UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

OBTENCIÓN DE NANOESFERAS A PARTIR DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO- XILOGLUCANO DE *Tamarindus indica* L. Y DETERMINACIÓN DE SU CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE CALCIO

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:
I.A. VALERIA ESPÍNDOLA SOTRES

DIRIGIDA POR:
Dra. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

CO-DIRIGIDA POR:
Dra. ELSA GUTIÉRREZ CORTEZ

QUERÉTARO
JULIO DE 2020
MÉXICO

Dirección General de Bibliotecas UAQ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

OBTENCIÓN DE NANOESFERAS A PARTIR DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO- XILOGLUCANO DE *Tamarindus indica* L. Y DETERMINACIÓN DE SU CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE CALCIO

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:
I.A. VALERIA ESPINDOLA SOTRES

DIRIGIDA POR:
Dra. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

CO-DIRIGIDA POR:
Dra. ELSA GUTIÉRREZ CORTEZ

SINODALES

Dra. Juana Isela Rojas Molina
Presidente

Dra. Elsa Gutiérrez Cortez
Secretario

Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda
Vocal

Dra. Alejandra Rojas Molina
Suplente

M. en C. Adriana Michelle Quintero García
Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Ciencias Químicas

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Lorca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro
Julio 2020

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por financiar mis estudios de maestría, con número de becario 926892.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por ofrecerme todos los recursos disponibles para llevar a cabo mis estudios de maestría y desarrollar mi proyecto de investigación.

A Dr. Abraham Faustino Vega, a M. en C.F. César Gazga Urioste, catedráticos adscritos a UAM-Xochimilco y QFB. Jennifer Janett Torres Cervantes como personal de apoyo en el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada, UIDIS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

A Quim. Rosario Espinosa Meléndez por su colaboración y apoyo en el Laboratorio de Aplicaciones perteneciente a Anton Paar México S.A. de C.V. Ubicado en: Av. Insurgentes Sur 1685 piso 2, Col. Guadalupe Inn, C.P. 01020. CDMX.

A Dr. Ponciano García Gutiérrez por su colaboración y apoyo en el Laboratorio de Biofísica de Proteínas, R207. Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

A Dra. María de los Angeles Cornejo Villegas por el análisis, caracterización fisicoquímica y propiedades reológicas de las muestras de xiloglucano de semilla de tamarindo obtenido por método de remojo y tostado en el Laboratorio de Procesos de Transformación de Alimentos y Tecnologías Emergentes UIM FES-Cuautitlán campo 4.

A M. en I.Q. Alicia del Real López, por el análisis por Microscopía Electrónica de Barrido, de las muestras de xiloglucano de semilla de tamarindo obtenido por método de remojo y tostado. Realizadas en el Laboratorio de Microscopía, perteneciente al Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales, CFATA-UNAM campus Juriquilla.

A M. en C. Javier Águila Rosas, por el análisis e interpretación de las imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido, de las muestras del coacervado lactosuero- xilogucano. Realizadas en el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación controlada, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

- *A mis padres, Mónica y Martín, por motivarme a superarme día a día y dar lo mejor de mí en todo lo que hago. Gracias por apoyarme siempre y alentarme a soñar en grande.*

- *A mis hermanas, Sthephany y Esmeralda, por no dejarme caer ni rendirme aún en los peores momentos, por acompañarme en todas mis locuras y ser las mejores hermanas del mundo.*

- *A mis ahijadas, Leilany y Elizabeth, por llenarme de amor con sus sonrisas y abrazos. Mis niñas hermosas, mi mayor deseo es ser el mejor ejemplo para ustedes.*

- *A mi novio, Adán, por ser el rayito de luz tanto en los días buenos como en los malos, por confiar en mí y acompañarme en cada paso hasta llegar aquí.*

- *A mis compañeros de maestría, Carlos, Daniel, Enrique, Jessy y Jhonatan, por las risas y buenos momentos, y también por todo lo que me enseñaron.*

- *A mis asesoras de tesis, Dra. Isela y Dra. Elsa, por guiarme y ofrecerme su apoyo para llevar a cabo este proyecto.*

- *A mis sinodales, Dr. Carlos, Dra. Alejandra y M. en C. Michelle, por su colaboración, sus aportaciones y enseñanzas.*

Dirección General de Bibliotecas UAQ

DEDICATORIA

A mi tío Nicolás y
mi abuelita Consuelo,
porque se han convertido
en mis ángeles guardianes.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE

Página

Resumen……9
Abstract……10
1. Introducción……11
2. Antecedentes……13
2.1 Importancia fisiológica del calcio……13
2.1.1 Absorción de calcio……13
2.1.1.1 Facilitadores de la absorción de calcio……14
2.1.1.2 Inhibidores de la absorción de calcio……15
2.1.1.3 Fuentes dietéticas de calcio……15
2.1.1.4 Suplementos de calcio……16
2.2 Liberación controlada……16
2.2.1 Cinética de liberación……17
2.2.2 Métodos de evaluación del perfil de liberación……18
2.2.2.1 Método de muestra y separación……18
2.2.2.2 Método de flujo continuo……18
2.2.2.3 Métodos de difusión por membrana……19
2.3 Microencapsulación ……20
2.3.1 Técnicas de encapsulación……20
2.3.1.1 Coacervación Compleja……21
2.4 Biopolímeros……22
2.4.1 Proteínas……22
2.4.1.1 Lactosuero ……23
2.4.2 Polisacáridos ……25
2.4.2.1 Polisacáridos insolubles en agua……26
2.4.2.2 Polisacáridos solubles en agua……26
2.5 Xiloglucano…… ……27
2.5.1*Tamarindus Indica L.* como fuente de xiloglucano……28
2.5.2 Extracción de xiloglucano……29
3. Justificación ……30
4. Pregunta de investigación……32
5. Hipótesis……32
6. Objetivos ……33
6.1 Objetivo general……33
6.2 Objetivos específicos……33
7. Materiales y métodos……34
8. Resultados y discusión……41
9. Conclusiones……69
10. Anexos……71
11. Literatura……75

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Modelos matemáticos de la cinética de liberación de fármacos.……..…17

Tabla 2. Composición de las variedades de lactosuero……...23

Tabla 3. Composición en aminoácidos esenciales de las proteínas del lactosuero..23

Tabla 4. Composición química de xiloglucano extraído de semilla de *T. indica* L. (tamarindo)…….…44

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de los biopolímeros en dispersión…….55

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos del coacervado…….56

Tabla 7. Contenido de calcio en xiloglucano, lactosuero y coacervado…….62

Tabla 8. Bondad de ajuste a los modelos de cinética de liberación de calcio……..66

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Esquema de un modelo de diálisis……..19
Figura 2. Morfología de microcápsulas y microesferas……..…20
Figura 3. Estructura química de la celulosa..……...26
Figura 4. Estructura química de la pectina ……..27
Figura 5. Estructura de xiloglucano……..28
Figura 6. Proceso de extracción de xiloglucano reportado en la literatura……....29
Figura 7. Diagrama de proceso propuesto para la extracción de xiloglucano.....35
Figura 8. Rendimiento y eficiencia de separación de xiloglucano de semilla de tamarindo ……42
Figura 9. Fotografías de xiloglucano extraído de semilla de tamarindo……45
Figura 10. FTIR-ATR de xiloglucano en polvo extraído de semilla de tamarindo….46
Figura 11. Morfología de xiloglucano extraído de semilla de tamarindo……48
Figura 12. Perfil reológico de dispersiones de xiloglucano 3% (m/m)……49
Figura 13. Viscosidad compleja de dispersiones de xiloglucano……51
Figura 14. Gráfica de pH de lactosuero y xiloglucano……..53
Figura 15. Curva de potencial ζ de lactosuero y xiloglucano……..54
Figura 16. Morfología del coacervado C1……...58
Figura 17. Prueba de estabilidad: Gráfica de pH……..59
Figura 18. Prueba de estabilidad: Gráfica de potencial ζ……60
Figura 19. Prueba de estabilidad: Gráfica de tamaño de partícula……60
Figura 20. Perfil de liberación de calcio a pH 2……63
Figura 21. Perfil de liberación de calcio a pH 7……64
Figura 22. Perfil de liberación de calcio a pH 8.5……..64
Figura 23. Gráfica comparativa: perfil de liberación de calcio a diferentes pH…....65
Figura 24. Gráfica del perfil de liberación ajustado al modelo de Higuchi..……67
Figura 25. Gráfica del perfil de liberación ajustado al modelo de Orden 0. ……..…71
Figura 26. Gráfica del perfil de liberación ajustado al modelo de Primer Orden……72
Figura 27. Gráfica del perfil de liberación ajustado al modelo Korsmeyer-Peppas...73
Figura 28. Gráfica del perfil de liberación ajustado al modelo de Hixson-Crowell.…74

Dirección General de Bibliotecas UAQ

RESUMEN

La ingesta diaria recomendada (IDR) de calcio (Ca) es de 1000 mg/día y la importancia de cubrir con dicha ingesta en la dieta es debido al papel que desempeña el Ca en todos los procesos metabólicos del organismo. En la última década aproximadamente el 20 % de la población mexicana presenta un déficit en la ingesta de Ca. Actualmente, las formas farmacéuticas utilizadas como suplementos de Ca presentan efectos secundarios a la salud y no permiten que éste sea aprovechado totalmente por el organismo debido a limitaciones en su biodisponibilidad. Una de las tecnologías para conseguir lo anterior, es la formación de microesferas a partir de biopolímeros por coacervación compleja. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en obtener microesferas a partir de proteínas de lactosuero (L) y del xiloglucano (XG) de las semillas de *Tamarindus indica* L. (tamarindo) mediante coacervación compleja y determinar la cinética de liberación del Ca en un modelo *in vitro*. Inicialmente, se establecieron las condiciones del proceso para la extracción del XG a partir de las semillas de *T. indica*. Así mismo, se realizó la caracterización fisicoquímica del L y XG. Posteriormente, se obtuvieron las microesferas biopoliméricas, a través del proceso de coacervación por complejación Finalmente, se determinó la cinética de liberación del Ca a partir de las microesferas en un modelo *in vitro.* El análisis de los resultados se llevó a cabo con un ANOVA utilizando la prueba de Tukey para detectar diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos. En el proceso de extracción de xiloglucano por tostado se observó mayor rendimiento y eficiencia de separación con respecto al proceso de remojo. Así mismo, el xiloglucano obtenido por el método de tostado presentó mejor capacidad como agente espesante. El lactosuero al 0.1 % m/m y pH=2 mostró un potencial ζ =21.39 ± 0.40 mV y tamaño de partícula de 293.04 ± 13.24 nm; en tanto que el xiloglucano al 0.0625% m/m y a pH=13 tuvo un potencial ζ= – 28. 96 ± 1.74 mV y un tamaño de partícula de 566.93 ± 42.29 nm. Por lo tanto, la formación del coacervado se consiguió acidificando a pH 2 la mezcla de lactosuero al 0.1 % m/m y xiloglucano al 0.0625 % m/m en proporción 2:1. El tamaño promedio de las nanoesferas fue de 300 nm. El potencial ζ representó el atributo más adecuado para identificar la formación de las nanoesferas y determinar su estabilidad. No se detectaron diferencias significativas (p<0.05) en el perfil de liberación de calcio a partir de las nanoesferas en un periodo de 4 horas a diferentes valores de pH (2, 7 y 8.5) resultando en un rango de 34.55 hasta 39.97 %. El modelo de Higuchi presentó mayor bondad de ajuste para el perfil de liberación de calcio a los diferentes valores de pH y con una correlación mayor a 0.98, indicando que la liberación de este mineral ocurre principalmente por el fenómeno de difusión. Los resultados derivados de este trabajo muestran que es factible la formación de nanoesferas por coacervación compleja a partir de xiloglucano y proteínas de lactosuero, y representan un sistema potencialmente útil para la liberación prolongada de calcio en el tracto gastrointestinal.

Palabras clave: Cinética de liberación, calcio, lactosuero, nanoesferas, *Tamarindus indica* L., xiloglucano, coacervación compleja.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ABSTRACT

The recommended daily intake (RDI) of calcium (Ca) is 1000 mg/day, the importance of covering the RDI of Ca in diet is due to the role that this mineral plays in organism metabolic processes. In the last decade, approximately 20% of the Mexican population has a deficit in calcium intake. Currently, the pharmaceutical forms used as Ca supplements have side effects on health and do not allow total Ca absorption as a result of limitations in calcium bioavailability. Therefore, it is very important to find an alternative that allows the controlled release of calcium to promote this mineral absorption in colon. One of the technologies to achieve the above is the formation of microspheres from biopolymers by complex coacervation. The objective of this work was to obtain microspheres from whey proteins (L) and xyloglycan (XG) extracted from *Tamarindus indica* L. seeds by complex coacervation and determine microspheres Ca release kinetics in an *in vitro* model. Initially, the process conditions for the extraction of XG from *T. indica* seeds was established. Likewise, the physicochemical characterization of L and XG was carried out. Subsequently, the biopolymeric microspheres were obtained by using complex coacervation, and then their stability was evaluated. Finally, Ca release kinetics from the microspheres was determined with an *in vitro* model. Analysis of the results was carried out by an ANOVA followed by a Tukey's test to detect statistical differences between the means of treatments. The XG extraction process by roasting showed a higher yield and separation efficiency than that observed with the soaking process. Likewise, the XG obtained by the roasting method exhibited better capacity as a thickening agent. The L at 0.1% w/w and pH = 2 showed a potential ζ = 21.39 ± 0.40 mV and particle size of 293.04 ± 13.24 nm; while XG at 0.0625% w/w and pH=13 had a potential ζ = - 28. 96 ± 1.74 mV and a particle size of 566.93 ± 42.29 nm. Therefore, the formation of the coacervate was achieved by acidifying the mixture of whey at 0.1% w/w, xyloglucan at 0.0625% w/w in a 2:1 ratio and at pH= 2. The average size of the nanospheres was 30 nm. The potential ζ represented the most appropriate attribute to identify the nanospheres formation to determine their stability. No significant differences (p <0.05) were detected in the Ca release profile from the nanospheres in a period of 4 hours at different pH values (2, 7 and 8.5) resulting in a range from 34.55 to 39.97%. Higuchi's model presented a greater fit for the Ca release profile at different pH values and with a correlation greater than 0.98, indicating that the release of this mineral occurs due to the diffusion phenomenon. The results derived from this work show that the formation of nanospheres by complex coacervation from XG and L is feasible and nanospheres represent a potentially useful system for the prolonged release of Ca in the gastrointestinal tract.

Keywords: Calcium release kinetics, whey, nanospheres, *Tamarindus indica* L., xyloglucan, complex coacervation.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1. INTRODUCCIÓN

La ingesta menor a 1000 mg/ día de calcio, entre la población mexicana adulta está asociada a padecimientos como osteopenia y osteoporosis, por mencionar algunos. (Nayak *et al.*, 2016). Estos se relacionan principalmente con fracturas por fragilidad de los huesos, y se perfilan como una de las enfermedades de mayor impacto en el sector salud debido a lo prolongado del tratamiento, a la mortalidad, altos costos de atención médica y el deterioro en la calidad de vida de las personas (NOF, 2018).

El uso de suplementos minerales presenta desventajas como: la interacción con otros medicamentos, en algunos pacientes causan malestares como: estreñimiento, flatulencia, dispepsia; otra desventaja es el incremento del riesgo a desarrollar cálculos renales y cabe mencionar cabe mencionar que sólo una pequeña porción del calcio que proporciona dicho suplemento es absorbida por el organismo. Por lo anterior, surge la necesidad de proponer una alternativa a los suplementos de calcio que presenten mayores ventajas con respecto a los suplementos ya existentes. Una alternativa es una forma farmacéutica de liberación controlada que permita incrementar la biodisponibilidad del calcio en el organismo. La formación de micro y nanoesferas por coacervación es un método que permite proteger a los compuestos bioactivos de factores como el calor y la humedad, manteniendo su estabilidad y viabilidad. En el caso de los fármacos, cuya liberación controlada se lleve a cabo en el estómago o en el intestino, la formación de un coacervado permite mejorar la absorción de los compuestos o principios activos con un mínimo de reacciones adversas (Itoh *et al.,* 2008; López *et al.*, 2012).

Durante las últimas décadas, la aplicación de polímeros naturales para el desarrollo de medicamentos y aditivos en los alimentos, ha sido objeto de interés debido a su gran disponibilidad, bajos costos, biodegradabilidad y biocompatibilidad. Además de esto, la tendencia en investigación y la industria farmacéutica es el reemplazo de los materiales que tienen como estructura base polímeros sintéticos por sus largos tiempos de descomposición (Malakar *et al.*, 2013).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

En la última década, las investigaciones en el uso del xiloglucano como agente estabilizante y espesante en la industria farmacéutica y alimenticia han dado frutos (Joseph, *et al*., 2012). La semilla de tamarindo es un residuo del proceso de elaboración de concentrados de pulpa de fruta y es considerada como desecho; sin embargo, dichas semillas pueden ser aprovechadas para obtener materiales poliméricos como el xiloglucano, el cual es un polisacárido que desempeña el papel de estabilizador, espesante, aglutinante, retardante de liberación del compuesto de interés o principio activo y modificador de características sensoriales. De manera adicional, puede ser utilizado como un agente protector de la mucosa gástrica y de la piel y como auxiliar para la liberación de ingredientes con principio activo (Joseph *et al.,* 2012; Zhang *et al.*, 2014).

Otro material utilizado como agente encapsulante son las proteínas del lactosuero, las cuales permiten la formación de un coacervado al interactuar iónicamente con una cadena polianiónica. Esto favorece la formación de una superficie que puede endurecerse por modificación de las condiciones de temperatura y pH del sistema dando lugar a las microesferas (Sandoval *et al.,* 2016, Haffner *et al.*, 2016). Estas microestructuras pueden obtenerse del lactosuero, un subproducto de la elaboración de queso, cuya composición es rica en proteínas y minerales como el calcio.

Por lo tanto, el aprovechamiento de dos subproductos de la agroindustria que son considerados como de desecho, evita la emisión de residuos contaminantes al medio ambiente. El objetivo de este trabajo consistió en obtener nanoesferas a partir de las proteínas de lactosuero y del xiloglucano de semilla de *Tamarindus indica* L. mediante el proceso de coacervación y determinar su cinética de liberación de calcio en un modelo *in vitro*. Lo anterior, con la finalidad de que la metodología propuesta para la obtención de las nanoesferas sea utilizada en un futuro para el desarrollo de suplementos alimenticios de calcio.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia fisiológica del calcio

El calcio representa el quinto elemento más importante en el organismo, aproximadamente el 99 % del calcio se encuentra principalmente en los huesos y dientes en forma de hidroxiapatita cálcica y el 1 % restante, se encuentra en su forma ionizada libre o en unión con la albúmina sérica (EFSA, 2015). El requerimiento de la ingesta de este mineral se modifica durante las diferentes etapas de la vida: en la niñez (0 – 9 años) se requieren 1000 mg/día, en la etapa de crecimiento (9 – 18 años) son necesarios 1300 mg/día, en la etapa adulta (19 – 50 años) se necesitan 1000 mg/día, en las mujeres a partir de los 51 años y en los varones a partir de los 71 años se requieren 1200 mg/día (NIH, 2013). El calcio también representa un papel primordial como segundo mensajero en vías de señalización celular, la transmisión neuromuscular, la secreción glandular, la coagulación de la sangre y numerosas reacciones enzimáticas (Ibarra, 2014).

Los principales padecimientos asociados a la deficiencia de calcio son: osteopenia y osteoporosis (Nayak *et al.*, 2016). Adicionalmente, se relacionan fracturas por fragilidad de huesos y se perfilan como una de las enfermedades que más deterioran la calidad de vida de las personas acorde con la Fundación Nacional de Osteoporosis (NOF, 2018). A nivel mundial la prevalencia de osteoporosis es de aproximadamente 200 millones de personas y en México, el 17 % de la población femenina y el 9 % la población masculina padece osteoporosis (IOF, 2019).

De acuerdo con el Análisis de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del año 2012 (ENSANUT, 2012), se detectó un déficit en la ingesta de calcio en aproximadamente el 20 % de la población mexicana adulta, razón por la cual se incrementa el riesgo de padecer osteoporosis en el adulto mayor.

2.1.1 Absorción de calcio

El porcentaje de absorción del calcio en el organismo se encuentra entre el 20 y el 60 %, dicho porcentaje depende de la fuente de origen y la mezcla de alimentos al momento de ingerirlo, además del estado fisiológico de la persona (Heaney *et al.*,

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1999; Martín *et al.*, 2015). El mecanismo de absorción de este mineral depende de la cantidad de calcio ingerida: en cantidades <400 mg, la absorción es a través de transporte activo y absorbido en el duodeno y yeyuno proximal, en donde proteínas de membrana permiten la entrada del calcio a las células de la mucosa del duodeno como Ca^{2+} libre (Gropper *et al.*, 2005).

Existen otros factores que disminuyen la absorción de calcio en el intestino, principalmente porque el calcio interacciona con otros componentes de los alimentos formando complejos insolubles con fitatos y oxalatos (Eckert *et al.*, 2014). Otro factor es la dificultad de absorber cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) por la mucosa intestinal, ya que a un pH entre 7 y 8.5 son insolubles (Guéguen y Pointillart, 2000).

Por otro lado, cuando el calcio se encuentra en concentraciones mayores a 400 mg el mecanismo es mediante transporte pasivo principalmente en el yeyuno e íleon. Esto es debido a la diferencia en el potencial electroquímico que favorece el movimiento del calcio por vía paracelular. Otra vía de absorción del calcio es el colón, en donde alrededor del 4 al 10 % de este mineral se absorbe diariamente por transporte activo (Ascencio, 2012). Sin embargo, esto también depende de otras condiciones fisiopatológicas como el papel que desempeña la microbiota y la interacción de ésta con determinados alimentos (lípidos, carbohidratos, fibra) o su afectación por fármacos y prebióticos La eficiencia de esta vía de transporte se incrementa cuando las necesidades de calcio son elevadas, es decir, durante las etapas de crecimiento, embarazo y lactancia (Aguirre *et al.*, 2015).

2.1.1.1 Facilitadores de la absorción de calcio

La vitamina D participa en el metabolismo del calcio (Pacifici, 2018). Otros componentes que favorecen la absorción de este mineral son la presencia de vitamina C, ya que disminuye el pH del intestino y forma citratos haciendo relativamente más soluble el calcio, al igual que los ácidos orgánicos de cadena corta (Ascencio, 2012; Martín *et al.*, 2015). Por otro lado, los aminoácidos forman sales solubles de calcio como producto de la digestión de la proteína, en tanto que los ácidos grasos aumentan el tiempo de tránsito intestinal, permitiendo una mayor

Dirección General de Bibliotecas UAQ

absorción de los minerales (Mota y Perales, 1999; Veldurthy *et al.*, 2016). Si el alimento contiene carbohidratos como por ejemplo lactosa, al ser fermentados aumentan la producción de ácidos orgánicos, tal es el caso del ácido láctico, disminuyendo el pH, en consecuencia, se disuelven compuestos insolubles de calcio aumentando su absorción por difusión pasiva (Fleet y Scoch, 2010; Lavanda, 2011). Otros facilitadores son la caseína y la lactoalbúmina que se enlazan a los minerales divalentes como el zinc (Zn), magnesio (Mg), manganeso (Mn) y calcio (Ca) facilitando su absorción (Berdanier y Zempleni, 2009).

