GIANOTTI, A., 2019. In vitro bioaccessibility and bioavailability of iron from breads fortified with microencapsulated iron. *Lwt*, vol. 99, no. September 2018, pp. 431-437. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2018.09.071.

CARBONELL-CAPELLA, J.M., BUNIEWSKA, M., BARBA, F.J., ESTEVE, M.J. y FRÍGOLA, A., 2014. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, ISSN 15414337. DOI 10.1111/1541-4337.12049.

CARDOSO, C., AFONSO, C., LOURENÇO, H., COSTA, S. y NUNES, M.L., 2015. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 41, no. 1, pp. 5-23. ISSN 09242244. DOI 10.1016/j.tifs.2014.08.008.

CASTAÑO, D., VALENCIA, M. del P. V, MURILLO, E., MENDEZ, J. y ERAS, J., 2012. Composició de ácidos grasos de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*

- Linneo) y su relación con la bioactividad del vegetal. *Revista Chilena de Nutrición*, vol. 39, no. 1, pp. 45-52. ISSN 0717-7518. DOI 10.4067/S0717-75182012000100005.
- CASTRO-ROSAS, J., FERREIRA-GROSSO, C.R., GÓMEZ-ALDAPA, C.A., RANGEL-VARGAS, E., RODRÍGUEZ-MARÍN, M.L., GUZMÁN-ORTIZ, F.A. y FALFAN-CORTES, R.N., 2017. Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review. *Food Research International*, vol. 102, no. September, pp. 575-587. ISSN 18737145. DOI 10.1016/j.foodres.2017.09.054.
- CHANG, S.K., 2019. How Food Structure and Processing Affect the Bioavailability of Nutrients and Antioxidants. *Encyclopedia of Food Chemistry*, vol. 3, pp. 158-166.
- CHIRINOS, R., ZULOETA, G., PEDRESCHI, R., MIGNOLET, E., LARONDELLE, Y. y CAMPOS, D., 2013. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry* [en línea], vol. 141, no. 3, pp. 1732-1739. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.04.078. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.078>.
- COLLINS, C.D., CRAGGS, M., GARCIA-ALCEGA, S., KADEMOGLOU, K. y LOWE, S., 2015. Towards a unified approach for the determination of the bioaccessibility of organic pollutants. *Environment International*, vol. 78, pp. 24-31. ISSN 18736750. DOI 10.1016/j.envint.2015.02.005.
- COMUNIAN, T.A. y FAVARO-TRINDADE, C.S., 2016. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocolloids* [en línea], vol. 61, pp. 442-457. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2016.06.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.003>.
- ĆUJIĆ, N., TRIFKOVIĆ, K., BUGARSKI, B., IBRIĆ, S., PLJEVLJAKUŠIĆ, D. y ŠAVIKIN, K., 2016. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and alginate/inulin system. *Industrial Crops and Products*, vol. 86,

- pp. 120-131. ISSN 09266690. DOI 10.1016/j.indcrop.2016.03.045.
- DE SOUZA, J.R.R., FEITOSA, J.P.A., RICARDO, N.M.P.S., TREVISAN, M.T.S., DE PAULA, H.C.B., ULRICH, C.M. y OWEN, R.W., 2013. Spray-drying encapsulation of mangiferin using natural polymers. *Food Hydrocolloids*, vol. 33, no. 1, pp. 10-18. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2013.02.017.
- DESAI, K.G.H. y PARK, H.J., 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, vol. 23, pp. 1361-1394. DOI 10.1081/DRT-200063478.
- DIAS, M.I., FERREIRA, I.C.F.R. y BARREIRO, M.F., 2015. Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food and Function*, vol. 6, no. 4, pp. 1035-1052. ISSN 2042650X. DOI 10.1039/c4fo01175a.
- DO NASCIMENTO DA SILVA, E., HEERDT, G., CIDADE, M., PEREIRA, C.D., MORGON, N.H. y CADORE, S., 2015. Use of in vitro digestion method and theoretical calculations to evaluate the bioaccessibility of Al, Cd, Fe and Zn in lettuce and cole by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal*, vol. 119, pp. 152-158. ISSN 0026265X. DOI 10.1016/j.microc.2014.12.002.
- FAIRWEATHER-TAIT, S. y HURRELL, R.F., 1996. BIOAVAILABILITY OF MINERALS AND TRACE ELEMENTS. *Nutrition Research Reviews* [en línea], vol. 9, no. 10, pp. 295-324. Disponible en: file:///C:/Users/marce/Downloads/S0954422496000170 (1).pdf.
- FANALI, C., DUGO, L., CACCIOLA, F., BECCARIA, M., GRASSO, S., DACHÀ, M., DUGO, P. y MONDELLO, L., 2011. Chemical characterization of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 24, pp. 13043-13049. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf203184y.
- FAO, 2019. *El Estado de Seguridad Alimentaria y la Nutrición en el Mundo*. S.I.: s.n. ISBN 9789251316009.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., CARVAJAL-LÉRIDA, I. y PÉREZ-GÁLVEZ, A., 2009. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional

- efficiency. *Nutrition Research*, vol. 29, pp. 751-760. DOI 10.1016/j.nutres.2009.09.016.
- FRIEDMAN, M., 1996. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, no. 1, pp. 6-29. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf9400167.
- GALÁN, M., GONZÁLES, R. y DRAGO, S.R., 2013. Perfil nutricional y dializabilidad de minerales de alimentos de interés social. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, vol. 17, no. 1, pp. 3-9. DOI 10.14306/renhyd.19.1.123.
- GHARIBZAHEDI, Seyed y JAFARI, S.M., 2017. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. *Trends in Food Science & Technology* [en línea], vol. 62, pp. 119-132. ISSN 0924-2244. DOI 10.1016/j.tifs.2017.02.017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.017>.
- GHARIBZAHEDI, Seyed Mohammad Taghi y JAFARI, S.M., 2017. *The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation*. 2017. S.l.: s.n.
- GHIBAUDO, F., GERBINO, E., CAMPO, V., ORTO, D. y GÓMEZ-ZAVAGLIA, A., 2017. Pectin-iron capsules : Novel system to stabilise and deliver lactic acid bacteria. *Journal of Functional Foods journal*, vol. 39, no. June, pp. 299-305.
- GIL-IZQUIERDO, A., ZAFRILLA, P. y TOMÁS-BARBERÁN, F.A., 2002. An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, ISSN 14382377. DOI 10.1007/s00217-001-0428-3.
- GOUIN, S., 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology science & technology*, vol. 15, pp. 330-347.
- GRANT, G.T., MORRIS, E.R., REES, D.A., SMITH, P.J.C. y THOM, D., 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, vol. 32, no. 1, pp. 195-198. ISSN 00145793.

DOI 10.1016/0014-5793(73)80770-7.

HOLST, B. y WILLIAMSON, G., 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 19, no. 2, pp. 73-82. ISSN 09581669. DOI 10.1016/j.copbio.2008.03.003.

INEI, 2019. *Informe Técnico: Estadísticas de Seguridad Ciudadana*. 2019. S.l.: s.n.

INEI, 2020. *Resultados de la Encuesta Demográfica y de Salud Familiar – ENDES 2019*. S.l.: s.n. ISBN 1501132001389.

INTAWONGSE, M. y DEAN, J.R., 2006. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 25, no. 9, pp. 876-886. ISSN 01659936. DOI 10.1016/j.trac.2006.03.010.

JONES, O.G. y MCCLEMENTS, D.J., 2010. Functional biopolymer particles: Design, fabrication, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 9, no. 4, pp. 374-397. ISSN 15414337. DOI 10.1111/j.1541-4337.2010.00118.x.

JONES, O.G. y MCCLEMENTS, D.J., 2011. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein – polysaccharide complexes. *Advances in Colloid and Interface Science* [en línea], vol. 167, no. 1-2, pp. 49-62. ISSN 0001-8686. DOI 10.1016/j.cis.2010.10.006. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.006>.

KHOJA, K.K., ASLAM, M.F., SHARP, P.A. y LATUNDE-DADA, G.O., 2021. In vitro bioaccessibility and bioavailability of iron from fenugreek, baobab and moringa. *Food Chemistry*, vol. 335, no. July 2020. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2020.127671.

KOPEC, R.E. y FAILLA, M.L., 2018. Recent advances in the bioaccessibility and bioavailability of carotenoids and effects of other dietary lipophiles. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 68, no. January 2017, pp. 16-30.