2.1.1.2 Inhibidores de la absorción de calcio

Los componentes intrínsecos de los alimentos como: fitatos de cereales y semillas, oxalatos de espinacas y nueces, taninos del té y el exceso de ácidos grasos libres pueden reducir la absorción del calcio al formar quelatos poco solubles o insolubles con este mineral. Además del fósforo, el exceso de sodio, así como la deficiencia de vitamina D disminuyen la absorción del calcio. Otros componentes de los vegetales como las pectinas inhiben la absorción de calcio y otros minerales (Fernández *et al.*, 2011; Zhu y Prince *et al.*, 2012).

2.1.1.3 Fuentes dietéticas de calcio

Las necesidades diarias de calcio pueden satisfacerse mediante alimentos ricos en dicho mineral, así como con alimentos que han sido enriquecidos y/o suplementos. La relevancia del alimento como fuente de un nutriente está determinado por el contenido del nutriente, la ración del alimento, los hábitos de consumo y la biodisponibilidad (IOM 2010); la cual se define como la fracción del calcio dietético que es potencialmente absorbible por el intestino y puede utilizarse en funciones fisiológicas (Abrams, 2010; Martínez, 2016).

La fuente principal de calcio en la dieta son la leche y los productos lácteos debido a que la ingesta diaria recomendada para un adulto sano es de 1000 mg/día y se cubre con tres vasos de leche, ya que un vaso de leche aporta 300 mg de calcio (Weaver *et al.*, 2009). No obstante, estos productos se evitan por personas intolerantes a la lactosa y aquellas que siguen dietas veganas, puesto que no incluyen productos lácteos en su alimentación.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Adicionalmente, hay que considerar que el alto costo que representan los productos lácteos para algunos sectores de la población, aunado al hecho de que se ha sustituido la ingesta de leche por el consumo de bebidas carbonatadas y densamente energéticas (Moran *et al.*, 2013). Por esta razón, se recurre al consumo de alimentos fortificados y suplementos de calcio.

2.1.1.4 Suplementos de calcio

Con el fin de asegurar un aporte de calcio adecuado existen varios suplementos de este mineral, los más comúnmente utilizados son el carbonato y el citrato de calcio, aunque la absorción depende de su capacidad de disociación y su capacidad de disolución. Otra desventaja consiste en que hasta un 50 % de los pacientes refieren síntomas gastrointestinales como son: estreñimiento, flatulencia y distensión abdominal tras la ingesta de estos suplementos (García *et al.*, 2010; Watts, 2010, Li *et al.*, 2018). Por lo que resulta prioritario buscar y proponer fuentes alternativas de calcio para incrementar la ingesta de calcio entre la población.

2.2 Liberación controlada de fármacos

Las formas farmacéuticas convencionales se caracterizan porque liberan sus componentes activos de manera inmediata hacia el lugar de absorción. Por el contrario, un sistema de liberación controlada es aquel que permite que un agente o ingrediente se libere a una velocidad y/o en una localización determinada en función de las necesidades de un organismo y durante un período de tiempo específico. Dicho proceso se verá influenciado por las condiciones del medio al cual se expone el fármaco (Parra, 2010a; Gorji *et al.*, 2018).

Algunas de las ventajas de la liberación controlada son: 1) minimizar efectos secundarios, 2) aumentar la eficacia del principio activo, 3) evitar la biodegradación del fármaco durante su distribución. En este tipo de sistemas se emplean partículas que pueden clasificarse de acuerdo a su tamaño en micropartículas (de 1 a 250 μm) y nanopartículas (<1 μm). Dentro de este grupo se incluyen las microcápsulas, que son aquellas en las que el fármaco está cubierto de una membrana y las microesferas que son matrices en los que el fármaco está disperso en la partícula (Sáez *et al.*, 2004; Santa y López, 2013).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Es necesario evaluar el perfil de liberación *in vitro* del compuesto activo de un fármaco o de una forma farmacéutica por dos razones importantes: 1) Como parte del proceso de control de calidad y 2) por los parámetros que éste proporciona para establecer la viabililidad del sistema en un modelo *in vivo*, el cual puede verse influenciado por las características de las microesferas, así como por la composición y el volumen del medio de incubación, la temperatura, el dispositivo que se emplee para estudiar el perfil, la forma y velocidad de agitación (Agnihotri, *et al.*, 2012; Spotti *et al.*, 2013).

2.2.1 Cinética de liberación

En la Tabla 1 se presentan las ecuaciones propuestas para cinética de liberación.

Tabla 1. Modelos matemáticos de la cinética de liberación de fármacos

Modelo	***Ecuación***	***Aplicación***
Primer orden	$\%Q = 100\,(1 - e^{-kt})$	Porcentaje de fármaco liberado por difusión o disolución
Higuchi	$\%Q = k_H \cdot t^{0.5}$	Liberación controlada por difusión desde matrices homogéneas y/o granulares
Combinación de Higuchi y orden cero	$\%Q = k_0 t + k_H t^{0.5}$	Liberación controlada por difusión y membrana que actúa como barrera
Orden cero	$\% Q = k_0 \cdot t$	Sistemas erosionables de área superficial constante y sistemas con membrana que controlan la difusión
% Q: porcentaje de fármaco disuelto		k_H: constante cinética de Higuchi
k_0: constante de velocidad		t: tiempo de liberación del fármaco

Fuente: Adaptada de Bonilla (2018)

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Takeru Higuchi publicó en 1961 su ecuación de raíz cuadrada, con la que describía de una forma muy sencilla la liberación del fármaco a partir de bases de formas semisólidas. A partir de este trabajo, surgieron diversos modelos matemáticos basados en los fenómenos que pueden ser: difusión, disolución, hinchamiento, erosión, precipitación y/o degradación y permiten determinar parámetros del sistema que describen el mecanismo de la liberación (Gupta *et al.*, 2012).

2.2.2 Métodos de evaluación del perfil de liberación

Los mecanismos de evaluación de liberación de microesferas se pueden llevar a cabo por disolución en un sistema acuoso, esfuerzos de cizalla, temperatura, reacciones químicas o enzimáticas, cambios en la presión osmótica, etc. Se pueden dividir ampliamente en tres categorías: i) métodos de muestra y separación, ii) métodos de flujo continuo y iii) métodos de difusión por membrana o métodos de diálisis (Shen y Burgess, 2013).

2.2.2.1. Método de muestra y separación

En este método la partícula se introduce en el medio de liberación a temperatura constante, a fin de controlar la liberación del fármaco se emplea separación física y por último, la evaluación se realiza mediante el muestreo del medio o de las partículas. Una de las desventajas se presenta por el tamaño pequeño (< 100 µm) de las partículas, ya que requiere de un proceso de separación de alta energía como la centrifugación, ultracentrifugación y ultrafiltración (Mahkam, 2012)

2.2.2.2 Flujo continuo

En este método la liberación de fármaco ocurre como resultado de que el buffer o medio circula a través de una columna que contiene la forma de dosificación inmovilizada y se controla recogiendo el eluyente periódicamente. Sin embargo, este método tiene varias desventajas que incluyen costos de los instrumentos para el análisis, dificultad en la configuración, obstrucción del filtro, adsorción al filtro y dificultad para mantener un flujo constante (Liu *et al.*, 2013).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2.2.2.3 Métodos de difusión por membrana

En los métodos de difusión por membrana, los sistemas de nanopartículas están separados del medio a través de membranas que son permeables al compuesto de interés, pero impermeable a las nanopartículas. Incluyen: el método del saco de diálisis, el método del saco de diálisis inverso y los métodos de diálisis lado a lado.

Este método ha sido utilizado para determinar la bioaccesibilidad del calcio en cladodios de nopal *Opuntia ficus-indica L. Miller* (Ramírez, *et al.,* 2011). En el método del saco de diálisis, el sistema de interés se coloca dentro de los sacos y estos se colocan en recipientes con cierta agitación, y el muestreo se realiza a diferentes intervalos de tiempo (D'Souza, 2014). El modelo de diálisis se muestra en la Figura 1.

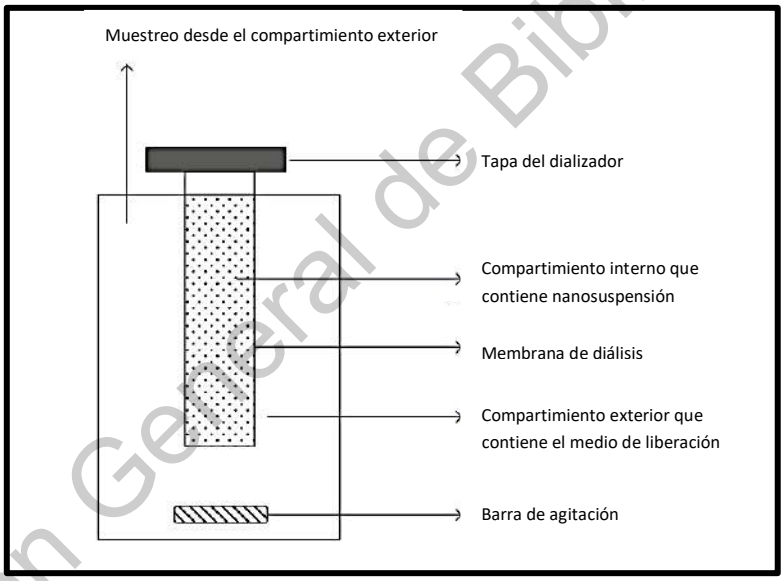


Figura 1. Esquema de un modelo de diálisis (D'Souza, 2014).

Los parámetros que influyen en la liberación del fármaco incluyen la agitación, proporción entre los volúmenes dentro de la membrana y el medio, y lo más importante, el tamaño de poro de la membrana de diálisis. Se ha encontrado que el poro de la membrana debe ser aproximadamente 100 veces más grande que el tamaño de la molécula del fármaco (Xu *et al.,* 2012). Además, se recomienda que el volumen interno de la membrana de diálisis debe ser al menos 6-10 veces menor

Dirección General de Bibliotecas UAQ

que el del medio de liberación externo, con el fin de proporcionar una fuerza motriz para el transporte del fármaco a través de la membrana (D'Souza y De Luca, 2006).

2.3 Microencapsulación

La microencapsulación de un compuesto activo es el recubrimiento de éste con diversos materiales que logren el encapsulado a nivel micro o nanométrico, obteniendo "microcápsulas" (sistema de depósito) y "microesferas" (tipo matriz) con un tamaño de partícula alrededor de 1 mm, las cuales se diferencian en su morfología (Dubey *et al.*, 2009). La morfología de ambas partículas se muestra en la Figura 2.

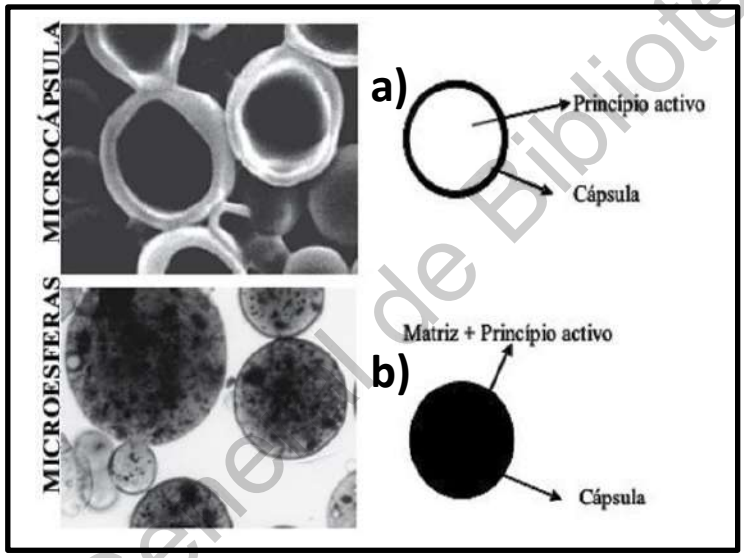


Figura. 2. Morfología de a) microcápsulas y b) microesferas (Lopretti *et al.,* 2007)

El tamaño y forma de las micropartículas depende del método de encapsulación, del tipo de polímero, peso molecular, carga, densidad y concentración (Kaushik *et al.*, 2014).

2.3.1 Técnicas de microencapsulación

Existen diversas técnicas de encapsulación, agrupados de acuerdo al método empleado:

1. Métodos mecánicos

Dirección General de Bibliotecas UAQ

a) Evaporación de solvente: Emplea una emulsión e incorpora un agente tensoactivo, por lo que el material polimérico se precipita.

b) Secado por pulverización: Se forma una solución que contenga el material de recubrimiento y el principio activo y se pulveriza en una cámara con flujo de aire caliente.

c) Recubrimiento de lecho fluido: el compuesto de interés se suspende en un lecho fluido y una solución del material de recubrimiento se pulveriza sobre las partículas, solidificándose por la acción de aire (Sáez, 2007).

2. Métodos químicos

a) Polimerización interfacial: Se forma una emulsión a partir del principio activo disuelto en una fase y recubrimiento en otra, en la interface se da la policondensación.

b) Polimerización heterogénea: La reacción se produce en un sistema disperso, lo que resulta en micropartículas de diferentes tamaños (desde 0.1 hasta 30 mm) dependiendo de la técnica específica (López *et al.*, 2012).

3. Métodos fisicoquímicos

a) Coacervación simple: Solvatación del recubrimiento y su deposición en la superficie de partículas o gotitas por cambio de pH, adición de un solvente o iones.

b) Coacervación compleja: La coacervación tiene lugar cuando se mezclan por atracción electrostática dos o más coloides que presentan cargas opuestas (catión y polianión) en medio acuoso (Vila, 2001; Gorji *et al.*, 2018).

2.3.1.1 Coacervación Compleja

El proceso de coacervación se da en varias etapas: la primera consiste en la formación de una suspensión coloidal mediante el mezclado de una proteína (con carga positiva) y un polisacárido (con carga negativa) en medio acuoso. Después, se gelifica la superficie de las gotas por enfriamiento y se adiciona un agente

Dirección General de Bibliotecas UAQ

reticulante para endurecer completamente las paredes de las microesferas. Finalmente, se lleva a cabo filtración y una deshidratación con alcohol (Sinko, 2011).

De acuerdo con Leng y Turgeon (2007), en la formación del coacervado deben considerarse factores como: condiciones ambientales (pH y fuerza iónica), composición proteica (grado de desnaturalización y concentración) y condiciones de procesamiento (velocidad de agitación, y al calentamiento y/o enfriamiento). En diversos estudios se ha utilizado la coacervación para la encapsulación, por ejemplo, de aceites esenciales. La coacervación se utiliza con la finalidad de mejorar propiedades fisicoquímicas de los compuestos activos (solubilidad, estabilidad, mejorar textura, propiedades reológicas, entre otras) y para la formulación de vehículos de productos nutracéuticos y compuestos bioactivos (Jing *et al.,* 2007).

En la industria farmacéutica se puede emplear esta tecnología para diferentes propósitos como controlar la liberación de una dosis adecuada del principio activo y preparar formas de dosificación con recubrimiento entérico (Jiang *et al.*, 2012).

2.4 Biopolímeros

Un biopolímero se define como toda sustancia constituida por moléculas que se caracterizan por la repetición de uno o más tipos de unidades monoméricas. Los monómeros son unidades del polímero, las cuales tienen bajo peso molecular y son capaces de reaccionar consigo mismo o con otras sustancias para formar una cadena larga (o también redes) de unidades alineadas una junto a otra. Los polímeros naturales se pueden clasificar en cuatro grupos: a) polisacáridos, b) proteínas, c) ácidos nucléicos y d) caucho natural (Turgeon y Beaulieu, 2001; Meneses *et al.,* 2007).

2.4.1 Proteínas

Las proteínas son macromoléculas que pueden utilizarse como vehículos de moléculas o compuestos bioactivos, ya que representan un papel importante en la encapsulación para elaboración de alimentos funcionales, a través de la formación de una red (por complejación) proteína-ligando con la capacidad de proteger los componentes unidos contra la oxidación y degradación. Para llevar a cabo el

Dirección General de Bibliotecas UAQ

proceso de coacervación es necesario considerar las características eléctricas de las proteínas, es decir su punto isoeléctrico (PI), y si presentan carga positiva, neutra o negativa con la variación del pH (Zhang *et al.,* 2014).

2.4.1.1 Lactosuero

El lactosuero es el producto lácteo líquido obtenido de la elaboración de queso al momento de la separación de la cuajada y dependiendo del proceso, el lactosuero puede ser ácido o dulce. El primero se obtiene mediante precipitación ácida de la caseína por disminución del pH de la leche hasta un valor de 4.5; mientras que el suero dulce se obtiene a partir de enzimas proteolíticas (comúnmente conocido como cuajo) que actúan sobre la proteína (FAO, 2017). En la industria quesera el lactosuero es considerado un subproducto, el cual es altamente contaminante debido a su contenido en materia orgánica; alrededor del 10 % de proteínas (lactoalbúminas y lactoglobulinas), minerales (calcio, fósforo y magnesio) y vitaminas hidrosolubles (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, cobaliamina y ácido ascórbico) (Hernández y Vélez, 2014). La composición total del lactosuero (dulce y ácido) se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de las variedades de lactosuero

Componente (g/L)	Suero dulce	Suero ácido
Sólidos totales	63.0 – 70.0	63.0 – 70.0
Lactosa	46.0 – 52.0	44.0 – 46.0
Grasa	0.0 – 5.0	0.0 – 5.0
Proteína	6.0 – 10.0	6.0 – 8.0
Calcio	0.4 – 0.6	1.2 – 1.6

Fuente: Hernández y Vélez (2014)

Existen dos categorías principales de proteínas lácteas que se distinguen ampliamente por su composición química y propiedades físicas. La primera de ellas es la familia de las caseínas, las cuales son proteínas reomórficas de estructura abierta, que forman micelas y representan el 80 % del total de las proteínas lácteas (De Kruif *et al.*, 2012).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

La segunda familia de las proteínas de la leche la conforman las proteínas del suero (20 % del total de proteínas lácteas), las cuales están constituidas de un 50 % de β-lactoglobulina, 20 % de α-lactoalbúmina, así como de inmunoglobulinas, lactoferrina, transferrina y otras proteínas y enzimas en cantidades trazas (FAO, 2017). La potencialidad de los péptidos para unirse a minerales está asociada a la secuencia de aminoácidos (ver Tabla 3) y a su peso molecular. Estas proteínas tienen la capacidad de secuestrar calcio a través de los residuos de serina-fosfato, y activar el mecanismo de liberación del mineral en medio ácido (Livney, 2010).

Tabla 3. Composición en aminoácidos esenciales de las proteínas del lactosuero (g/100 g de proteína)

Aminoácido	Contenido (g)
Leucina	9.5
Lisina	9.0
Treonina	6.2
Valina	6.0
Isoleucina	5.9
Fenilalanina	3.6
Metionina	2.0
Histidina	1.8
Triptófano	1.5
Cisteína	1.0

Adaptado de Parra (2009)

La β-lactoglobulina tiene un peso molecular de 18.3 KDa y presenta su punto isoeléctrico a pH 5.2. En el caso de la α-lactoalbúmina tiene un peso molecular de 14.2 KDa y punto isoeléctrico de 4.5. Ambas proteínas dan al lactosuero las características funcionales (Flett y Correding, 2009) y en las formulaciones de alimentos, por ejemplo: hidratación, emulsificación, formación de espuma y gelificación (Spellman *et al*., 2009). Estas propiedades pueden verse afectadas por secuencia de aminoácidos, la conformación de la proteína, carácter hidrofílico o

Dirección General de Bibliotecas UAQ

hidrofóbico, carga superficial, pH, fuerza iónica, temperatura e interacción con otros compuestos como los carbohidratos (Nicorescu *et al*., 2009).

De acuerdo con lo anterior, la carga superficial que exhibe la proteína puede modificarse para favorecer la interacción electrostática con el polisacárido. Las estrategias para inducir la coacervación dependen principalmente de las características fisicoquímicas del agente encapsulante y del componente a encapsular. (Madene *et al*., 2006). Si los biopolímeros presentan cargas opuestas, se favorece la formación del coacervado debido a que existe atracción electrostática; por el contrario, si presentan cargas iguales puede obtenerse un sistema de dos fases en donde se encuentran separados las proteínas del polisacárido, debido a la incompatibilidad o repulsión de la carga superficial de las cadenas (Baeza, 2003).

2.4.2 Polisacáridos

Los polisacáridos se forman por la unión de muchos monosacáridos (puede variar de once a varios miles), los cuales tienen la fórmula empírica $(CH_2)n$, en donde n=3 o un número mayor; están unidos mediante enlace O-glucosídico, con la consiguiente pérdida de una molécula de agua por cada enlace. Ellos pueden formar cadenas lineales o ramificadas (Varma *et al.*, 2004). Los polisacáridos difieren en sus propiedades funcionales (solubilidad, espesamiento, gelificación, capacidad de retención de agua, emulsificación, etc.) de acuerdo a su estructura química (Turgeon y Beaulieu 2001; García y Velasco, 2007). En la naturaleza los polisacáridos se encuentran como fibra soluble, la cual tiene estructura ramificada lo que le permite retener agua formando geles y se compone principalmente de pectinas, mucilago y hemicelulosas consideradas como gomas las cuales son fermentables por la microbiota intestinal, mientras que la fibra insoluble no se fermenta o se fermenta parcialmente en el intestino y la constituyen celulosas y ligninas (López *et al.*, 2011).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2.4.2.1 Polisacáridos insolubles en agua

Estos polisacáridos están constituidos por largas cadenas de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos característicos β 1-6.

Esta clasificación la integran la celulosa y la lignina, las cuales retienen poca agua y se hinchan poco. Dichos polisacáridos predominan en alimentos como el salvado de trigo, granos enteros y cereales. Los componentes de este tipo de fibra son poco fermentables y resisten la acción de los microorganismos del intestino (Willis *et al.*, 2010). En la Figura 3 se presenta la estructura característica de la celulosa como componente de la fibra insoluble.

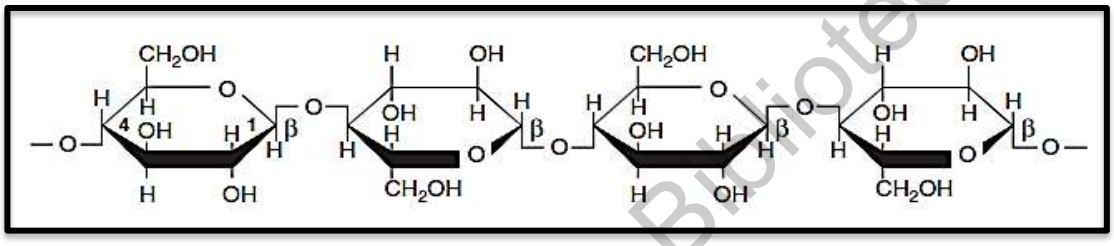


Figura 3. Estructura química de la celulosa (Fennema *et al.*, 2010)

El efecto principal de los polisacáridos insolubles en agua es el de aumentar el volumen del bolo fecal e incrementar el tiempo de tránsito a través del tracto digestivo y como consecuencia, aumenta la absorción de algunos nutrientes, a excepción de minerales como el calcio, hierro, cobre y zinc pueden que puede disminuir si se ingieren dietas muy ricas en fibra debido a los fitatos. (Eswaran *et al.*, 2013).