- KORHONEN, H. y PIHLANTO, A., 2003. Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 9, no. 16, pp. 1297-1308. ISSN 13816128. DOI 10.2174/1381612033454892.
- KOZU, H., KOBAYASHI, I., NAKAJIMA, M., NEVES, M.A., UEMURA, K., ISODA, H. y ICHIKAWA, S., 2017. Mixing characterization of liquid contents in human gastric digestion simulator equipped with gastric secretion and emptying. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 122, pp. 85-90. ISSN 1873295X. DOI 10.1016/j.bej.2016.10.013.
- KUROZAWA, L. y HUBINGER, M., 2017. Hydrophilic Food Compounds encapsulation by ionic gelation. *Current Opinion in Food Science* [en línea], ISSN 2214-7993. DOI 10.1016/j.cofs.2017.06.004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.004>.
- LA FRANO, M.R., DE MOURA, F.F., BOY, E., LÖNNERDAL, B. y BURRI, B.J., 2014. Bioavailability of iron, zinc, and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. *Nutrition Reviews*, vol. 72, no. 5, pp. 289-307. ISSN 17534887. DOI 10.1111/nure.12108.
- LAFARGA, T., WILM, M., WYNNE, K. y HAYES, M., 2016. Bioactive hydrolysates from bovine blood globulins: Generation, characterisation , and in silico prediction of toxicity and allergenicity. *Journal of Functional Foods*, vol. 24, pp. 142-155.
- LIU, C., JIANG, S., HAN, Z., XIONG, L. y SUN, Q., 2016. In vitro digestion of nanoscale starch particles and evolution of thermal, morphological, and structural characteristics. *Food Hydrocolloids*, vol. 61, pp. 344-350. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2016.05.039.
- LIU, W., WANG, J., JULIAN, D. y ZOU, L., 2018. Encapsulation of β -carotene-loaded oil droplets in caseinate/ alginate microparticles: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. *Journal of Functional Foods*, vol. 40, no. November 2017, pp. 527-535.
- LÓPEZ, D., 2016. *Bioaccesibilidad, cambios en potencial antioxidante y estabilidad de los compuestos bioactivos presentes en dos extractos ricos*

en fibra sometidos a un proceso de digestión In vitro [en línea]. S.l.: s.n.
Disponibile en: <http://hdl.handle.net/11000/3472>.

LYNCH, S.A., MULLEN, A.M., O'NEILL, E.E. y GARCIA, C., 2017. Harnessing the Potential of Blood Proteins as Functional Ingredients : A Review of the State of the Art in Blood Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 16, pp. 330-344. DOI 10.1111/1541-4337.12254.

MCCLEMENTS, D.J., 2017a. Designing biopolymer microgels to encapsulate , protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 240, pp. 31-59.

MCCLEMENTS, D.J., 2017b. Recent progress in hydrogel delivery systems for improving nutraceutical bioavailability. *Food Hydrocolloids*, vol. 68, pp. 238-245. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2016.05.037.

MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., BALLANCE, S., BOHN, T., BOURLIEU, C., CARRIÈRE, F., BOUTROU, R., CORREDIG, M., DUPONT, D., DUFOUR, C., EGGER, L., GOLDING, M., KARAKAYA, S., KIRKHUS, B., LE FEUNTEUN, S., LESMES, U., MACIERZANKA, A., MACKIE, A., MARZE, S., MCCLEMENTS, D.J., MÉNARD, O., RECIO, I., SANTOS, C.N., SINGH, R.P., VEGARUD, G.E., WICKHAM, M.S.J., WEITSCHIES, W. y BRODKORB, A., 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food and Function*, vol. 5, no. 6, pp. 1113-1124. ISSN 2042650X. DOI 10.1039/c3fo60702j.

MORILLON, V., DEBEAUFORT, F., BLOND, G., CAPELLE, M. y VOILLEY, A., 2002. Factors Affecting the Moisture Permeability of Lipid- Based Edible Films: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 42, no. 1, pp. 67-89. ISSN 1040-8398. DOI 10.1080/10408398.2013.818933.

MOSCA, A.C. y CHEN, J., 2017. Food-saliva interactions : Mechanisms and implications. *Trends in Food Science & Technology* [en línea], vol. 66, pp. 125-134. ISSN 0924-2244. DOI 10.1016/j.tifs.2017.06.005. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.005>.