2.4.2.2 Polisacáridos solubles en agua

Las gomas y mucílagos agrupan a una variedad de polisacáridos solubles en agua de alta viscosidad (hidrocoloides) que se caracterizan por enlaces glucosídicos α 1-4, pueden ser extractos provenientes de algas, tubérculos, semillas, exudados vegetales y derivados de fermentación microbiana (González *et al.*, 2014). La Figura 4 presenta la estructura de la pectina, uno de los polisacáridos característicos de la clasificación de la fibra soluble.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

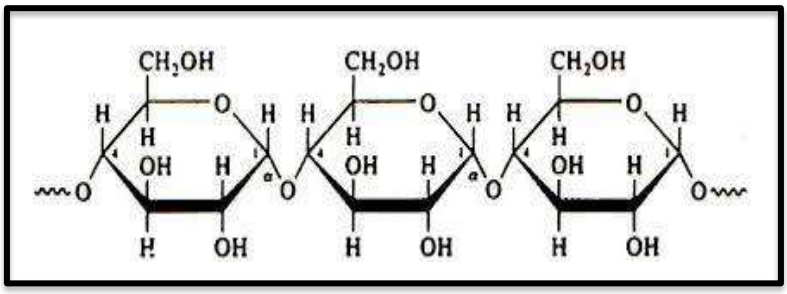


Figura 4. Estructura química de pectina (Fennema *et al.*, 2010)

Los geles formados por la fibra soluble retrasan el vaciamiento gástrico, provocando que el paso de alimentos del estómago al intestino delgado se produzca de forma más pausada. Además, se ha observado que el calcio atrapado y trasportado hasta el colon se libera al hidrolizarse la fibra por efecto de las bacterias colónicas (Escudero y González, 2006; Whisner y Castillo, 2018).

Los galactoxiloglucanos representan las hemicelulosas más abundantes en la pared celular de cotiledones de leguminosas y forman geles en diversas condiciones, como altas concentraciones de azúcares, en presencia de agua y/o alcohol y posee buena estabilidad térmica (Bhattacharya *et al.,* 1994a; Khounvilay y Sittikijyothin, 2012).

2.5 Xiloglucano

El xiloglucano o galactoxiloglucano, es un nombre común dado a cadenas de glucano β (1-4) enlazadas de manera idéntica a las cadenas de celulosa y proveen a estas microfibras flexibilidad, están contenidas en la pared celular primaria.

Este polisacárido tiene aproximadamente el 75 % de residuos de glucosa sustituidos por xilosas α (1-6), donde algunos de esos grupos de xilosas tienen un residuo de galactosa β (1-2) enlazado (Kai y Oliveira, 2010) La estructura de las cadenas de xiloglucano se muestra en la Figura 5.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

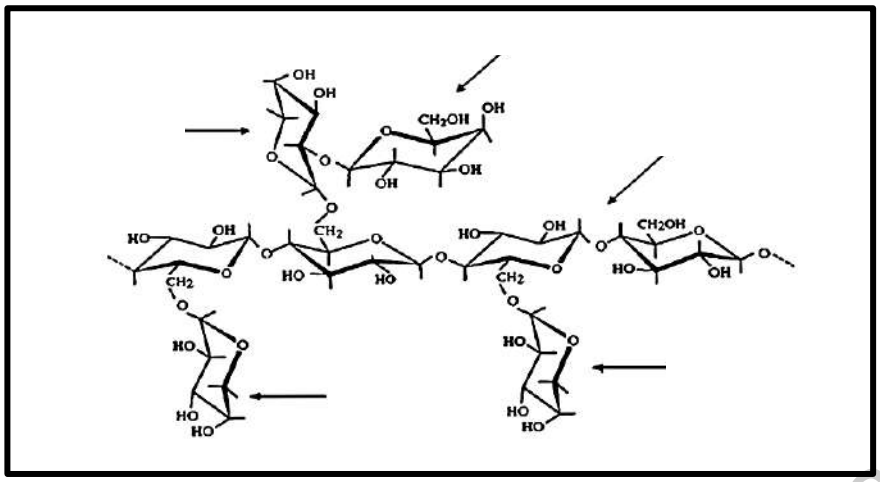


Figura 5. Estructura de xiloglucano de semilla de tamarindo (Khounvilay y Sittikijyothin, 2012)

El xiloglucano es normalmente extraído de las semillas, por ejemplo, del tamarindo, cuyo nombre científico es *Tamarindus indica* L. Este fruto es utilizado frecuentemente en la industria alimentaria para la producción de jarabes y pastas a partir de la pulpa, por lo que la cáscara y semillas son desechadas (Kumar y Bhattacharya, 2008). Sin embargo, este polisacárido tiene amplias aplicaciones en el área farmacéutica como parte de la formulación de medicamentos oculares, intranasales, transdérmicos, periodontal, bucal, pulmonar y como recubrimiento en sistemas de liberación controlada (Kulkarni *et al*., 2017).

2.5.1 *Tamarindus indica* L. como fuente de xiloglucano

El cultivo de tamarindo se extiende por toda la zona tropical de nuestro país, especialmente en la vertiente del Pacífico. Tradicionalmente se consume en forma de dulce y como jarabe y/o concentrado para preparar agua fresca. La producción anual de tamarindo en México es de poco más de 48,000 toneladas, destaca en este rubro Jalisco con más de 23,000 toneladas, seguido de Colima con más de 12,000 toneladas y Guerrero más de 7,000 toneladas. Los rendimientos son aproximadamente del 50 % de pulpa y el resto lo constituyen la cáscara y las semillas, por lo que la generación de la semilla de tamarindo como subproducto del proceso brinda la oportunidad de extraer xiloglucano aprovechando el bajo costo de la materia prima (SAGARPA, 2017).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2.5.2 Extracción de xiloglucano

El proceso de extracción del xiloglucano comprende de una operación crítica que es la centrifugación, la cual permite la correcta separación mecánica del xiloglucano de la semilla de *T. indica* L. y los componentes que no son de interés por inmiscibilidad de sus fases con base en la aplicación de la fuerza de gravedad de acuerdo a propiedades como densidad y tamaño de partícula (Geankoplis, 1998). La estandarización del proceso de extracción tiene como objetivo mayor eficiencia de separación y rendimiento, ya que no se encuentra descrito en forma detallada. Actualmente, los procesos para la extracción de xiloglucano reportados se realizan escala laboratorio y/o emplean disolventes que además de ser más costosos son nocivos para el medio ambiente (Phani, *et al.*, 2011; Joseph, *et al.*, 2012). En la Figura 6 se muestra el diagrama para el proceso de extracción de xiloglucano reportado en la literatura.

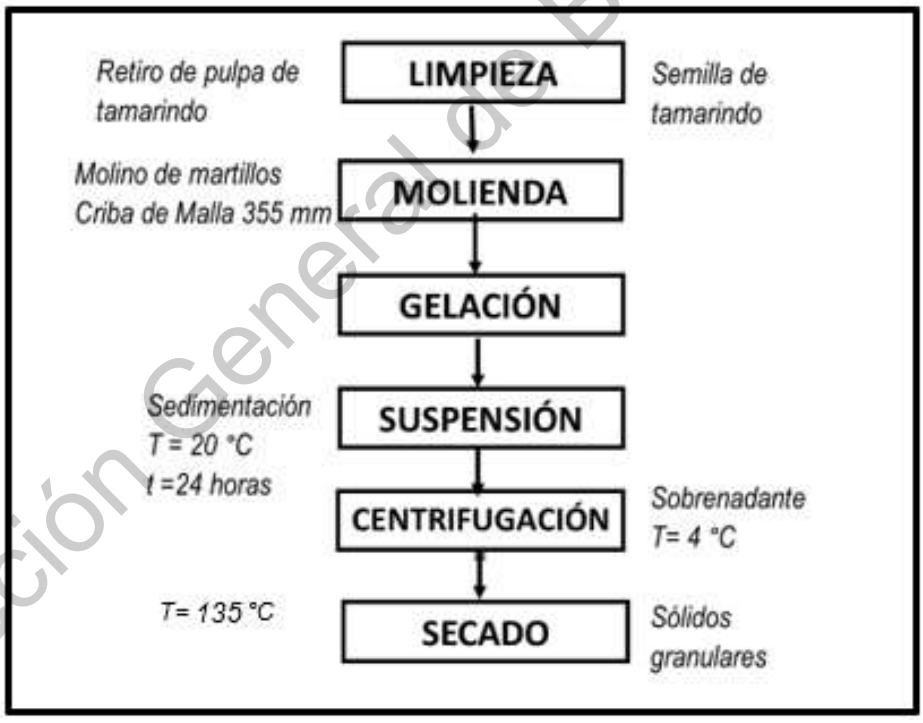


Figura 6. Proceso de extracción de xiloglucano reportado en la literatura (Khounvilay y Sittikijyothin, 2012)

Dirección General de Bibliotecas UAQ

3. JUSTIFICACIÓN

La industrialización de frutas como es el caso de *Tamarindus indica* L. (conocido comúnmente como tamarindo) genera subproductos que pueden aprovecharse para la obtención de materiales que proporcionan un valor agregado a dicha materia prima. Las semillas constituyen una parte de los subproductos del procesamiento de *T. indica* L. para la elaboración de dulces, bebidas, jaleas y mermeladas son la cáscara y las semillas, que contienen entre un 50 y 60 % de polisacáridos que en su mayoría es xiloglucano, un polisacárido con múltiples aplicaciones industriales.

En la literatura no se encuentra detallado el proceso para la extracción de xiloglucano a partir de *Tamarindus indica* L. Por otra parte, los pocos trabajos publicados relacionados con este tema reportan rendimientos muy bajos. Además, existe la desventaja de que muchos de los procesos reportados emplean disolventes de alto costo y un gasto de energía considerable a escala industrial. Así mismo, en dichos reportes no consideran el impacto ambiental ni la eficiencia del proceso. Estos dos criterios son muy importantes para poder determinar el costo del proceso, la pureza y las propiedades fisicoquímicas del producto final.

De la misma manera, el lactosuero es un subproducto de la industria láctea y representa una pérdida para los productores de queso, el cual se desecha y es nocivo para el medio ambiente. Por ello, es necesario buscar alternativas para la utilización del lactosuero que puedan tener aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica como sustituto de polímeros sintéticos. Además, cabe destacar que el lactosuero es una fuente de calcio y lactosa, siendo considerada esta última como un promotor para la absorción de calcio por el organismo. Desafortunadamente el consumo de leche y sus derivados ha disminuido por el costo elevado que representan, problemas relacionados con la intolerancia a la lactosa y a un incremento en el consumo de bebidas carbonatadas con una alta densidad energética.

Por otra parte, los biopolímeros son utilizados para la formación de micro y nanoesferas y con ello, favorecer la liberación controlada de compuestos bioactivos en el organismo incrementando con ello su biodisponibilidad. Por lo anterior, el

Dirección General de Bibliotecas UAQ

desarrollo de nanoesferas constituye una de las estrategias más innovadoras de los últimos años para la administración de fármacos, a fin de resolver problemas relacionados con la especificidad a un órgano blanco o diana; y así controlar la dosificación del fármaco aumentando la eficiencia y mejorando el perfil de liberación y absorción.

Las posibilidades de la aplicación de las micro y nanoesferas en el área químico biológica destinada a la nutrición y la medicina, y en particular al campo de los productos nutracéuticos y suplementos alimenticios es innumerable. Sin embargo, para lo anterior, resulta necesario enfocar esfuerzos a través de investigaciones inter y multidisciplinarias, con el fin de desarrollar formulaciones más eficaces; existiendo para ello materiales biopoliméricos que reúnen propiedades físicas, fisicoquímicas y biológicas capaces de sustituir materiales sintéticos para la elaboración de productos nutracéuticos, los cuales contengan biomoléculas y/o micronutrientes que sean estables y con una biodisponibilidad adecuada.

Los resultados derivados de esta investigación constituyen un primer paso para la realización a mediano y largo plazo de estudios a nivel pre-clínico y clínico con las nanoesferas obtenidas a partir de proteínas de lactosuero y xiloglucano de *Tamarindus indica* L., a fin de favorecer la liberación controlada de calcio e incrementar su biodisponibilidad, pudiendo representar una alternativa nutracéutica para la profilaxis o la terapia de fisiopatologías como la osteopenia y osteoporosis.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es factible obtener micro o nanoesferas estables a partir de proteínas de lactosuero y el xiloglucano de *Tamarindus indica* L. por coacervación compleja que tengan propiedades fisicoquímicas y un tamaño de partícula que posibiliten la liberación de calcio a través de una cinética controlada?

5. HIPÓTESIS

Las proteínas de lactosuero y el xiloglucano de *T. indica* L. pueden formar coacervados estables que permiten la liberación de calcio con una cinética controlada, ya que tienen un tamaño de partícula en un intervalo de 100 a 1000 nm y un potencial ζ en un intervalo de -15 a +15 mV.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener micro o nanoesferas a partir de proteínas de lactosuero y xiloglucano de las semillas de *Tamarindus indica* L. mediante el proceso de coacervación y determinar su cinética de liberación de calcio en un modelo *in vitro*.

Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones del proceso para la extracción del xiloglucano a partir de las semillas de *Tamarindus indica* L. utilizando dos métodos de descascarillado, a fin de obtener un mayor rendimiento y eficiencia de separación.

2. Realizar la caracterización fisicoquímica del lactosuero y xiloglucano de *Tamarindus indica* L. a emplear en el desarrollo de las micro o nanoesferas biopoliméricas.

3. Obtener las micro o nanoesferas biopoliméricas mediante coacervación compleja y llevar a cabo su caracterización.

4. Determinar la cinética de liberación de calcio a partir de las micro o nanoesferas biopoliméricas en un modelo *in vitro*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

7. MATERIALES Y MÉTODOS

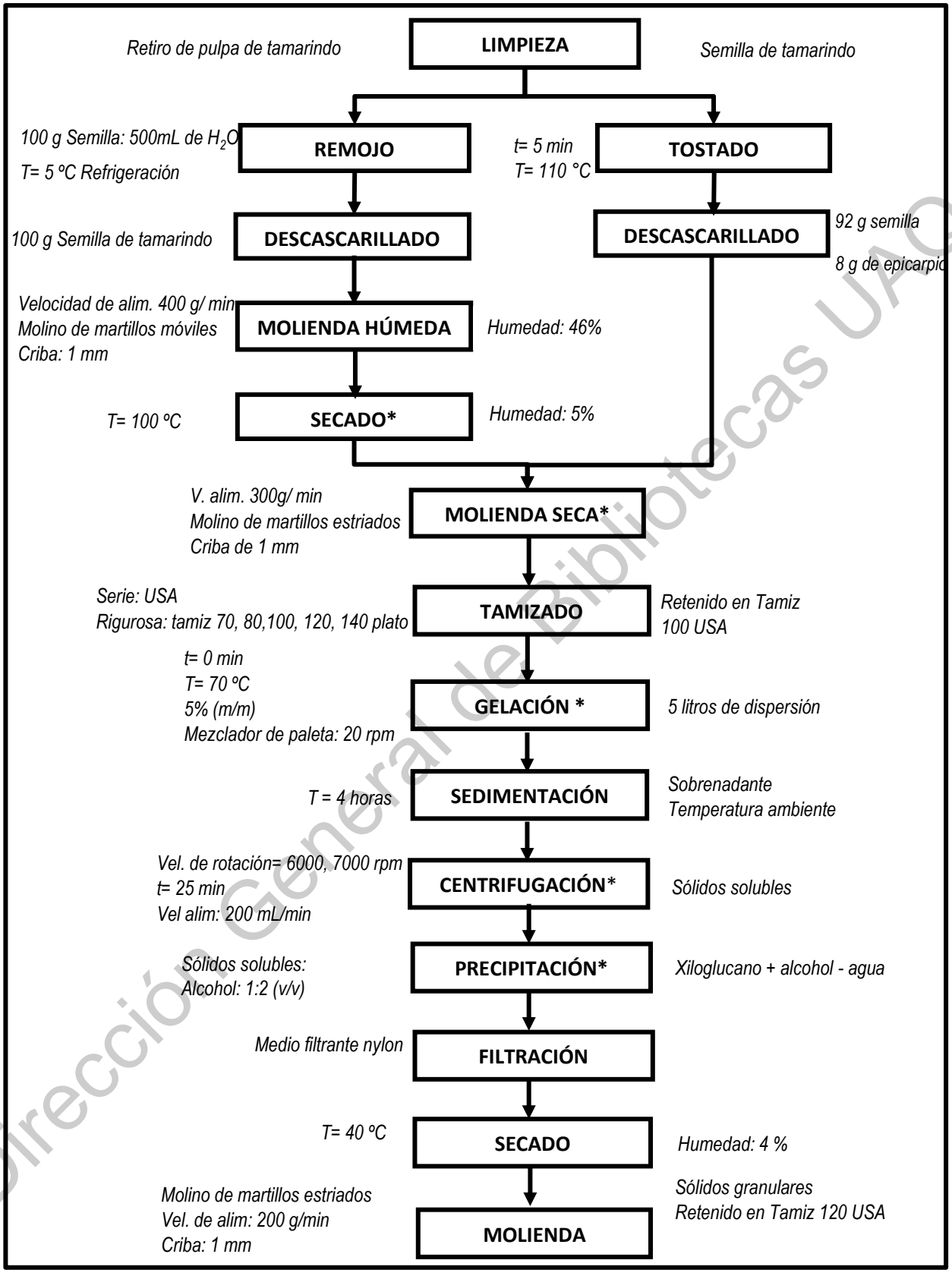
7.1 Materia prima

Las semillas de tamarindo fueron recolectadas en la empresa PRODIAZA, S.A. de C.V. El xiloglucano fue extraído por centrifugación a diferentes condiciones experimentales a partir de semillas de *Tamarindus indica* L. y por otra parte, se utilizó proteína de lactosuero proporcionado por la empresa LATIN FOODS, S.A. de C.V.

7.2 Extracción del mucílago de *Tamarindus indica* L.

La extracción de xiloglucano se realizó siguiendo el método reportado por Khounvilay and Sittikijyothin (2012), con algunas modificaciones (como se muestra en la Figura 7). El método de remojo consistió en remojar 1 kg de semillas de tamarindo en 5 L de agua a 5 °C por 8 días. Posteriormente se decorticó y la semilla húmeda se molió húmeda en un molino de cuchillas (Osterizer, GT 267) utilizando una criba de salida de 2mm, después se secó a en un horno BG modelo E102, USA por una hora en a 35 °C un flujo de aire de 1.4 m/s hasta alcanzar una humedad del 5 %. Para el método tostado se utilizó el método modificado propuesto por Nagajothi et al., (2017). Se colocó en una charola perforada 1 kg de semilla a 110 °C en horno BG modelo E102, USA por 5 minutos, después se decorticó y se molió en un molino (Pulvex, modelo 200) utilizando una criba de salida de 2mm. Finalmente, ambos granulados secos moler nuevamente utilizando una criba de salida de 1mm y se hicieron pasar por un tamiz 18 Serie USA (1mm). Se preparó una dispersiones de sólidos de semilla de tamarindo al 5 % (m/v) con agua destilada, con cada muestra. Se dispersaron por 10 min a 800 rpm con un homogeneizador marca IKA-82WERKE. La suspensión se calentó a 80 °C en agitación constante por 30 min. Se dejó enfriar y posteriormente, se separaron los sólidos solubles utilizando una centrifuga de discos Didacta Italia, Modelo TAG 1/d. El sobrenadante se precipitó con etanol al 96°GL, en una proporción 1:2 (v/v), y se filtró con un tamiz 10 Serie USA (2.0mm). El xiloglucano obtenido se secó por arrastre de aire a 30 °C hasta alcanzar 4 % de humedad. Finalmente, se molió con criba de salida de 0.5mm y el material se hizo pasar por un tamiz 120 USA (0.125 mm).

Dirección General de Bibliotecas UAQ



Dirección General de Bibliotecas UAQ

Figura 7. Diagrama de proceso propuesto para la extracción de xiloglucano

7.3 Caracterización del xiloglucano

7.3.1 Turbidez

La turbidez del sobrenadante fue una medida de los sólidos solubles (xiloglucano) presentes en la muestra. Esta determinación se realizó mediante el método 1889-88a (ASTM, 2000) con un turbidímetro calibrado LP 2000, Hanna Instruments, Italia.

7.3.2 Rendimiento

El rendimiento se determinó como la cantidad de xiloglucano seco en gramos por cada 100 g de semilla de *Tamarindus indica* L. utilizada. Con la finalidad de separar el xiloglucano del medio acuoso, el sobrenadante se precipitó con etanol con una pureza del 96 % (v/v) en una relación de agua-etanol de 1:2 (Quert *et al.*, 2001).

$$R\ (\%) = \frac{W_x}{W_{ts}}\, x\ 100 \qquad \text{(ec. 1)}$$

Donde:

R= rendimiento de extracción (%)

Wx = Mucílago de la fase ligera obtenida en (g)

Wts = Semilla de tamarindo utilizada (g)

7.3.4. Eficiencia de separación

La eficiencia de separación se determinó con base en la masa del xiloglucano libre de grasa, proteína, etc. obtenido a través del proceso de centrifugación con una centrífuga de discos. En este caso, se utilizó del valor de la turbidez de la suspensión y el valor de la turbidez de la fracción ligera obtenida de la centrífuga, utilizando la ecuación 3 (Díaz *et al.*, 2010).

$$ES\ (\%) = \frac{Ts - \mathrm{Tc}}{Ts}\ x\ 100 \qquad \text{(ec. 2)}$$

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Donde:

ES= eficiencia de separación (%)

Ts= Turbidez de la suspensión (NTU)

Tc= Turbidez del sobrenadante (NTU)

7.3.5 Análisis químico proximal

Este análisis consistió en la determinación de humedad con el método 925.10, extracto etéreo con el método Soxhlet 920.39), proteína cruda por el método micro-Kjeldahl 925.10, cenizas mediante el método 989.03, azúcares totales por diferencia. Los métodos anteriores se encuentran descritos en la AOAC (2000).

7.3.6 Color

Este parámetro se determinó con un sistema CIELAB en donde se analiza el espacio de color *L *a *b (luminosidad, croma y tono) utilizando un espectrómetro de color. Utilizando el software Color iQC (Voss, 1992).

7.3.7 Contenido de calcio

El contenido de calcio fue analizado a partir de las cenizas de las muestras con el método 968.08 (AOAC, 2000) de acuerdo con la metodología reportada por Gutiérrez *et al.* (2007) en un espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, Mod. Analyst 300, Boston, MA, USA). Se utilizó $CaCO_3$ (1000 ppm) como estándar de calcio para elaborar la curva de calibración. El equipo fue operado con aire seco a 82.80 kPa, acetileno a 483 kPa usando una flama de 422 nm, con una lámpara a 10 mA y un ancho de onda de 0.7 nm.

7.3.8 Análisis reológico

En este análisis se utilizaron dispersiones de xiloglucano en concentraciones 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 % (m/m), se utilizó un reómetro (Anton Paar, modelo MCR 102. St. Albans, UK) con cilindros concéntricos a 25 °C. que se programó en las siguientes condiciones: la temperatura inicial del sistema se ajustó a 25 °C y se mantuvo durante la prueba. Todas las pruebas se realizaron por triplicado, con agitación a una velocidad de 0 a 50 rad/s.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

7.3.9 Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Las muestras de xiloglucano obtenido por método de remojo y tostado fueron caracterizadas por FTIR, empleando un espectrofotómetro (Perkin Elmer, Spectrum Two con ATR (Reflectancia Total Atenuada). Las transmitancias fueron grabadas a frecuencias de onda entre 400 y 4000 cm^{-1} (García- Salcedo *et al*., 2018).

7.4 Caracterización de las proteínas de lactosuero

7.4.1 Determinación de pH

Esta determinación se realizó con un potenciómetro calibrado y soluciones buffer estándar: solución reguladora de biftalato con pH de 4, solución de fosfato con pH de 7 y solución de borato con pH de 10 y acorde con el método de Martino *et al.*, (2016).

7.4.2 Análisis químico proximal

Este análisis se realizó como se indica en el numeral 7.3.5.

7.4.4 Contenido de calcio

Esta determinación se realizó como se indica en el numeral 3.7.7.

7.5 Desarrollo del coacervado proteínas de lactosuero-xiloglucano por coacervación compleja

Los coacervados se obtuvieron mediante el método reportado por González-Martínez (2017), con algunas modificaciones: en todas las mezclas se utilizó la proporción 2:1 lactosuero/ xiloglucano, y agitación constante a 100 rpm; a) la dispersión de lactosuero se ajustó a pH 2 con solución de HCl (0.1 M) y la dispersión de xiloglucano (0.0625% m/m) se ajustó a pH 13 con solución NaOH (0.1 M), se mezclaron y posteriormente se ajustó a pH 2. b) la dispersión de lactosuero a pH 2 se mezcló con la dispersión de xiloglucano (0.0625% m/m) a pH 13. c) las dispersiones de lactosuero (0.1 % m/m) y xiloglucano (0.0625% m/m) se ajustaron ambas a pH 2 y posteriormente se mezclaron.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

7.6 Caracterización del coacervado de proteína de lactosuero-xiloglucano

7.6.1 Contenido de calcio.

La determinación se realizó como se indica en el numeral 7.3.7.

7.6.2 Determinación del tamaño de partículas en dispersión

La distribución de tamaño desde nanómetros hasta milímetros y la polidispersidad de los encapsulados y los biopolímeros individuales, se determinaron por la técnica de difracción laser (a partir de la variación angular de la intensidad de la luz a través de la muestra) en celda para muestras en dispersión líquida (Litesizer500 Anton Paar, Austria). Posteriormente, se analizarán los datos de la intensidad de la dispersión angular para calcular el tamaño de las partículas responsables de crear el patrón de dispersión, mediante la teoría de Mie de la dispersión de la luz (Martino *et al.*, 2016)

7.4.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de los coacervados se analizó mediante imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido utilizando un microscopio (Jeol JSM 5600LV, Japón). Las muestras se fijaron en un porta-muestras de aluminio con cinta de carbono y se secaron en condiciones de punto crítico en un sistema de preparación Cryo-SEM (Quorum Technologies, Mod. PP30105, UK) operado con CO_2 líquido. Una vez que las muestras se fijaron, se cubrieron con un baño de oro para su observación.

7.6.4 Estabilidad cinética de agregación por Potencial Z

El potencial Z fue una medida de estabilidad de una partícula, en el cual se determinó el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circulante en la partícula para desnaturalizarla, en la dispersión coloidal de las muestras de coacervados y al término de su obtención. Este parámetro se evaluó en los biopolímeros independientes, así como en el coacervado, en distintos períodos de

Dirección General de Bibliotecas UAQ

tiempo: t=0; y en la semana 1, 2, 4 y 6. Se utilizó un analizador de potencial zeta un Litesizer500 Anton Paar, Austria (Martino *et al.*, 2016).

7.7 Evaluación de cinética de liberación de calcio

7.7.1 Método de diálisis

La proporción de calcio liberado del coacervado se determinó por disolución *in vitro,* utilizando bolsas elaboradas con membranas de diálisis (Spectra/Por® Dialysis, USA) con tamaño de poro de 50 KDa. Al interior de las membranas se colocan 5 mL de la solución con los coacervados, las cuales se colocarán en varillas de agitación insertando éstas dentro de vasos individuales de 900 mL de un disolutor (Disolutor VanKel, VK7000). La velocidad de agitación fue de 50 rpm. El medio de disolución de acuerdo a FEUM (2011) se utilizó a pH 2, 7 y 8.5 manteniendo una temperatura de 37°C ± 0.5°. El ensayo se realizó tomando alícuotas de 3 mL con reposición de medio de disolución. Las alícuotas se filtraron a través de membranas de 0. 45 µm y el Ca liberado se cuantificó por espectroscopía de absorción atómica (D'Souza, 2014).

7.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de la extracción del polisacárido (xiloglucano) de la semilla de *Tamarindus Indica* y la caracterización de las microesferas biopoliméricas, así como en los ensayos biológicos *in vitro* se llevó a cabo con un ANOVA de una sola vía utilizando la prueba de Tukey para detectar diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos, empleando el programa estadístico Minitab versión 18 (Minitab Statistical Software, Inc., Chicago, IL).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, el propósito de la investigación fue la utilización de dos biopolímeros ambos subproductos de la industria agroalimentaria. Dichos biopolímeros son el lactosuero que se obtiene durante la elaboración de queso; y las semillas de *Tamarindus indica* L. que se derivan del procesamiento de la fruta de tamarindo para la elaboración de dulces y jarabes. Estos dos biopolímeros se utilizaron para la obtención de un coacervado para que en un mediano y largo plazo puedan emplearse en el desarrollo de un suplemento de calcio que incremente la absorción de este mineral.

8.1 Rendimiento de extracción y eficiencia de separación

En la Figura 8 se presentan las gráficas del rendimiento de extracción y eficiencia de separación del xiloglucano extraído por método húmedo y tostado.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

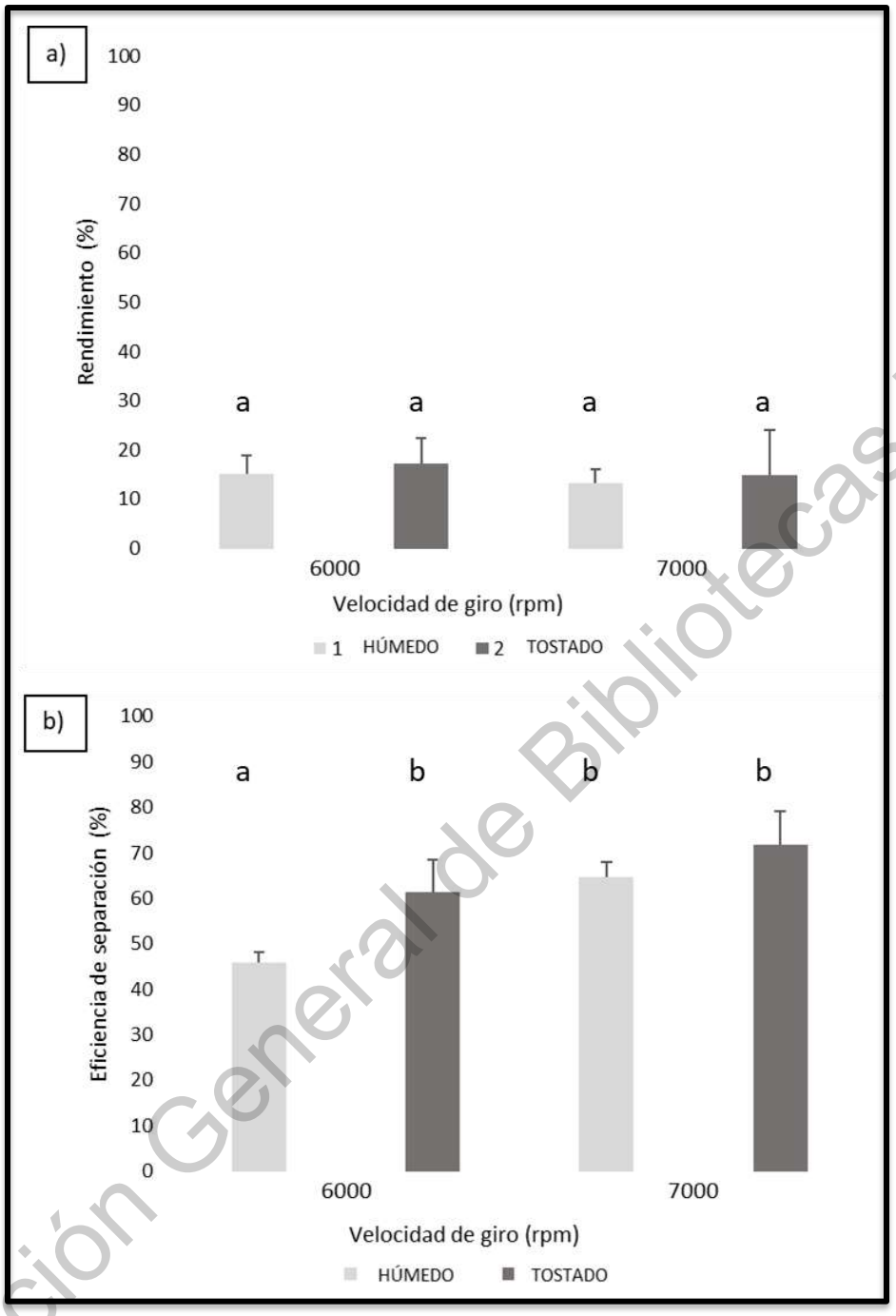


Figura 8. Rendimiento y eficiencia de separación de xiloglucano de semilla de *Tamarindus indica* L. a) Rendimiento, b) Eficiencia de separación. Los datos indican las medias ± DS (n=3), el análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey. Un valor de p≤0.05 fue considerado significativo. Letras diferentes en las barras indica diferencias estadísticamente significativas (p ≤ 0.05).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Se evaluaron las condiciones de extracción del xiloglucano y se realizó su caracterización para determinar que fuera viable su aplicación como agente encapsulante. Se observó que no se existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el método de descascarillado con respecto al rendimiento obtenido de xiloglucano. Sin embargo, se detectó un incremento de 1.6 % cuando la semilla de Tamarindus indica se sometió al método de tostado (14.9 ± 0.91 %) comparado con el método de descascarillado en húmedo o remojo (13.5 ± 0.56 %), estos resultados concuerdan con lo reportado por Nagajothi *et al.* (2017). Los valores de rendimiento se encontraron dentro del intervalo que menciona Sepúlveda *et al.* (2007) con un rendimiento de extracción de mucilago de *opuntia spp*. del 8 a 20 %. Si desea extraerse el polisacárido a nivel industrial, el rendimiento es una variable de gran importancia, para el escalamiento del proceso y diseño de equipos.

Por otro lado, la eficiencia de separación por método de tostado (71.73 ± 0.74 %) mostró diferencias significativas con respecto al método húmedo (64.77 ± 0.32 %), lo que se interpreta como un menor contenido de compuestos no deseados (lípidos, proteínas, cenizas, etc.) en el producto final. La pureza de un producto, refleja la calidad del mismo, además es un factor a considerar al preparar formulaciones que lo contengan y puede repercutir en el precio de venta. Por lo anterior, se sugiere el método de descascarillado por tostado y la centrifugación a 7000 rpm, ya que a estas condiciones se observó un mayor rendimiento y mayor eficiencia de separación.

8.2 Análisis químico proximal del xiloglucano extraído a partir de la semilla de *Tamarindus indica* L.

En la Tabla 4, se muestra la composición química del xiloglucano obtenido por método húmedo y tostado.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Tabla 4. Análisis químico proximal del xiloglucano extraído de la semilla de *Tamarindus indica* L. (g/100 g base seca)

	Método húmedo	Método tostado
Proteína	3.94 ± 0.01^{a}	3.86 ± 0.005^{a}
Lípidos	0.69 ± 0.01^{a}	0.26 ± 0.01^{b}
Cenizas	0.47 ± 0.015^{a}	0.70 ± 0.015^{b}
Fibra	1.26 ± 0.08^{a}	1.17 ± 0.02^{b}
Carbohidratos	93.6 ± 0.09^{a}	93.95 ± 0.07^{b}

Los datos representan la media ± DS (n=3), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey. Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).

Para determinar si el proceso de extracción repercutía en la composición del xiloglucano, se realizó el análisis químico proximal. El contenido de humedad varió desde 10.5 hasta 11.9% como lo reporta Khounvilay y Sittikijyothin (2012), siendo 1.41 % mayor en el caso de la semilla tratada por el método húmedo. Se puede observar que, entre ambos métodos, no existen diferencias significativas en el contenido de proteínas; sin embargo, el contenido de fibra y lípidos fue significativamente mayor en el caso del método húmedo. Esta diferencia puede deberse a la degradación de los ácidos grasos contenidos en la semilla de tamarindo durante el tostado (Soria, 2017). Por otra parte, el contenido de cenizas y carbohidratos fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) en el xiloglucano obtenido por el método de tostado. Esto se debe a que, en el método húmedo, pudieron solubilizarse algunos de los polisacáridos solubles en el agua de remojo y como resultado de un fenómeno de lixiviación (Rodríguez y Curbelo, 2012); lo que se refleja también en un menor rendimiento durante la extracción.

De acuerdo con otros autores, el contenido de proteínas fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) al 9 % reportado por Crispín-Isidro *et al.* (2019), el contenido de lípidos difiere significativamente ($p \leq 0.05$) al valor reportado de 4.96 % por Alpizar-Reyes *et al.* (2017). Además, los resultados muestran que el contenido de carbohidratos fue significativamente mayor que el 80.25% reportado por González-

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Martínez *et al.* (2017), 80.66 % por Khounvilay and Sittikijyothin (2012), 85.74 % por Chandra-Mohan *et al.* (2018) y 89.56 % por Crispín-Isidro *et al.* (2019). De acuerdo con lo anterior, el método de extracción por centrifugación permite la remoción de impurezas o compuestos no deseados (proteínas, lípidos y cenizas), lo que se ve reflejado en el incremento en la eficiencia de separación, la cual es la variable que se relaciona directamente con la composición del xiloglucano.

8.3 Características fisicoquímicas del xiloglucano extraído por el método de remojo y tostado

8.3.1 Colorimetría

En la Figura 9, se presentan las fotografías del xiloglucano obtenido por método húmedo y tostado.

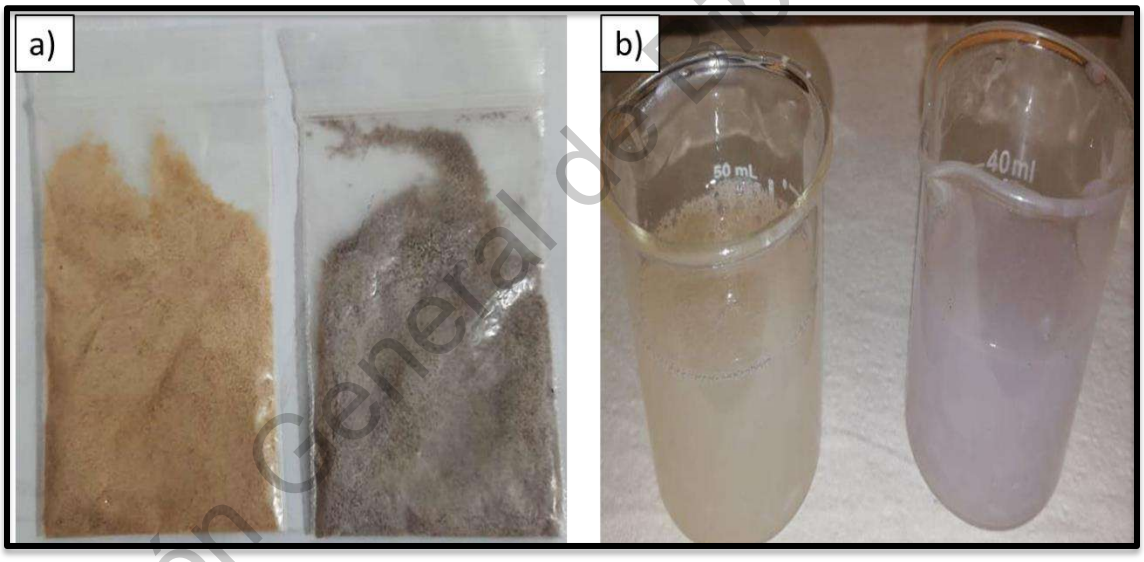


Figura 9. Fotografías del xiloglucano extraído de las semillas de *Tamarindus indica* L. a) Muestra en polvo, b) muestra en dispersión. Las imágenes del lado izquierdo de cada fotografía corresponden al xiloglucano extraído con el método de remojo (húmedo) y las imágenes del lado derecho en cada fotografía corresponden al xiloglucano extraído con el método de tostado.

Los datos de color mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los productos obtenidos por ambos métodos. El xiloglucano extraído por método húmedo mostró color ámbar y sus coordenadas fueron L= 96.66, a= - 0.2 y b= +1.88, mientras que el xiloglucano extraído por método tostado mostró color violeta cuyas coordenadas

Dirección General de Bibliotecas UAQ

fueron L= 92.34, a= +2.28 y b= +10.96. Las diferencias en el color se atribuyen al tratamiento térmico al que se sometió la semilla de tamarindo. Para los objetivos de este trabajo, el color no afecta su aplicación como agente encapsulante, ya que tiene mayor relevancia la capacidad de incrementar la viscosidad. No obstante, el color del xiloglucano adquiere importancia para su utilización como espesante de alimentos y bebidas sin colorantes, o bien para el desarrollo de fármacos como tabletas o soluciones oftálmicas (Dilbaghi *et al.*, 2013).

8.3.2 Espectroscopía de infrarroja por FTIR

La Figura 10 muestra los espectros infrarrojos del xiloglucano obtenido por el método propuesto por Khounvilay y Sittikijyothin (2012) y el xiloglucano extraído por los métodos húmedo y tostado.

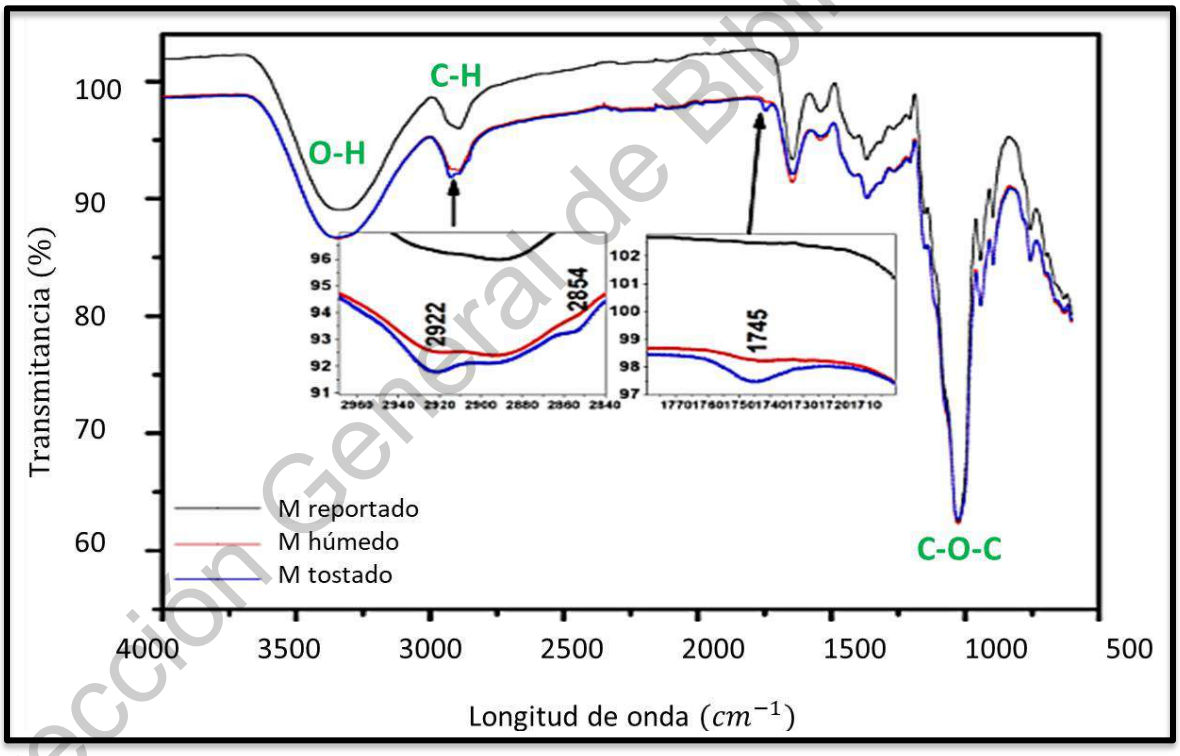


Figura 10. FTIR-ATR de xiloglucano en polvo extraído de semilla de tamarindo. Método húmedo (rojo), método por tostado (azul), y el método reportado por Khounvilay y Sittikijyothin en 2012 (negro).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Entre las muestras obtenidas por ambos métodos, prácticamente no se observaron diferencias en el espectro infrarrojo, sin embargo, se visualizan dos bandas más intensas en el xiloglucano obtenido por método de tostado a 2922 cm^{-1}, la cual se puede atribuir principalmente al enlace C-OH de una cadena de carbohidratos, la otra banda a 1745 cm^{-1} la cual representa el enlace de una amida I, perteneciente a la cadena de proteína. El espectro de las tres muestras mostró una fuerte banda de estiramiento C-O-C a 1030 cm^{-1}, representativo del enlace glucosídico en la cadena del polisacárido y banda a 2922 cm^{-1} indica el estiramiento del enlace C-H, (Daoub *et al.*, 2016). También se observó una banda ancha a 3300 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de contracción de los grupos hidroxilo, la banda más representativa de un polisacárido, y de acuerdo con el contenido de proteínas se infiere una superposición de vibraciones de estiramiento N-H, que no se distingue de la banda característica del enlace O-H. La presencia de estas bandas concuerda con lo reportado por Alpizar-Reyes *et al.* (2017), González- Martínez *et al.* (2017) y Crispín-Isidro *et al.* (2019). El espectro mostró las bandas características de la estructura del polisacárido que contiene la semilla de *Tamarindus indica* L.