- MULLEN, A.M., ÁLVAREZ, C., ZEUGOLIS, D.I., HENCHION, M., O'NEILL, E. y DRUMMOND, L., 2017. Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat Science*, vol. 132, no. February, pp. 90-98. ISSN 03091740. DOI 10.1016/j.meatsci.2017.04.243.
- MUN, S. y MCCLEMENTS, D.J., 2017. Influence of simulated in-mouth processing (size reduction and alpha-amylase addition) on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in starch-based filled hydrogels. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 86, pp. 113-120. DOI 10.1016/j.lwt.2017.02.011.This.
- OFORI, J.A. y HSIEH, Y.P., 2012. The Use of Blood and Derived Products as Food Additives. En: I. CHINA (ed.), *Food Additives*. China: s.n., pp. 256.
- OTLES, S., DESPOUDI, S., BUCATARIU, C. y KARTAL, C., 2015. Food waste management, valorization, and sustainability in the food industry. *Food Waste Recovery*. S.l.: s.n., pp. 3-23. ISBN 9780128003510.
- OUWERX, C., VELINGS, N., MESTDAGH, M.M. y AXELOS, M.A.V., 1998. *Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations*. 1998. S.l.: s.n.
- OVODOV, Y.S., 2009. Current views on pectin substances. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* [en línea], vol. 35, no. 3, pp. 269-284. ISSN 1068-1620. DOI 10.1134/S1068162009030017. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1134/S1068162009030017>.
- PARRA, R./ U.N. del C., 2011. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Open Journal Systems* [en línea], vol. 63, no. 2, pp. 37055. ISSN 0304-2847. DOI 0304-2847. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/25055/37055>
- PATIL, J.S., KAMALAPUR, M. V., MARAPUR, S.C. y KADAM, D. V., 2010. Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: the Novel Techniques To Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: a Review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* [en línea], vol. 5, no. 1, pp. 241-248. Disponible en:

https://www.researchgate.net/profile/Jagadevappa_Patil/publication/265991547_Ionotropic_gelation_and_polyelectrolyte_complexation_The_novel_techniques_to_design_hydrogel_particulate_sustained_modulated_drug_delivery_system_A_review/links/552fb6c40cf20ea0a.

PONCELET, D., LENCKI, R., BEAULIEU, C., HALLE, J.P., NEUFELD, R.J. y FOURNIER, A., 1992. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 38, no. 1, pp. 39-45. ISSN 01757598. DOI 10.1007/BF00169416.

QIAN, C., DECKER, E.A., XIAO, H. y MCCLEMENTS, D.J., 2012. Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. *Food Chemistry*, vol. 135, no. 3, pp. 1440-1447. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.06.047.

RALET, M.C., DRONNET, V., BUCHHOLT, H.C. y THIBAUT, J.F., 2001. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: Characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research*, vol. 336, no. 2, pp. 117-125. ISSN 00086215. DOI 10.1016/S0008-6215(01)00248-8.

REIN, M.J., RENOUF, M., CRUZ-HERNANDEZ, C., ACTIS-GORETTA, L., THAKKAR, S.K. y DA SILVA PINTO, M., 2013. Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 75, no. 3, pp. 588-602. ISSN 03065251. DOI 10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x.

ROSTAMI, I. y JUHASZ, A.L., 2011. Assessment of Persistent Organic Pollutant (POP) bioavailability and bioaccessibility for human health exposure assessment: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, vol. 41, no. 7, pp. 623-656. ISSN 10643389. DOI 10.1080/10643380903044178.

SARKAR, A., MURRAY, B., HOLMES, M., ETTOLAIE, R., ABDALLA, A. y YANG, X., 2016. In vitro digestion of Pickering emulsions stabilized by soft whey protein microgel particles: Influence of thermal treatment. *Soft Matter*, vol. 12, no. 15, pp. 3558-3569. ISSN 17446848. DOI 10.1039/c5sm02998h.

- SHIM, S.M., FERRUZZI, M.G., KIM, Y.C., JANLE, E.M. y SANTERRE, C.R., 2009. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chemistry*, vol. 112, no. 1, pp. 46-50. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.05.030.
- SHIMIZU, M. y SON, D., 2007. Food-Derived Peptides and Intestinal Functions. *Current Pharmaceutical Desing*, vol. 13, no. 9, pp. 885-895. ISSN 09516433. DOI 10.1002/biof.552210109.
- SINGH, B. y BALA, R., 2014. Polysaccharide based hydrogels as controlled drug delivery system for GIT cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 65, pp. 524-533. ISSN 18790003. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2014.02.004.
- SKIKNE, B. y HERSHKO, C., 2012. Iron Deficiency. *Iron Physiology and Pathophysiology in Humans*. S.l.: s.n., pp. 251-282. ISBN 9781603274852.
- SRIAMORNSAK, P., 1998. Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 169, no. 2, pp. 213-220. ISSN 03785173. DOI 10.1016/S0378-5173(98)00129-X.
- STRÖM, A., SCHUSTER, E. y GOH, S.M., 2014. *Rheological characterization of acid pectin samples in the absence and presence of monovalent ions*. 2014. S.l.: s.n.
- TAGLIAZUCCHI, D., VERZELLONI, E., BERTOLINI, D. y CONTE, A., 2010. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, vol. 120, no. 2, pp. 599-606. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2009.10.030.
- TANDARA, L. y SALAMUNIC, I., 2012. Iron metabolism: Current facts and future directions. *Biochemia Medica*, vol. 22, no. 3, pp. 311-328. ISSN 13300962.
- THAKUR, B.R., SINGH, R.K., HANDA, A.K. y RAO, M. a, 2009. Chemistry and uses of pectin — A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 37(1), no. March 2013, pp. 47-73. ISSN 1040-8398. DOI 10.1080/10408399709527767.