8.4 Morfología del xiloglucano extraído de la semilla de *T. indica* L. en dispersión

En la Figura 11 se muestra la morfología del xiloglucano obtenido por los métodos húmedo y tostado; y la comparación con el xiloglucano obtenido por el método propuesto por Khounvilay y Sittikijyothin, (2012).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

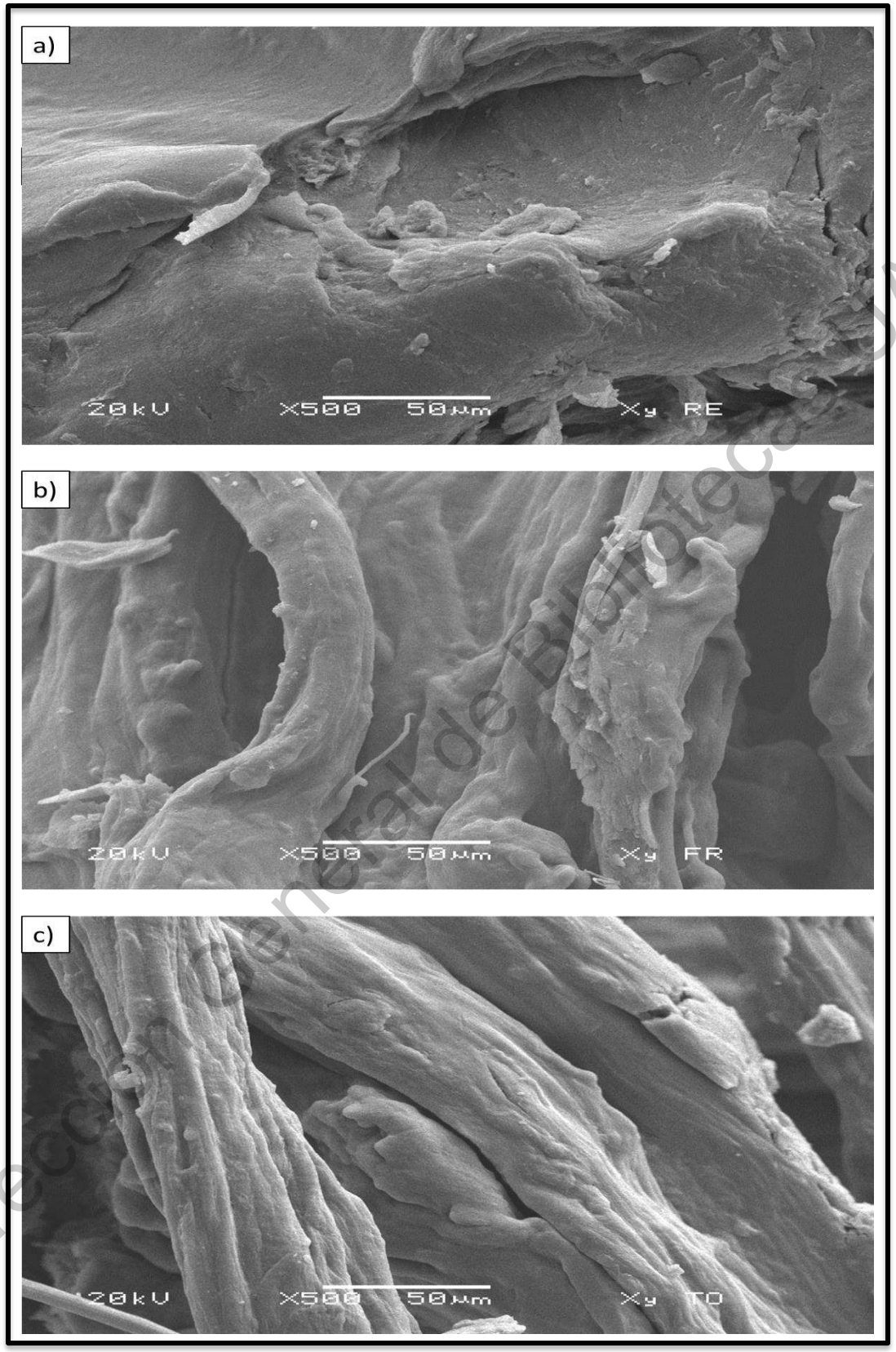


Figura 11. Morfología de xiloglucano extraído de semilla de la semilla de *T. indica* L.: a) método reportado por Khounvilay y Sittikijyothin, (2012)., b) método húmedo, c) método de tostado. Las micrografías se obtuvieron a 500X.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

La estructura en los tres casos está formada por largas fibras del polisacárido. Sin embargo, entre el xiloglucano extraído por método húmedo y por tostado no se observan diferencias. Por otro lado, en el xiloglucano obtenido por el método reportado por Khounvilay y Sittikijyothin (2012), no se observaron diferencias con respecto a los métodos propuestos en este trabajo. Para demostrar que el proceso de extracción por método húmedo o tostado, permite la obtención de un producto con mayor pureza, se recomienda analizar la composición química del xiloglucano.

8.5 Comportamiento viscoelástico del xiloglucano extraído de la semilla de *T. indica* L. por el método de remojo y tostado

En la Figura 12, se presenta el perfil reológico del xiloglucano obtenido por los métodos de remojo y tostado.

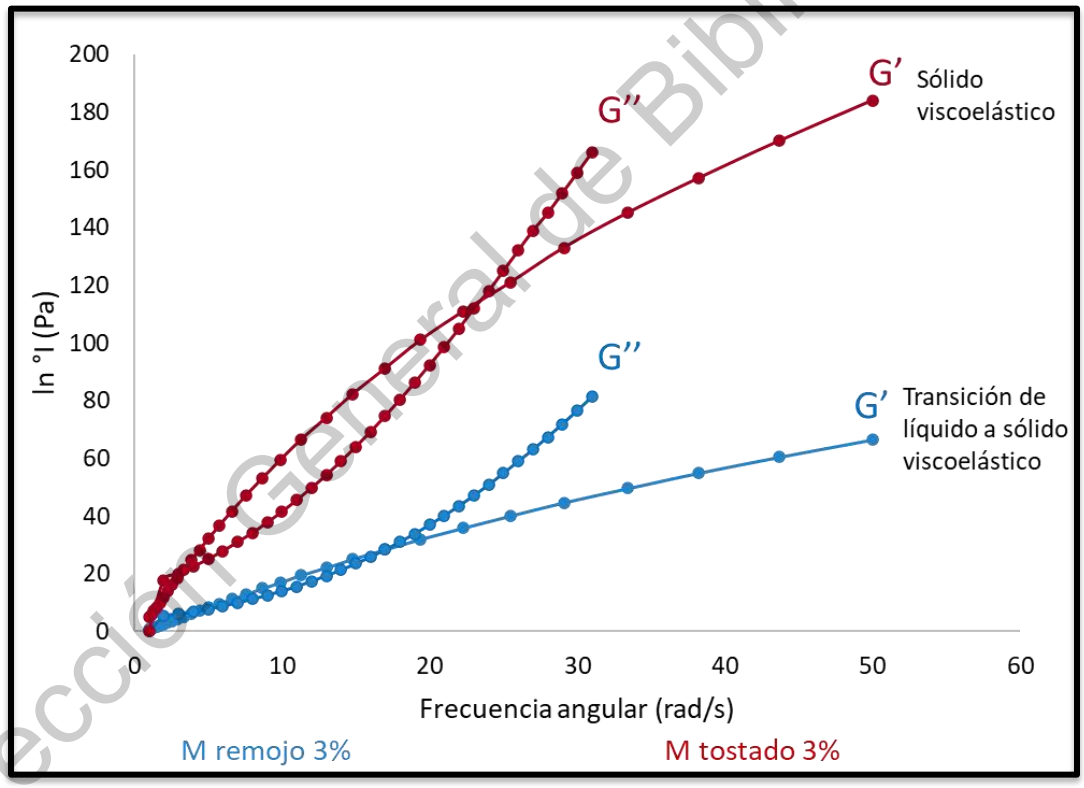


Figura 12. Perfil reológico de dispersiones de xiloglucano extraído de semillas de tamarindo a 25°C. Concentración 3% (m/m). Método remojo (azul), método de tostado (rojo). Los datos representan la media ± DS (n=3).

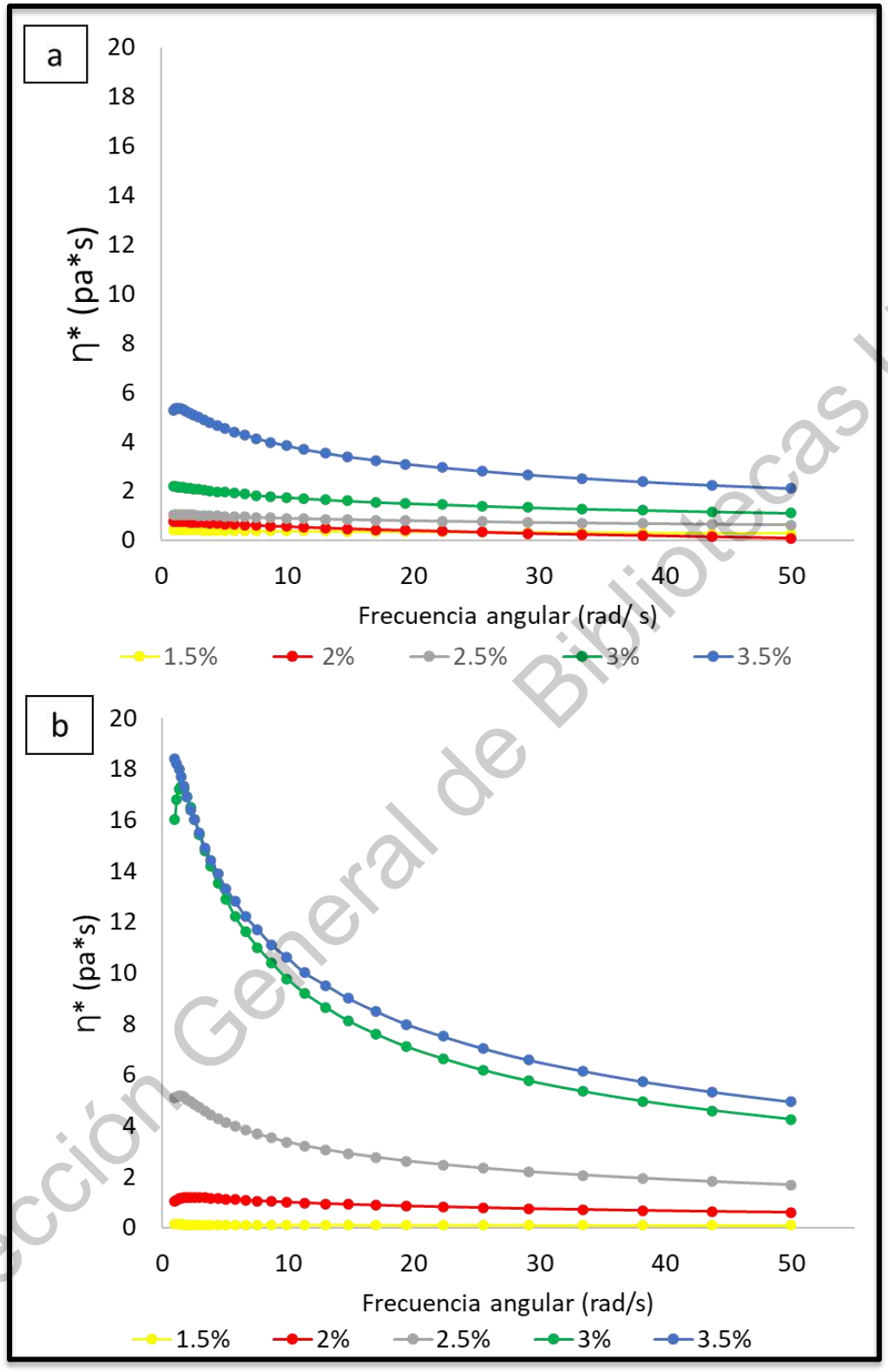
Las dispersiones de xiloglucano presentan el comportamiento de un fluido no-newtoniano a bajas concentraciones (< 0.5 % m/m), y la viscosidad se reduce

Dirección General de Bibliotecas UAQ

cuando dichas dispersiones se exponen a un incremento de temperatura o fuerzas de cizallamiento. Sin embargo, para determinar si el material tenía un comportamiento viscoelástico se realizaron pruebas dinámicas o ensayos oscilatorios. En estas pruebas se somete la muestra a un movimiento con geometrías específicas que aplican ligeros esfuerzos para no exceder el intervalo de viscoelasticidad lineal (González *et al*., 2015). En materiales elásticos parte del esfuerzo es almacenado para recuperar la forma original (módulo G'); sin embargo, en materiales con viscosidades altas el esfuerzo se disipa como pérdida por fricción (módulo G").

Se muestra en la Figura 13 los perfiles de viscosidad compleja (η *) de dispersiones de xiloglucano a diferentes concentraciones.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



Dirección General de Bibliotecas UAQ

Figura 13. Viscosidad compleja de dispersiones de xiloglucano extraído de semillas de tamarindo a 25°C. muestra a) método húmedo b) método de tostado. Los datos representan la media ± DS (n=3).

Se observó un incrementó de la viscosidad compleja (η^*) de manera lineal en función de la concentración de xiloglucano, independiente del tipo de descascarillado; aunque en el caso de las dispersiones de xiloglucano obtenido por el método de remojo, la viscosidad máxima fue de 6 Pa·s. Con respecto a las dispersiones de xiloglucano obtenido por el método de tostado, la viscosidad compleja máxima alcanzada fue de 19 Pa·s. Este parámetro se interpreta como la resistencia total a fluir que presenta un fluido viscoso (Mota e Ibarz, 2006). Con base en lo anterior, se afirma que la muestra tratada por el método de tostado tiene la capacidad de incrementar la viscosidad hasta 3 veces más que el xiloglucano obtenido por método húmedo, ambas a la concentración de 3.5% (m/m).

Esto se relaciona de manera directa con el contenido de carbohidratos, ya que, a mayor cantidad de estos aumenta la capacidad de retención de agua, en consecuencia, se desarrolla mayor viscosidad en las dispersiones de xiloglucano obtenido por método de tostado, ya que es un polisacárido con excelentes propiedades mecánicas y alta estabilidad térmica de acuerdo con Bhattacharya, *et al*., (1994b). La estabilidad del polisacárido de la semilla de tamarindo ante el calor, medios ácidos y básicos, pueden atribuirse a su alto grado de sustitución del esqueleto, disminuyendo su capacidad de ser hidrolizado (Phani Kumar *et al.*, 2011). . Una de las ventajas de que el polisacárido desarrolle una mayor viscosidad en un sistema acuoso está relacionado con un mayor rendimiento, ya que de este modo se requiere de menor cantidad de hidrocoloide para desarrollar una viscosidad alta. Lo anterior aunado a la versatilidad de sus aplicaciones como espesante, estabilizante y agente gelificante, tanto en la industria alimenticia como farmacéutica (Pardeshi *et al*., 2018).

8.6 Caracterización del lactosuero y xiloglucano empleados para el desarrollo de las microesferas

Los resultados de la caracterización del xiloglucano extraídos por los métodos de remojo (húmedo) y de tostado permitieron elegir el método de extracción de xiloglucano más adecuado para la aplicación de interés, siendo el tratamiento de descascarillado por tostado el que mostró mayor rendimiento y eficiencia de

Dirección General de Bibliotecas UAQ

separación. De manera adicional, se pudo detectar que éste último método de separación permitió obtener un producto (xiloglucano) con mayor contenido de carbohidratos totales y con mejor capacidad como agente espesante (mayor viscosidad). Así mismo, se decidió utilizar el xiloglucano y lactosuero tamizado en la malla 120 y malla 140 de la serie USA, respectivamente, ya que estos granulados facilitaron la dispersión de los biopolímeros (Clayton y Mollner, 2019).

8.6.1 pH de las dispersiones de lactosuero y xiloglucano

Uno de los parámetros importantes para llevar a cabo el proceso de coacervación compleja, es el pH, ya que modificando las condiciones del sistema se puede favorecer la interacción electrostática entre las cadenas poliméricas (Thongkaew *et al.,* 2015). En la Figura 14, se presenta la gráfica de pH de las dispersiones (sin modificar pH) en función al tiempo.

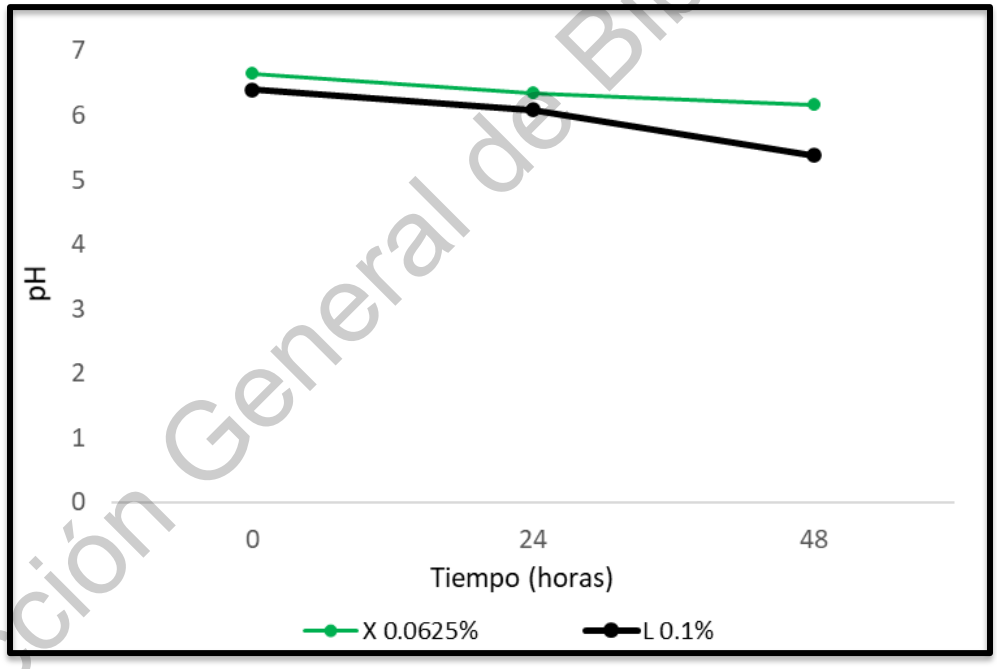


Figura 14. Gráfica de pH del lactosuero y xiloglucano. La determinación se realizó en los biopolímeros en dispersión a 25 °C, en el tiempo de estabilización: 0, 24 y 48 h. Los datos representan la media ± DS (n=3)

En la dispersión de lactosuero al 0.1% se observó un pH 6.4 ± 0.04 al tiempo 0, lo cual indica que pertenece a la clasificación de lactosuero dulce (obtenido mediante acción enzimática) de acuerdo con Parra (2009). El xiloglucano al 0.0625% presentó un valor de 6.9 ± 0.028, al tiempo 0.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Se observa que el pH de ambos biopolímeros individuales disminuyó con respecto al tiempo, lo que puede atribuirse a la fermentación de los biopolímeros por microorganismos, ya que los productos de dicha fermentación son ácido láctico y dióxido de carbono (Parra, 2010b), que pueden ser responsables de la disminución del pH del sistema. Posterior a la evaluación inicial a 25 °C, se decidió mantener las muestras a 4 °C con la finalidad de evitar la descomposición de las mismas.

8.6.2 Estabilidad cinética de agregación por potencial ζ

Para la formación del coacervado fue necesario conocer el potencial ζ de los biopolímeros, a fin de asegurar el carácter catiónico de la proteína y el carácter aniónico del polisacárido. Para ello, se elaboró una curva de potencial ζ de los biopolímeros individuales en función al pH, en un intervalo de 2-13, que se muestra en la Figura 15.

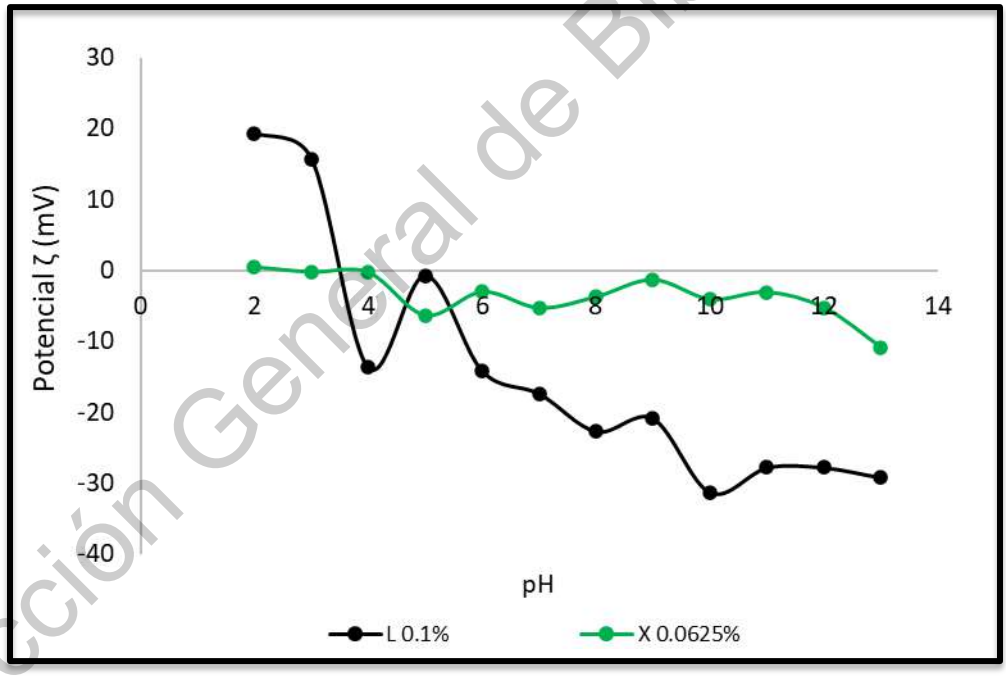


Figura 15. Curva de potencial ζ del lactosuero (negro) y xiloglucano (verde). La determinación se realizó en los biopolímeros en dispersión a 25°C. Los datos representan la media ± DS (n=3).

El potencial ζ del lactosuero al 0.1% (m/m) es positivo a pH de 2 y 3 y con un valor máximo de 21.39 ± 0.40 mV, las cargas catiónicas se atribuyen a aminoácidos como la lisina e histidina. El punto isoeléctrico, es decir, el punto en el cual la proteína tiene una carga neta igual a 0 se encuentra a pH 5.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Esta información es aproximada a lo reportado por Ricaurte *et al*., (2017) quienes reportan un punto isoeléctrico de 5.2 para lactosuero dulce. De acuerdo con la Figura 16, el lactosuero a pH >5 exhibe valores negativos, alcanzando a pH de 10 el valor máximo negativo – 28. 96 ± 1.74 mV. En el caso del xiloglucano a 0.0625% (m/m), el potencial ζ es negativo a pH> 3, cuyo valor máximo se alcanzó a pH 13 (-13.34 ± 0.79 mV).