- THAKUR, S., CHAUDHARY, J., KUMAR, V. y THAKUR, V.K., 2019. Progress in pectin based hydrogels for water purification: Trends and challenges. *Journal of Environmental Management*, vol. 238, no. March, pp. 210-223. ISSN 10958630. DOI 10.1016/j.jenvman.2019.03.002.
- THIES, C., 1995. *How to Make Microcapsules Combined Lecture and Laboratory Manual*. 1995. S.l.: s.n.
- THU, B., BRUHEIM, P., ESPEVIK, T., SMIDSRØD, O., SOON-SHIONG, P. y SKJAK-BRAEK, G., 1996. Alginate polycation microcapsules I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials*, vol. 17, no. 10, pp. 1031-1040.
- UAUY, R., HERTRAMPF, E. y REDDY, M., 2018. Iron Fortification of Foods: Overcoming Technical and Practical Barriers. *American Society for Nutritional Sciences*, no. March, pp. 849-852.
- WANG, P., LIU, H.J., MEI, X.Y., NAKAJIMA, M. y YIN, L.J., 2012. Preliminary study into the factors modulating β -carotene micelle formation in dispersions using an in vitro digestion model. *Food Hydrocolloids*, vol. 26, no. 2, pp. 427-433. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2010.11.018.
- WANG, W., MA, X., JIANG, P., HU, L., ZHI, Z., CHEN, J., DING, T., YE, X. y LIU, D., 2016. *Characterization of pectin from grapefruit peel: A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions*. 2016. S.l.: s.n.
- WARD, R.J. y CRICHTON, R.R., 2016. Iron: Properties and Determination. *Encyclopedia of food and health*, pp. 468-475.
- WHO, 2015. *The Global Prevalence of Anaemia in 2011*. 2015. S.l.: s.n. ISBN 978-92-4-156496-0.
- WHO, 2019. *2019 Annual Report of The Alliance for Health Policy and Systems Research* [en línea]. S.l.: s.n. ISBN 6103544947. Disponible en: <https://www.bps.go.id/dynamictable/2018/05/18/1337/persentase-panjang-jalan-tol-yang-beroperasi-menurut-operatornya-2014.html>.
- WICKHAM, M., FAULKES, R. y MILLS, C., 2009. In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 53, pp. 952-958. DOI

10.1002/mnfr.200800193.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018. *World Health Statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals* [en línea]. S.l.: s.n. ISBN 9789241565585. Disponible en: <http://e-journal.uajy.ac.id/14649/1/JURNAL.pdf>.
- WU, G., CROSS, H.R., GEHRING, K.B., SAVELL, J.W., ARNOLD, A.N. y MCNEILL, S.H., 2016. Composition of free and peptide-bound amino acids in beef chuck, loin, and round cuts. *Journal of Animal Science*, vol. 94, pp. 2603-2613. DOI 10.2527/jas2016-0478.
- YE, Q., GEORGES, N. y SELOMULYA, C., 2018. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 78, no. June, pp. 167-179. ISSN 09242244. DOI 10.1016/j.tifs.2018.05.025.
- ZHANG, Z., ZHANG, R., CHEN, L., TONG, Q. y MCCLEMENTS, D.J., 2015. Designing hydrogel particles for controlled or targeted release of lipophilic bioactive agents in the gastrointestinal tract. *European Polymer Journal*, vol. 72, pp. 698-716. ISSN 00143057. DOI 10.1016/j.eurpolymj.2015.01.013.
- ZHANG, Z., ZHANG, R., ZOU, L. y MCCLEMENTS, D.J., 2016. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. *Food Hydrocolloids*, vol. 58, pp. 308-315. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2016.03.015.
- ZHU, F., 2017. Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. *Food Chemistry*, vol. 229, pp. 542-552. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.02.101.
- ZIMMERMANN, M.B. y HURRELL, R.F., 2007. Nutritional iron deficiency. *Seminar* [en línea], vol. 370, pp. 511. Disponible en: www.thelancet.com.