Las cargas aniónicas para este biopolímero se atribuyen a los grupos hidroxilo de la cadena del polisacárido. A pH cercano a 3 el xiloglucano exhibió una carga cercana a la neutralidad, cuyo valor es positivo (0.182 ± 0.21 mV) a pH 2. De acuerdo con estos resultados, se eligió llevar el lactosuero a pH 2 y el xiloglucano a pH 13, de esta manera las cadenas poliméricas tienen las cargas electrostáticas que favorecen la interacción de ambos biopolímeros. Para ambos biopolímeros, los cambios en la carga superficial se deben al incremento de iones o hidroxilos dados por el medio de acuerdo a la acidificación del mismo o la agregación del hidróxido de sodio.

8.6.3 Tamaño de partícula de los biopolímeros en dispersión

El tamaño de partícula de cada uno de los biopolímeros se detectó en la escala nanométrica, como se observa en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de los biopolímeros en dispersión

Muestra	Concentración (%m/m)	pH	Potencial ζ (mV)	Tamaño de partícula (nm)	Polidispersidad
X 0.0625%	Xiloglucano 0.0625 %	13	-13.34±0.79 ^{a}	566.93 ± 42.29 ^{a}	31.43 %
L 0.1 %	Lactosuero 0.1 %	2	21.39± 0.40 ^{b}	293.04 ± 13.24 ^{b}	27.86 %

Los datos representan la media ± DS (n=3), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

El diámetro de partícula del lactosuero en dispersión 0.1% (m/m) fue de 293.04 ± 13.24 nm. Sin embargo, a pH 4 incrementa el tamaño de partícula debido a la formación de agregados de las proteínas que alcanzan su punto isoeléctrico y se observa precipitado de color blanco. En contraste, el tamaño de partícula de la dispersión de xiloglucano 0.0625% (m/m) no presentó cambios con respecto a la variación de pH, el diámetro de partícula promedio fue de 566.92 ± 42.29 nm.

8.7 Desarrollo de las microesferas

Una vez caracterizados los biopolímeros de manera independiente, se decidió realizar el proceso de coacervación compleja con la dispersión de lactosuero 0.1% (m/m) a pH 2, y la dispersión de xiloglucano 0.0625% (m/m) a pH 13, con el propósito de favorecer la interacción electrostática de las cadenas biopoliméricas. Las diferentes formulaciones para el coacervado fueron etiquetadas como 1, 2, y 3, como se observa en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos del coacervado

Muestra	Descripción	pH	Potencial ζ (mV)	Tamaño de partícula (nm)	Polidispersidad
C1	Mezcla (L/X 2:1) acidificada a pH 2	2	12.92± 0.47 ^{a}	318.23 ± 34.97 ^{a}	25.3 %
C2	Mezcla (L/X 2:1) sin acidificar	9.5	-24.28±0.84 ^{b}	318.31 ± 21.65 ^{a}	27 %
C3	Mezcla (L/X 2:1) biopolímeros acidificados a pH 2	2	13.49± 0.39 ^{a}	289.41 ± 20.21 ^{a}	24.63 %

Los datos representan la media ± DS (n=3), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8.8 Caracterización del coacervado

A fin de confirmar la formación de las partículas esféricas se evaluó el potencial ζ y la morfología (Ye et al., 2006).

8.8.1 Estabilidad cinética de agregación por potencial ζ

A fin de confirmar la formación de las partículas esféricas se evaluó el potencial ζ y la morfología (Ye et al., 2006). De acuerdo con Hernández-Marín *et al*. (2013), las interacciones electrostáticas suelen ser la principal fuerza impulsora para la formación de un sistema proteína-polisacárido en medio acuosas, por lo que fue de gran importancia evaluar el potencial ζ de las muestras como parámetro indicador de la formación del coacervado. En las muestras C1 y C3 no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en cuanto a su potencial *ζ*. Por el contrario, la muestra para la obtención del coacervado 2 (C2) exhibió un potencial ζ negativo -24.28 ± 0.84 mV, esto es debido a que a pH 9.5 ambos biopolímeros tienen potencial negativo.

En la muestra C3, tanto la proteína como el polisacárido al momento de realizar la mezcla, exhiben un potencial *ζ* positivo a pH 2, por lo que dichas condiciones no favorecen la interacción electrostática entre ambas cadenas biopoliméricas. De acuerdo con estos resultados, la muestra C1 es la única que presenta características de la formación del coacervado. Sin embargo, para confirmar esto, fue necesario evaluar el tamaño de partícula y la morfología de las mismas (De Kruif y Weinbreck, 2005). En la Tabla 6, se muestran los parámetros obtenidos de la caracterización.

8.8.2 Tamaño de partícula del coacervado

Las muestras para la obtención de coacervados 1, 2 y 3 (C1, C2 y C3) tuvieron un tamaño de partícula en la escala nanométrica. No se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las muestras. Sin embargo, la muestra C3) presentó el menor diámetro de partícula, como se observa en la Tabla 6, con un tamaño semejante al lactosuero. Este parámetro de manera aislada, no permitió identificar la formación de la matriz esférica.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8.8.3 Morfología del coacervado

En la Figura 16 se presentan las micrografías del coacervado para la muestra C1.

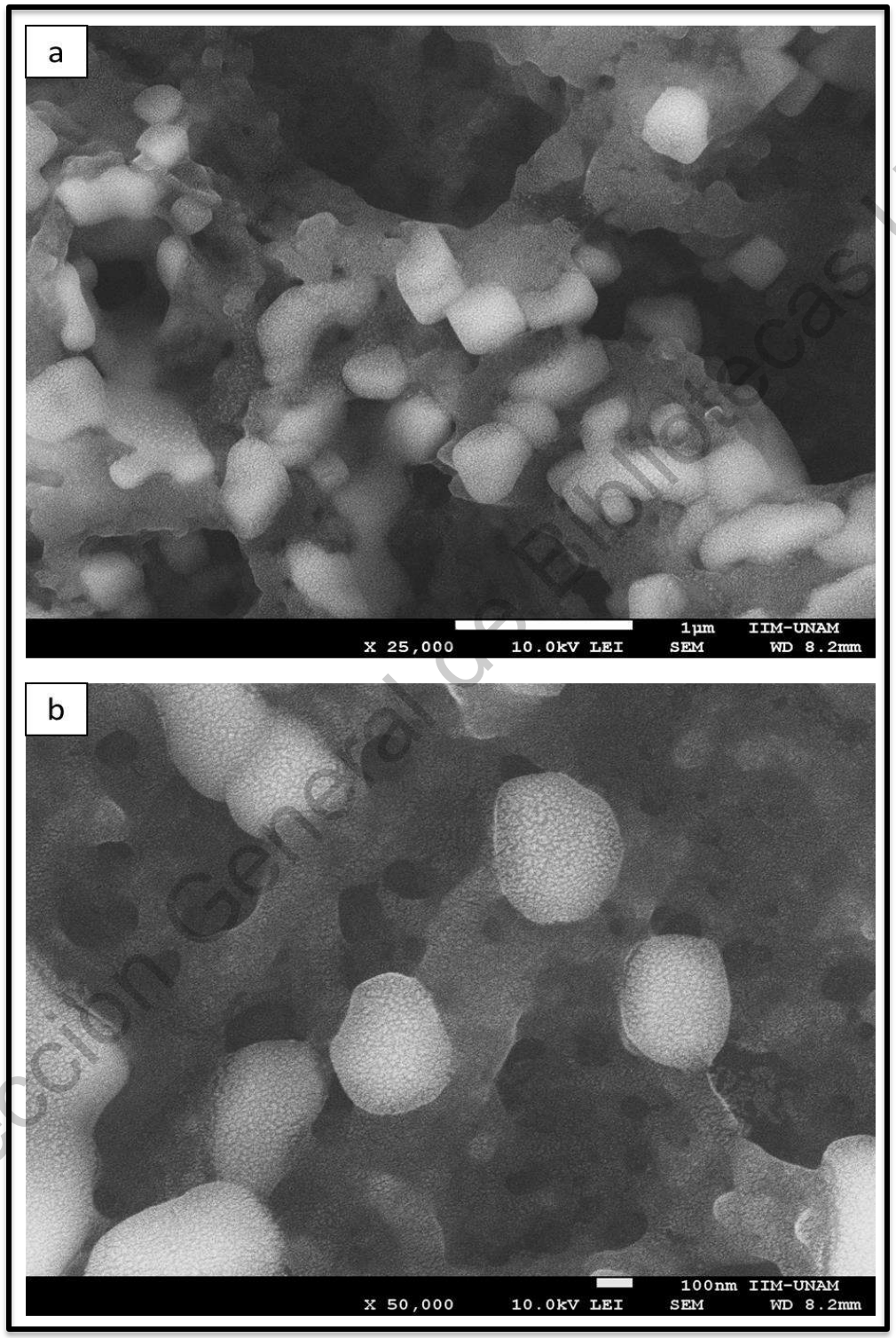


Figura 16. Morfología del coacervado para la muestra C1 a) Micrografía a 25000 x, b) Micrografía a 50000 x.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

La técnica de microscopía electrónica de barrido permitió confirmar la formación de las nanoesferas únicamente en la muestra C1, y el tamaño obtenido por la técnica de dispersión dinámica de la luz, con un diámetro promedio de 300 nm. En las micrografías que se presentan en las Figura 17 a) se visualiza la homogeneidad de las muestras (baja polidispersidad) a 25000 X, 17 b) la formación de la matriz esférica se confirma en las imágenes a 50000 X, de acuerdo a la forma redondeada que se observa.

8.8.4 Estabilidad del coacervado

La importancia de evaluar la estabilidad del sistema radica en encontrar si al paso del tiempo se observaban cambios estructurales o cambios en el potencial ζ que estarían indicando agregación de las partículas y/o sedimentación de las mismas. La muestra C1 presentó los mejores parámetros fisicoquímicos y fue seleccionada para realizar el estudio de estabilidad del coacervado en función del tiempo durante un periodo de 4 semanas, en donde se determinó el pH (ver Figura 17), tamaño de partícula (ver Figura 18) y el potencial ζ (ver Figura 19).

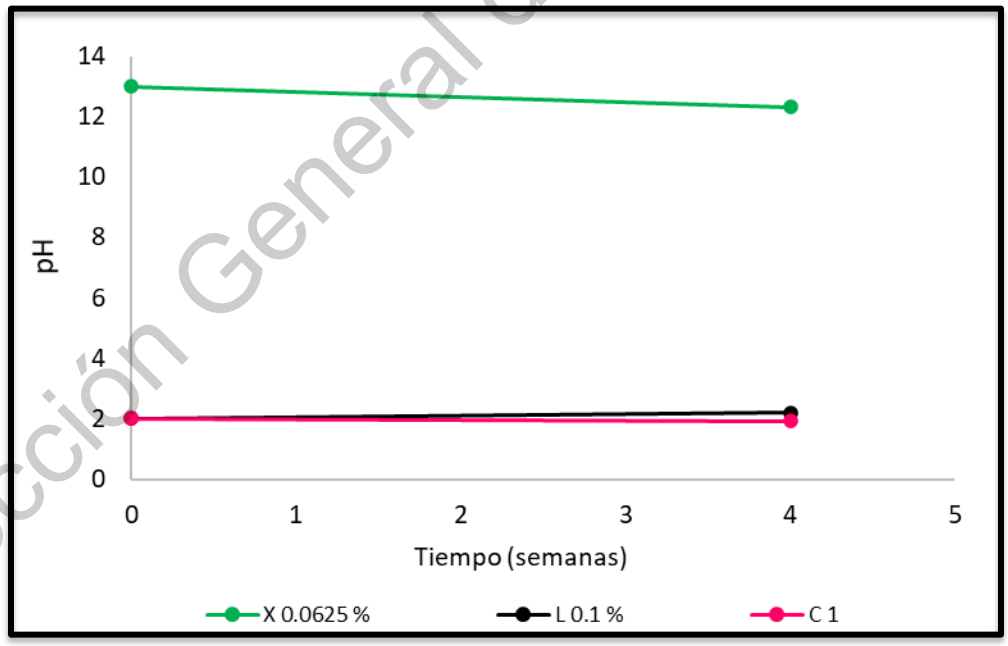


Figura 17. Valor de pH del xiloglucano (X), lactosuero (L) y coacervado (C1) en función del tiempo. La determinación se realizó en los biopolímeros en dispersión a 25°C. Los datos representan la media ± DS (n=3).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

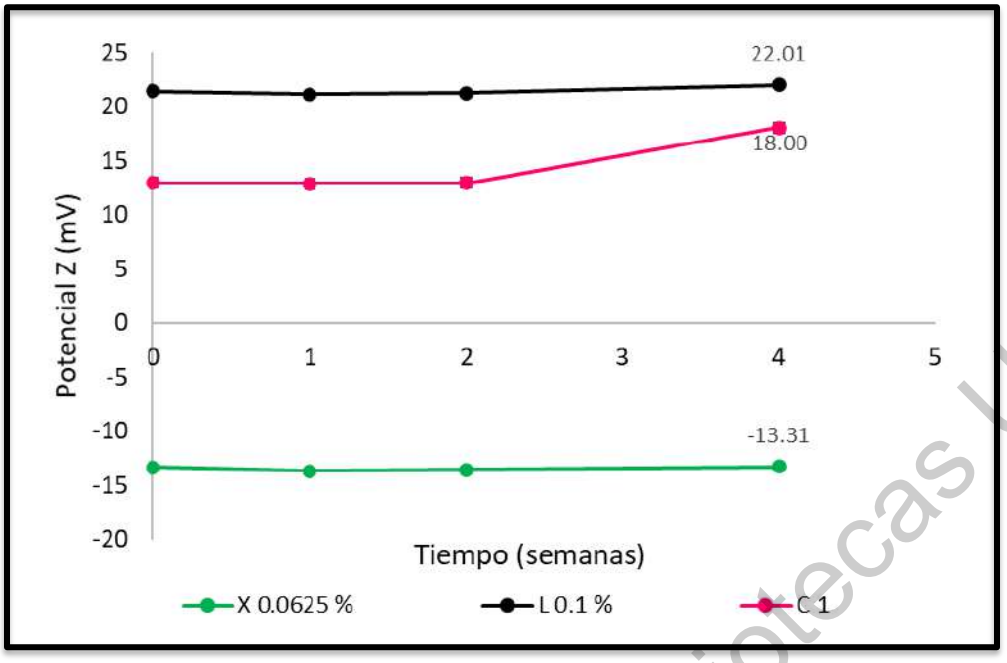


Figura 18. Valor del potencial ζ del xiloglucano (X), lactosuero (L) y coacervado (C1) en función del tiempo. La determinación se realizó en biopolímeros en dispersión a 25°C. Los datos representan la media ± DE (n=3).

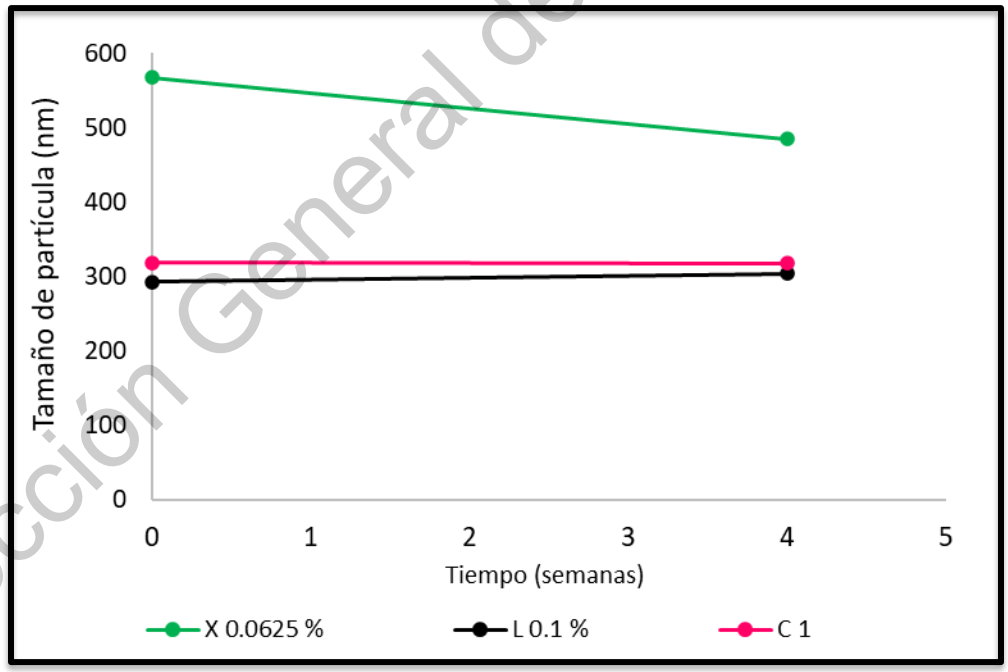


Figura 19. Tamaño de partícula del xiloglucano (X), lactosuero (L) y coacervado (C1) en función del tiempo.. La determinación se realizó en biopolímeros en dispersión a 25°C. Los datos representan la media ± DE (n=3).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

En la Figura 17, se observa que el pH de los biopolímeros y el coacervado se mantiene estable sin añadir soluciones amortiguadoras, ya que la variación de pH no fue significativa ($p \leq 0.05$). En las primeras dos semanas el valor del potencial ζ del coacervado se mantuvo estable, como se muestra en la Figura 18; sin embargo, el potencial ζ se incrementó significativamente en las semanas 3 y 4, lo que podría ser un indicador de agregación de las partículas, que en consecuencia modificó la estabilidad cinética del sistema (Batalla-Mayoral *et al.*, 2014). En contraste, las muestras de los biopolímeros de manera individual se mantuvieron estables con respecto al tiempo. El tamaño de partícula del C1 y el lactosuero 0.1% (m/m) mostró un incremento en la semana 4, aunque no se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$). con respecto al tamaño de partícula inicial de cada muestra. En el caso del xiloglucano al 0.0625% (m/m) se observó un decremento significativo en el diámetro de partícula, como se muestra en la Figura 19, esto pudo deberse a que la partícula alcanzó el grado máximo de hinchamiento y de ahí comenzó a disminuir el radio de hidratación. Con base en los resultados se determinó que la vida útil de las dispersiones y el coacervado es máximo de 2 semanas, lo cual resulta en un tiempo corto de vida útil, con la finalidad de asegurar que los parámetros fisicoquímicos no se modifiquen existen alternativas como la liofilización o el secado por aspersión de las nanoesferas (Ye, 2008).

8.9 Cinética de liberación de calcio a partir de nanoesferas de lactosuero-xiloglucano extraído de *Tamarindus indica* L.

El uso de polímeros en el área de los sistemas de liberación controlada de fármacos se encuentra en creciente desarrollo, buscando que estos sean sensibles a estímulos como pH, temperatura, concentración de iones, etc., con la posibilidad de que los tratamientos sean personalizados (Cho *et al*., 2008). Una forma de obtener este tipo de sistemas es incorporar el principio activo en una matriz de naturaleza polimérica que permita la difusión, o que libere el principio activo por la erosión de la matriz. Para modelar la cinética de liberación del compuesto de interés fue necesario determinar la concentración de calcio a partir del coacervado (ver Tabla 7) y se realizaron pruebas de liberación *in vitro*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8.9.1 Contenido de calcio

Se determinó el contenido de calcio en el lactosuero, xiloglucano y el coacervado, para determinar si se llevó a cabo la encapsulación del mineral dentro de la matriz biopolimérica. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Contenido de calcio en xiloglucano, lactosuero y coacervado

Muestra	Descripción	Calcio (mg/L)
C1	Mezcla (L/X 2:1) acidificada a pH 2	1.38 ± 0.11 ^{a}
X 0.0625 %	Xiloglucano 0.0625 %	0.04 ± 0.11 ^{b}
L 0.1 %	Lactosuero 0.1%	3.48 ± 0.11 ^{c}
Los datos representan la media ± DS (n=3), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).		

Se observó que la cantidad de calcio que contiene el coacervado fue significativamente menor al aportado por el lactosuero y el xiloglucano, esto pudo deberse a que durante la etapa de acidificación del lactosuero el calcio unido a las proteínas se liberó, quedando como calcio en forma iónica en la suspensión coloidal y posteriormente, durante el proceso de coacervación no se logró encapsular todo el calcio en las nanoesferas perdiéndose al momento de centrifugar las nanoesferas para separarlas del medio acuoso. Para favorecer el enriquecimiento de calcio en la matriz biopolimérica, algunos autores utilizan cloruro de calcio para modificar la fuerza iónica del sistema y en consecuencia reticular las paredes de la matriz esférica e incrementar la carga del ion en la misma (Aparecida y Barroso, 2016).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8.9.2 Perfil de liberación de calcio

Los medicamentos de acción modificada son aquellos cuya cinética de liberación del principio activo asumirá un perfil predeterminado: retardado, prolongado o sostenido; estos últimos deben permitir una concentración constante, dentro del intervalo terapéuticos del fármaco, por un periodo de tiempo determinado. Sistemas con estas características, se basan en la farmacocinética del principio activo, su propiedades farmacológicas y fisicoquímicas (Dash et al., 2010). Para determinar la cinética se realizan ensayos de disolución, que demuestren si la liberación del principio activo se realiza de acuerdo con lo previsto en su diseño.

A continuación, en la Figura 20, se observa el perfil de liberación de calcio del coacervado en medio ácido (pH 2), en la Figura 21 la liberación en medio neutro (pH 7) y en la Figura 22 el perfil de liberación en medio básico (pH 8.5).

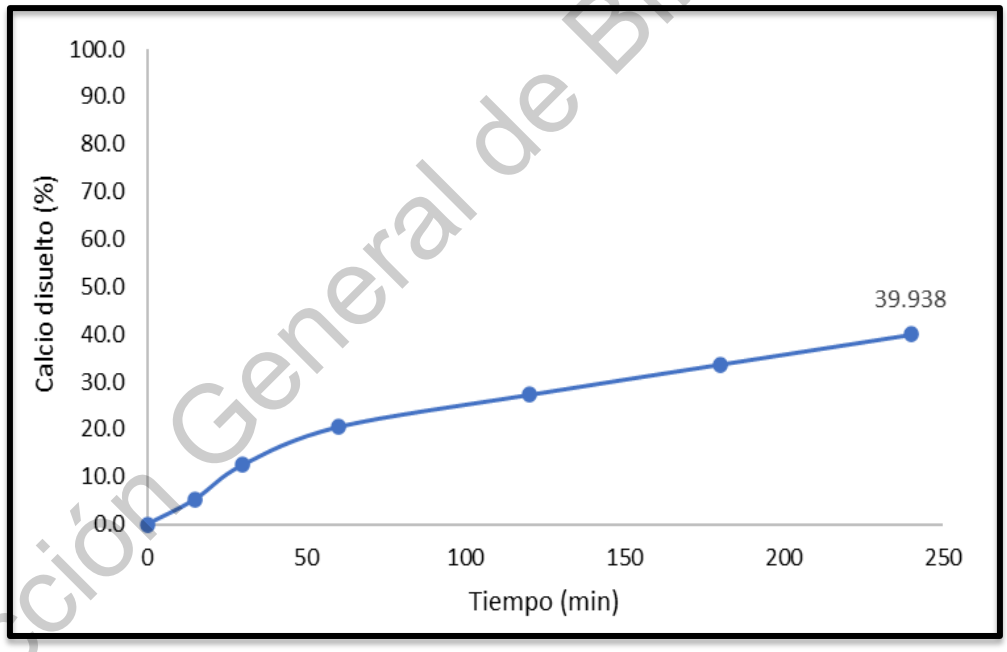


Figura 20. Perfil de liberación de calcio a pH 2.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

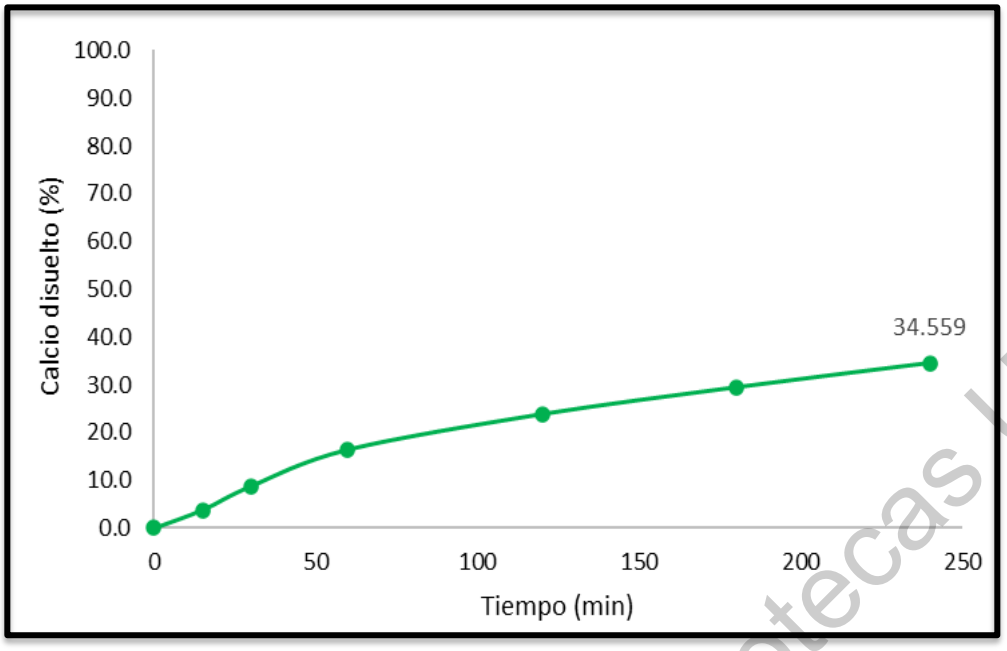


Figura 21. Perfil de liberación de calcio a pH 7.

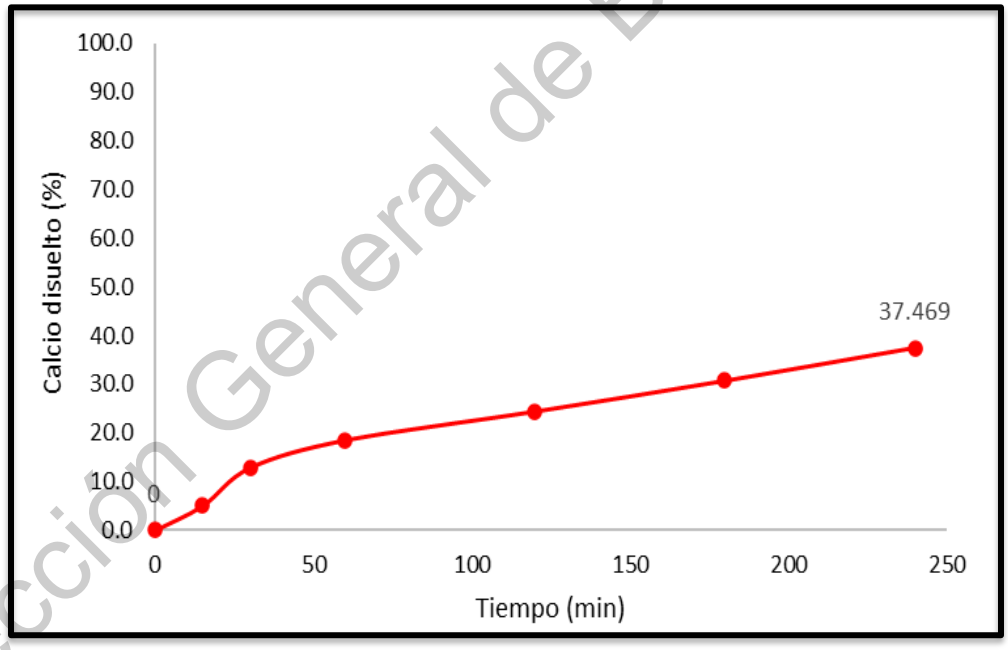


Figura 22. Perfil de liberación de calcio a pH 8.5.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

A pH 2 se observa una liberación constante del mineral hasta alcanzar 39.93 ± 7.33 %. A pH 7, se observa un comportamiento de liberación similar al perfil anterior, aunque fue más lenta en los primeros 60 min, en medio neutro se liberó el 34.55 ± 9.21 %. A pH 8.5 la gráfica presenta una liberación constante del mineral hasta alcanzar 37.46 ± 6.86 %. No se encontraron diferencias significativas en el calcio liberado promedio hasta las 4 horas.

En la Figura 23, se muestra la comparación de los perfiles de liberación en diferentes medios de disolución.

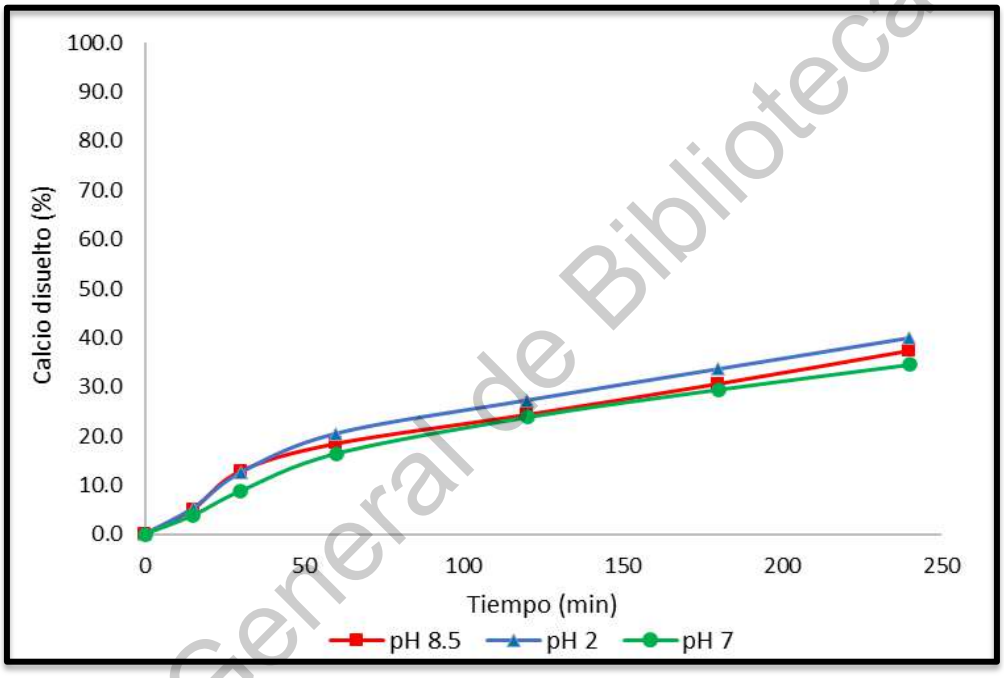


Figura 23. Gráfica comparativa de perfil de liberación de calcio en diferentes medios de disolución.

Se observó que en medio ácido se favorece la liberación. A pH básico la liberación fue muy similar al perfil anterior. Por el contrario, en el medio con pH neutro, la liberación es más lenta hasta los 60 min y se liberó la menor cantidad de calcio comparado con el resto de las muestras. Lo cual indica que el perfil de liberación del calcio es independiente del pH del medio.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8.9.3 Ajuste del perfil de liberación a un modelo matemático

Debido a la composición de las nanopartículas, se asume que la liberación del calcio se dió por difusión a través de la matriz polimérica hinchada hacia el exterior (Saéz *et al.*, 2004). Para comprobar esto, se modeló matemáticamente la cinética de liberación, utilizando 5 ecuaciones diferentes.

La cinética de orden cero define un proceso de liberación constante permitiendo que las concentraciones plasmáticas de fármaco también constantes. La cinética de primer orden es aquel en el que la tasa de liberación es directamente proporcional a la concentración del fármaco. El modelo de Higuchi plantea que la liberación se da por difusión constante del compuesto de interés a través de poros existentes en la matriz. En el caso del modelo de Korsmeyer- Peppas, permite conocer el tipo de difusión que se lleva a cabo (siguiendo la Ley de Fick, No Fickiana o por transporte). El modelo de Hixson-Crowell describe la liberación de los sistemas donde hay un cambio en el área y diámetro de la matriz, el cual es proporcional a la raíz cúbica de su volumen (Thakkar *et al*., 2009).

En la Tabla 8. Se presentan los valores de la constante de disolución (k) y el valor de correlación al modelo.

Tabla 8. Bondad de ajuste a los modelos de cinética de liberación de calcio

	Modelo									
	Orden 0		**Primer orden**		**Higuchi**		**Korsmeyer-Peppas**		**Hixson-Crowell**	
Muestra	**K**	**r²**	**k**	**r²**	**k**	**r²**	**k**	**r²**	**k**	**r²**
pH 2	0.1565	0.9296	-0.0009	0.9603	2.6687	0.9871	-0.4739	0.6964	0.0102	0.6151
pH 7	0.1408	0.9462	-0.0008	0.9681	2.3739	0.9828	-0.4779	0.6136	0.0101	0.6563
pH 8.5	0.1435	0.9325	-0.0008	0.9603	2.4424	0.9864	-0.482	0.6877	0.0098	0.6058

K: constante de velocidad de liberación
r²: factor de correlación al modelo matemático

Dirección General de Bibliotecas UAQ

La Figura 24 muestra la gráfica comparativa del ajuste al modelo de Higuchi

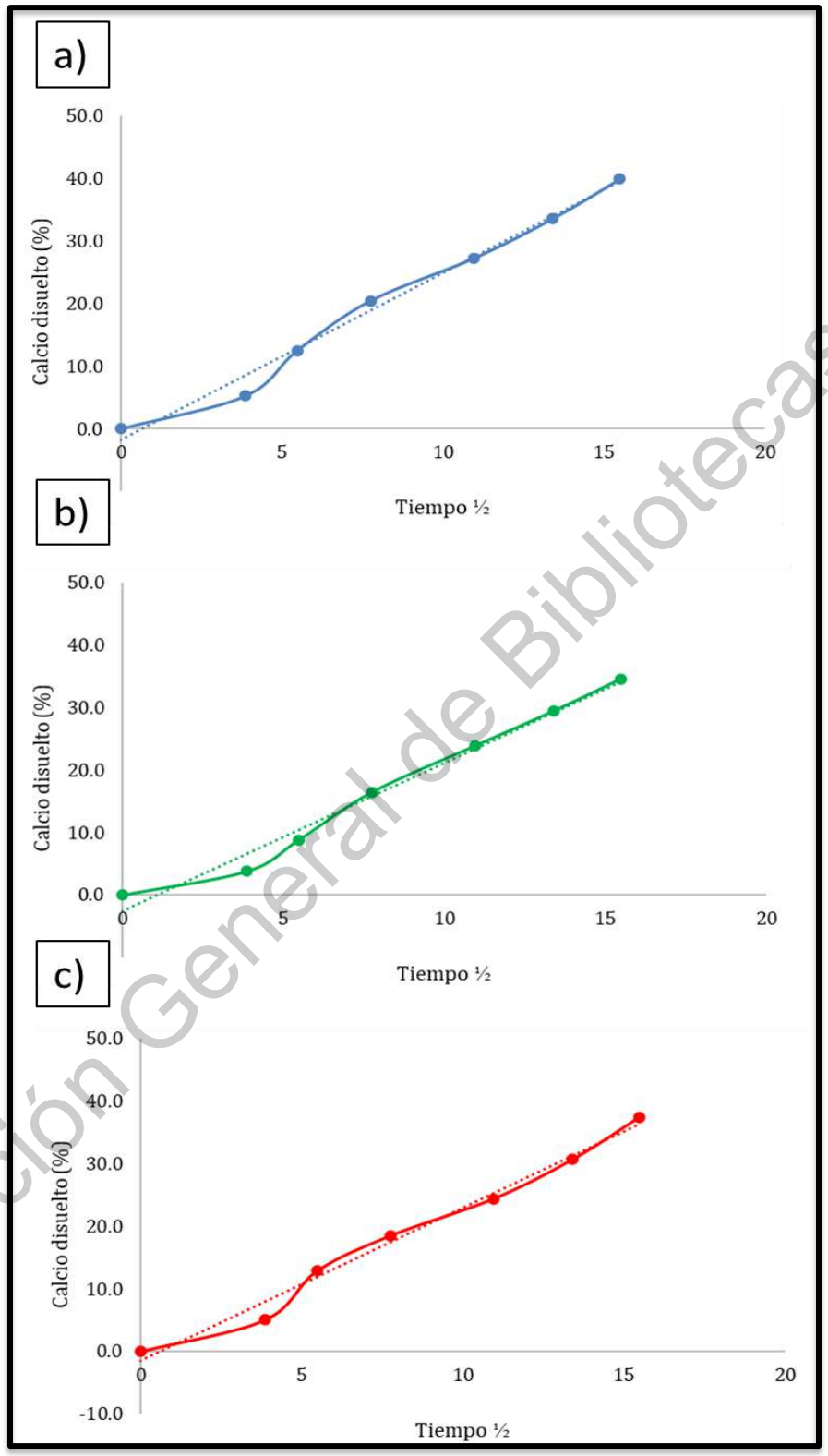


Figura 24. Gráfica comparativa del perfil de liberación de calcio ajustado al modelo de Higuchi. a) pH 2, b) pH 7 y c) pH 8.5

Dirección General de Bibliotecas UAQ

El modelo de Higuchi presentó mayor bondad de ajuste para el perfil de liberación a pH 2, 7, 8.5; con un valor de correlación mayor a 0.98, comprobando que la liberación de calcio se da por el fenómeno de difusión que, de acuerdo a la teoría de la ley de Fick, nos dice que la tasa de difusión es directamente proporcional al gradiente de concentración a través de la matriz (Singhvi y Singh, 2011). Como se observó en la Figura 24, se evidenció el mejor ajuste al el modelo de Higuchi, perfil de liberación de calcio desde las nanoesferas.

Se hace la observación de que el modelo matemático utilizado se limita a: considerar la matriz polimérica como un modelo unidimensional, con condiciones iniciales de una solución monolítica y el coeficiente de difusión es constante (Andreetta , 2003). Para describir de manera más precisa el comportamiento de liberación de las nanoesferas, se recomienda realizar el ensayo considerando todas las variables de la matriz, la solubilidad del calcio para relacionar los datos con resultados de un modelo *in vivo.* Debido a que no existen pruebas regulatorias para formas de dosificación novedosas como nanopartículas, la determinación del perfil de liberación *in vitro* supone mayor importancia como indicador de calidad y establece un primer acercamiento al comportamiento que se espera en condiciones *in vivo*, a través de un modelo matemático que relacione la liberación en condiciones *in vitro* con la absorción en un organismo vivo, de acuerdo con la FDA (1997) "*In vitro/ In vivo* correlations" IVIVC por sus siglas en inglés.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

9. CONCLUSIONES

La eficiencia de separación de xiloglucano fue mayor a 7000 rpm, eliminando componentes secundarios como: lípidos, proteínas, minerales. Además, el método de descascarillado por tostado es más efectivo que el método de remojo, ya que requiere menos tiempo y facilita la remoción de la testa.

El xiloglucano extraído de las semillas de *T. indica* L. por el método de tostado presentó perfiles de viscosidad más altos con respecto a los perfiles de viscosidad obtenidos para el xiloglucano extraído por el método de remojo, lo que representa mayor rendimiento como hidrocoloide en el caso del xiloglucano extraído por el método de tostado.

La diferencia en viscosidad del xiloglucano obtenido por cada método de extracción (remojo y tostado) posibilita distintas aplicaciones del hidrocoloide extraído en función de su actividad espesante y gelificante, en ambos casos, dichas propiedades son útiles en la industria alimentaria y farmacéutica.

El potencial ζ como parámetro electrocinético de superficie, representó el atributo de calidad coloidal con mayor relevancia para definir las condiciones en que ocurriría la obtención de nanoesferas por coacervación compleja, debiéndose alcanzar y mantener en el tiempo un valor alrededor de 12.92± 0.47 mV.

El tamaño de las nanoesferas, se obtuvo mediante la determinación por dispersión dinámica de la luz, con valor promedio 320 nm; habiéndose confirmado el tamaño y la morfología esférica de las partículas, mediante microscopía electrónica de barrido; siendo la polidispersidad de las muestras de 25 %, lo que indicó la existencia de nanoesferas de tamaño homogéneo.

Las muestras de xiloglucano, lactosuero y el coacervado en suspensión coloidal, mantuvieron un valor de pH, potencial ζ y tamaño de partícula estable hasta la semana 2; posterior a ello se observaron fluctuaciones. Por lo anterior, se sugiere la liofilización de las nanoesferas para incrementar su tiempo de vida útil.

El perfil de liberación de calcio a partir del coacervado mostró un comportamiento de liberación independiente del pH del medio; siendo además el modelo matemático

Dirección General de Bibliotecas UAQ

de Higuchi, el que más se ajustó para describir su cinética. Lo anterior permite inferir, por una parte, que la matriz polimérica resultante de la coacervación de ambos polímeros es útil y sigue el mismo mecanismo de difusión.

Los resultados obtenidos hasta el punto en que se delimitó el presente proyecto, muestran que es factible la formación de nanoesferas por coacervación compleja de dos materiales naturales que son desecho de otros procesos industriales: el xiloglucano y las proteínas de lactosuero. Además, las nanoesferas obtenidas representan un sistema potencialmente útil para la liberación prolongada de calcio en el tracto gastrointestinal y una presentan una ventaja tecnológica al ser un proceso que prácticamente no ocupa fuentes externas de energía.

Para comprobar las propiedades de liberación prolongada del coacervado xiloglucano-proteínas de lactosuero, se recomienda hacer en un siguiente estudio, junto con ensayos de escalamiento de lotes, así como utilizando muestras liofilizadas, estudios de cinética de liberación del calcio desde las nanoesferas, sometiendo una misma muestra a condiciones de cambio subsecuentes de pH de fluido gástrico simulado a intestinal, tal y como lo marcan las farmacopeas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

10. ANEXOS

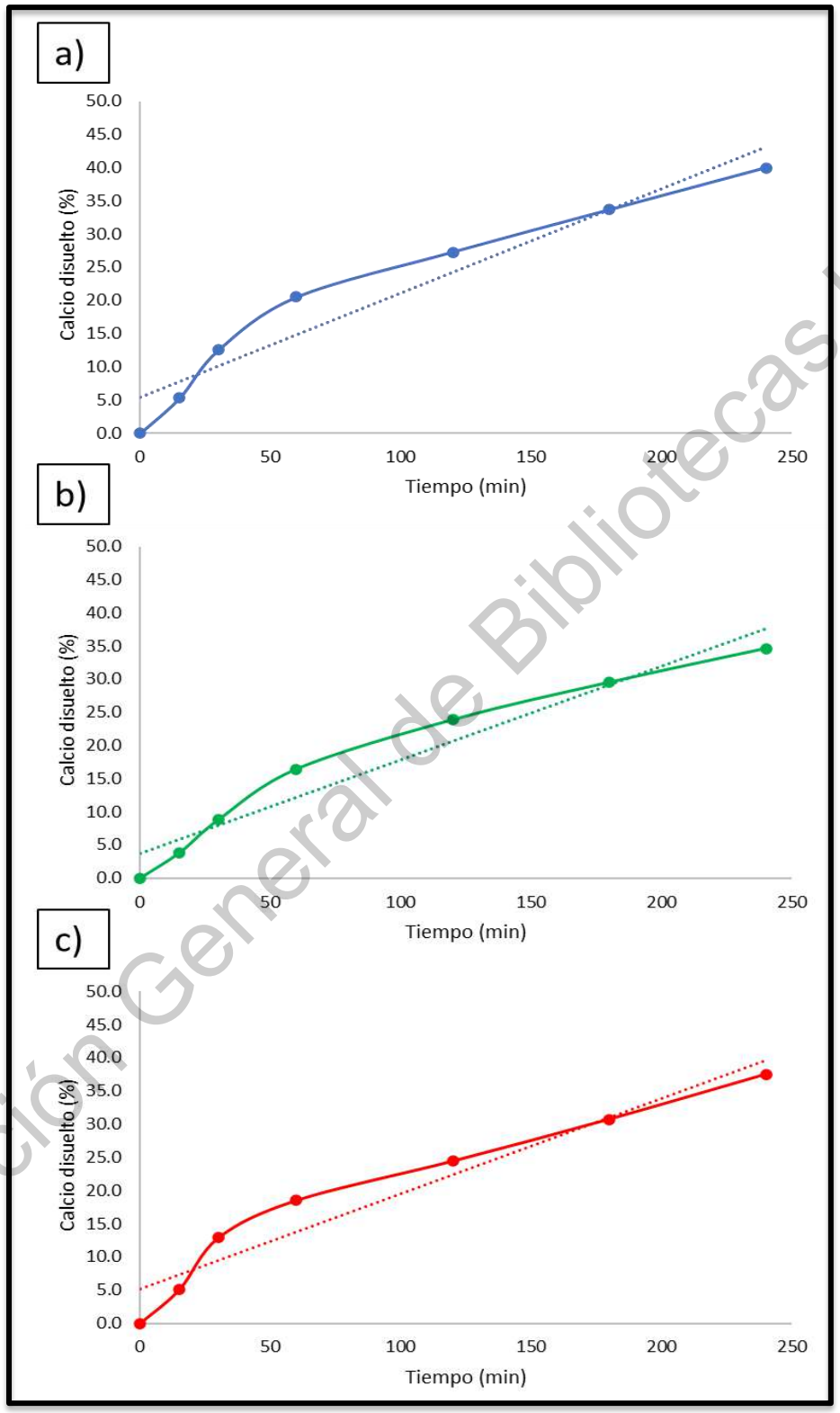


Figura 25. Gráfica comparativa del perfil de liberación ajustado al modelo de Orden 0. a) pH 2, b) pH 7 y c) pH 8.5

Dirección General de Bibliotecas UAQ

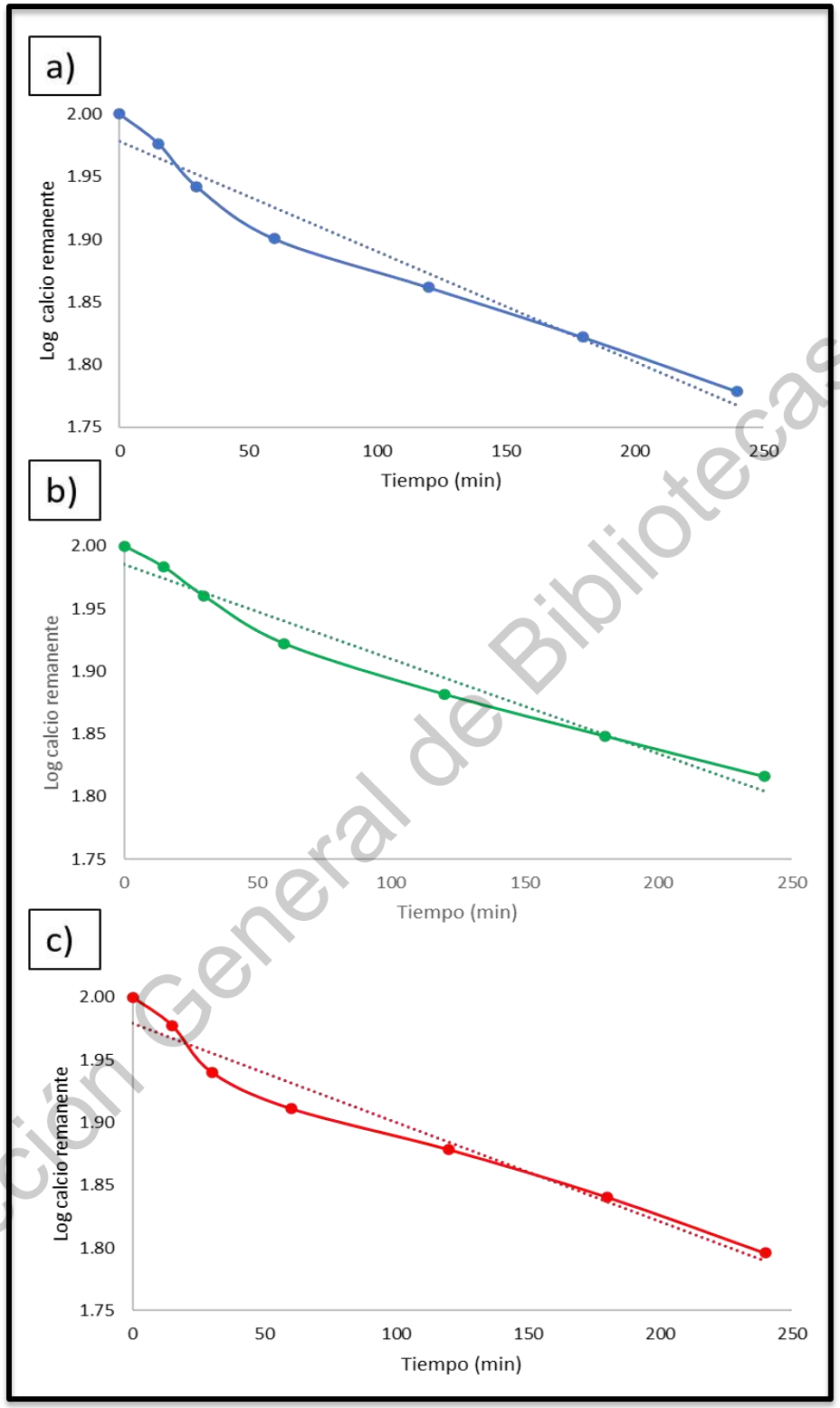


Figura 26. Gráfica comparativa del del perfil de liberación ajustado al modelo de Primer orden. a) pH 2, b) pH 7 y c) pH 8.5

Dirección General de Bibliotecas UAQ

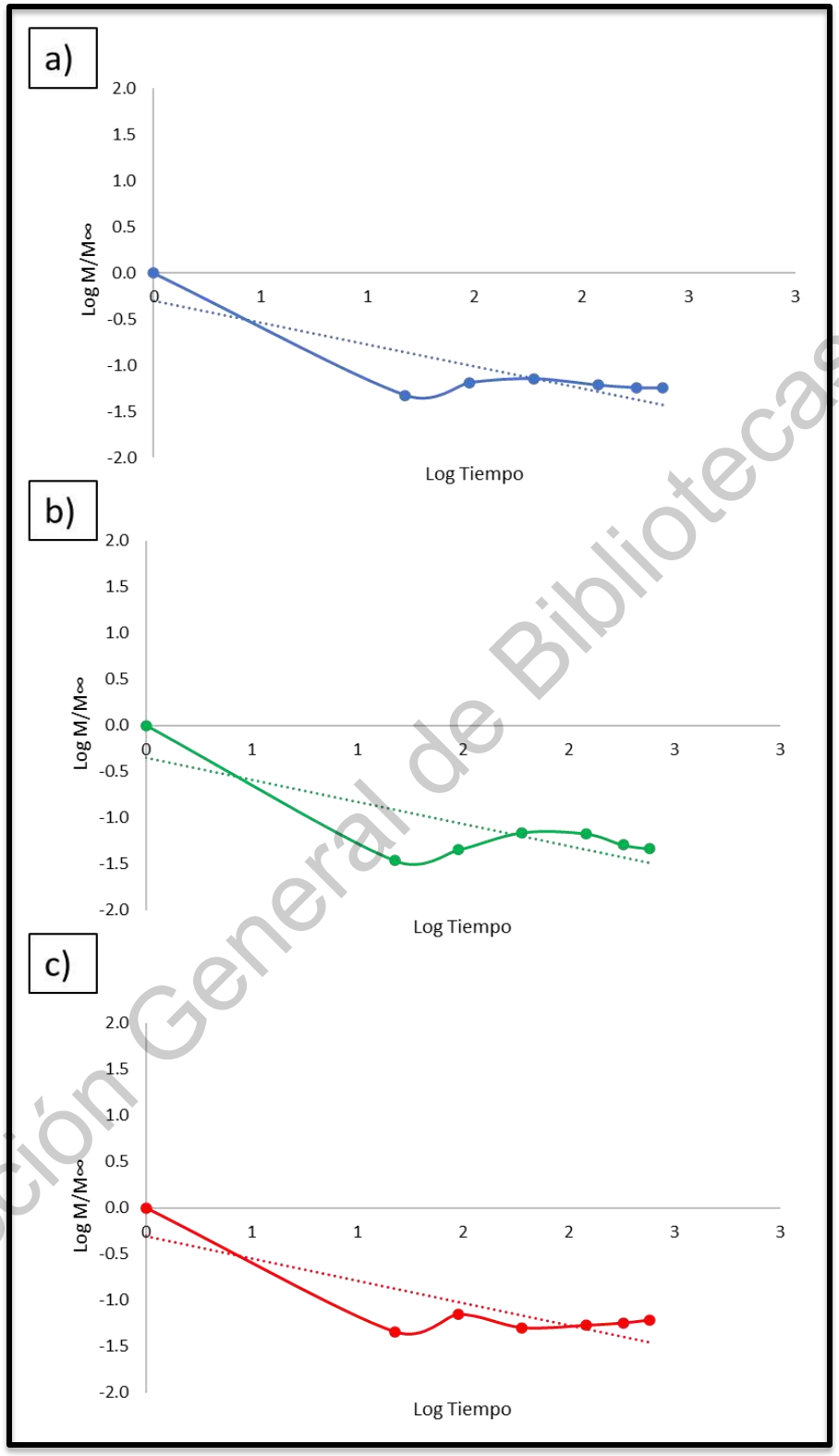


Figura 27. Gráfica comparativa del perfil de liberación ajustado al modelo de Korsmeyer- Peppas. a) pH 2, b) pH 7 y c) pH 8.5

Dirección General de Bibliotecas UAQ

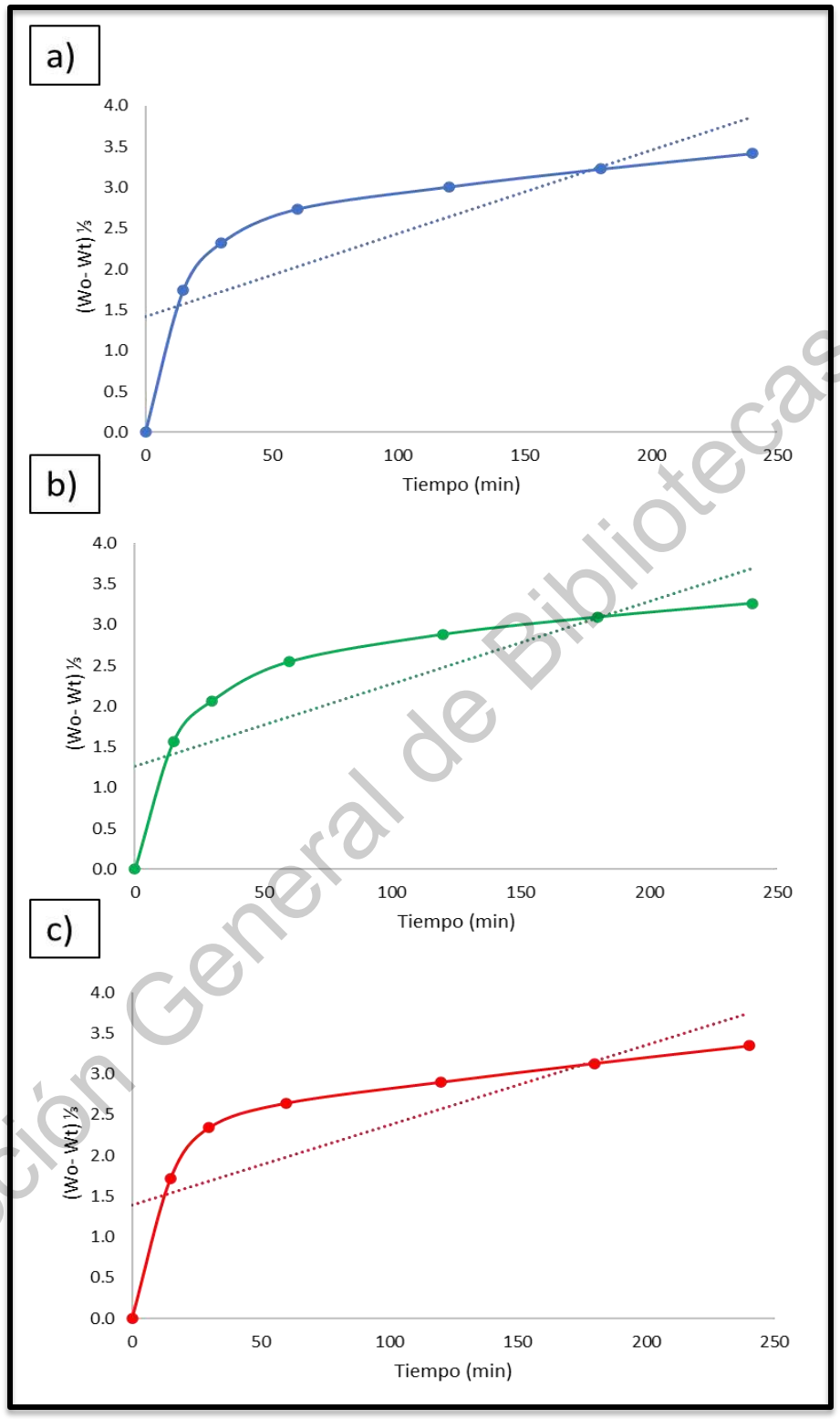


Figura 28. Gráfica comparativa del perfil de liberación ajustado al modelo de Hixson- Crowell. a) pH2, b) pH 7 y c) pH 8.5

Dirección General de Bibliotecas UAQ

11. LITERATURA CITADA

Abrams, S. (2010). Setting Dietary Reference Intakes with the use of bioavailability data: calcium. *Am J Clin Nutr*. 91: S1474.

Agnihotri, N., Mishra, R., Goda, C., Arora M. (2012) Microencapsulation: A Novel Approach in Drug Delivery: A Review. *Indo Glob. J. Pharm*. 2(1): 1-20.

Aguirre, W., de la Torre, W., Jervis, R. (2015). Metabolismo de calcio. Cap. 2. En: Osteoporosis. Ecuador: Sociedad Ecuatoriana De Metabolismo Mineral. p. 278.

Alpizar-Reyes, E., Carrillo-Navas, H., Gallardo-Rivera, R., Varela-Guerrero, V., Alvarez-Ramirez, J., Pérez-Alonso, C. (2017). Functional properties and physicochemical characteristics of tamarind (Tamarindus indica L.) seed mucilage powder as a novel hydrocolloid. *J Food Eng*. 209: 68-75.

Andreetta, H. (2003). Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de Distintos Modelos. *Lat. Am. J. Pharm*. 22 (4): 355-364.

AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Métodos 920.39, 923.03, 925.10, 991.41 y 993.19, AOAC, Gaithersburg, Md, USA, 17th. W. Horwitz (eds).

Aparecida, L., Barroso, F. (2016). On the complexation of whey proteins. *Food Hydrocoll*. 55: 89-99.

Ascencio, C. (2012). Regulación del calcio y otros nutrientes inorgánicos en el sistema óseo. Cap. 7. En: Fisiología de la Nutrición. Ed: Mc. Graw Hill. México 145.

ASTM, 2000. ASTM International - Standards Worldwide. [En línea] Disponible en: http://www.astm.org. Fecha de consulta: 20 octubre 2018.

Baeza, Rosa Isabel. (2003). Interacciones entre ß-lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Batalla-Mayoral, J., Cuadros-Moreno, A., San Martín-Martínez E. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Lat. Am. J. Phys. Educ*. 8(4): 1319-1324.

Bhattacharya, S., Bal, S., Mukherjee, R.K. (1994a). Functional and nutritional properties of tamarind (*Tamarindus indica*) kernel protein. *Food Chem*. 49:1–9.

Bhattacharya, S., Bal, S., Mukherjee, R.K., Bhattacharya, S. (1994b). Characterization of some products from tamarind (*Tamarindus indica*) kernel. *J. Food Sci*. *Technol.* 31: 372-376.

Bonilla, M. (2018). Elaboración de una nano-emulsión de liberación controlada con lecitina de soya y un fármaco lipofílico. Tesis. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas. Ecuador.

Berdanier, C., Zempleni, J. (2009). *Micronutrients and Metabolism*. Cap. 11. En: Advanced Nutrition Macronutrients. Boca Raton: CRC Press. p.530.

Chandra-Mohan, C., Harini, K., Vajiha-Aafrin, B., Lalitha-Priya, U., Maria-Jenita,P., Babuskin, S., Karthikeyan, S., Sudarshan, K., Renuka, V., Sukumar, M. (2018). Extraction and characterization of polysaccharides from tamarind seeds, rice mill residue, okra waste and sugarcane bagasse for its Bio-thermoplastic properties. *Carbohydr. Polym*. 186: 394-401.

Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, ZG., Shin, DM. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*. 14 (5): 1310-1316.

Clayton, J., Mollner, T. (2019). Integrating Powder Characterization into Raw Material Selection and Process Optimization. *Pharm. Sci*. 2-5

Crispín-Isidro, G., Hernández-Rodríguez, L., Ramírez-Santiago, C., Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, E. J. (2019). Influence of purification on physicochemical and emulsifying properties of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed gum. *Food Hydrocoll*. 93: 402-412.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dash, S., Murthy, P., Nath, L., Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*. 67: 217-223.

Díaz, E., Pereira, G., Alfonso, W. (2010). Separación de fosfolípidos mediante la aplicación de fuerzas centrífugas. *Rev. Cuba. de Farm*. 46(1): 4-10.

Dilbaghi, N., Kaur, H., Ahuja, M., Kumar, S. (2013). Evaluation of tropicamide-loaded tamarind seed xyloglucan nanoaggregates for ophthalmic delivery. *Carbohydr. Polym.* 94(1): 286-291.

D'Souza, S., De Luca, P. (2006). Methods to assess *in vitro* drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharm. Res*. 23 (3):460–74.

D'Souza, S. (2014). A review of *in vitro* drug release test methods for nano-sized dosage forms advances in pharmaceutics. *Drug Deliv. Transl. Res.* 3(5): 409–415.

De Kruif, C., Huppertz, T. y Petukhov, A. (2012). Advances in Colloid and Interface. *Science. (*171): 36–52.

De Kruif, C., Weinbreck, F. (2005). Complex coacervates of whey proteins and anionic polysaccharides, and their use for encapsulation. *Food New Zealand*. 5. 23-30.

Dubey, R., Shami, T., Bhasker, R. (2009). Microencapsulation technology and *applications. Defence Sci J.* 59 (1): 2-95.

Eckert, E., Bamdad, F., Chen, L. (2014). Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. *Food Chem*.159: 498-506.

EFSA (2015). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for calcium. Disponible en: https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4101. Fecha de consulta: 20 de abril de 2019.

ENSANUT Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (2012). Resultados de la ENSANUT MC 2012. Disponible en: https://ensanut.insp.mx/. Fecha de consulta: 20 de abril de 2019.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Escudero, E., González, P. (2006). La fibra dietética. *Rev Nutr*. 21(2): 61-72.

Eswaran, S., Muir, J., Chey, W. (2013). Fiber and functional gastrointestinal disorders. *Am J Gastroenterol*. 108(5):718-27.

FAO. (2017). Milk and milk products. *Codex alimentarius*. ISBN 978-92-5-305614-9.

FDA (1997). Guidance for Industry, Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation and Application of *In Vitro/In Vivo* Correlations.

Fennema, O., Damodaran, S., Parkin, K., (2010). Carbohidratos. Cap. 3. En: Química de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 189-265.

Flett, K., Corredig, M. (2009). Whey protein aggregate formation during heating in the presence of κ-carrageenan. *Food Chem*. 115(4): 1479–1485.

Fleet, J., Scoch, R. (2010). Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Crit Rev Cl Lab Sci*. 47-181-195.

Fernández, A., Sosa, P., Setton, D. (2011) Calcio y nutrición. *Arch Argent Pediatr*. 109(3):256-266.

Gallego, H., Álvarez, C., Fernández, A. (2012) Caracterización reológica de dos salsas alimenticias. *Vitae*. 19: 433-435

García, E., Urdaneta, M., Sádaba, B., Landecho, M., Lucena, F., Azanza, J. (2010) Importancia del tipo de formulación de los preparados de calcio y vitamina D en la prevención y tratamiento de la osteoporosis. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2(2): 35-43.

García, P., Velasco, C. (2007). Evolución en el conocimiento de la fibra. *Rev Nutr*. 22:2.

García-Salcedo, Á. J., Torres-Vargas, O. L., del Real, A., Contreras-Jiménez, B., & Rodriguez-Garcia, M. E. (2018). Pasting, viscoelastic, and physicochemical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) flour and mucilage. Food Struct. 16: 59–66.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Geankoplis, C.J. (1998). Procesos de separación físico-mecánicos. Cap. 14. En: *Procesos de trasporte y Operaciones Unitarias*. México: Compañía Editorial Continental. p. 884-938.

González, G., González, A., Vallejo, B., Álvarez, E., García, H. (2014). Los Alimentos Funcionales. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 38: 2. p. 223-225

González, R., Urbina, N., Morón, L. (2015). Caracterización Viscoelástica de Biopelículas Obtenidas a Base de Mezclas Binarias. *Información tecnológica.* 26(3):71-76.

González- Martínez, D., Carrillo, H., Barrera, C., Martínez, S., Álvarez, J., Pérez, C. (2017). Characterization of a novel complex coacervate based on whey protein isolate-tamarind seed mucilage. *Food hydrocoll.* 72: 115-126.

Gorji, G., Waheed, A., Ludwing, R., Toca, J., Schleining, G. (2018). Complex coacervation of milk proteins with sodium alginate. *J. Agric. Food Chem.*

Gropper, S. (2005). Major minerals. Cap. 11. En: *Advanced Nutrition and Human*. Ed: California. Ohio, EE. UU. p. 425-444.

Guéguen, L., Pointillart, A. (2000). The Bioavailability of Dietary Calcium. *J Am Coll Nutr*. 19 (2): 119-6.

Gupta, V. Gnanarajan, G., Kothiyal, P. (2012) A Review Article on Colonic Targeted Drug Delivery System. *Pharma Innov*. 1(7):14–24.

Gutiérrez, E., Rojas, I., Pons, J., Guzmán, H., Agua, B., Arenas, J., Fernández, P., Palacios, A., Herrera, G., Rodríguez, M. (2007). Study of calcium ion diffusion in nixtamalized quality protein maize as a function of cooking temperature*. Cereal Chem*. 84:186-194.

Haffner, F., Diab, R., Pase, A. (2016). Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches. *J. Mater. Sci*. 3:114-136.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Heaney, R., Recker, R., Weaver, C. (1999). Absorbability of calcium sources: the limited role of solubility. *Calcified Tissue Int*. 46: 300-304.

Hernández, M., Vélez, J. (2014). Suero de leche y su aplicación para la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* 2:13-22.

Hernández-Marín, N., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. *J Food Eng*. 119. 181-187.

Higuchi, T. (1961). Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J. Pharm Sci. 50(10)*: 874-875.

Ibarra, R. (2014). Comportamiento del uniportador mitocondrial de calcio modulado por elementos antagónicos. *Revista de educación bioquímica*. 33(4): 114-115.

IOF. International Osteoporosis Fundation. (2019). Epidemology. https://www.iofbonehealth.org/epidemiology. Fecha de consulta: 20 de abril de 2019.

IOM. (2010). "Overview of Calcium." Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press, 2011. Summary. Disponible en: http:// www.nap.edu/openbook.php?record_id=13050&page=1. Fecha de consulta: 20 de abril de 2019.

Itoh, K., Yahaba, M., Takahashi, A., Tsuruya, R. Miyazaki, S., Dairaku, M, Togashi, M., Mikami, R., Attwood, D. (2008). *In situ* gelling xyloglucan/pectin formulations for oral sustained drug delivery. *Int J Pharm*. 356: 95- 101.

Jing, L., Guan-Hao, B., Yong-Kang, L. (2007). Studies of forming whey protein-polysaccharides conjugates and it's functional properties. *CDIA*. 5:43-51.

Jiang, H., Xiaoyun, H., Zhili, L., Xincheng, C., Yunhua, H., Ligang, G., Decai, L., Xinrui, L., Tiling, F. (2012). Superparamagnetic core–shell structured microspheres carrying carboxyl groups as adsorbents for purification of genomic DNA. *Colloids Surf. A*. 401: 74-80.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Joseph, J., Kanchalochana, S., Rajalakshmi, G., Hari, V., Devi, R. (2012). Tamarind seed polysaccharide: A promising natural excipient for pharmaceutical. *Int. J Pharm.* 6: 270-8.

Kai, K., Oliveira, C. (2010). Influence of extraction conditions on properties of seed xyloglucan. *Int. J. Biol. Macromol*. 46: 223–228.

Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, J., Adhikari, B. (2014) Microencapsulation of omega-3 fatty acids: a review of microencapsulation and characterization methods. *J Funct Foods*. 19: 868- 881.

Khounvilay, K., Sittikijyothin, W. (2012). Rheological behaviour of tamarind seed gum in aqueous solutions. *Food Hydrocoll*. 26: 334-338.

Kulkarni, A., Joshi, A., Patil, C., Amale, P., Patel, H., Surana, S., Pardeshi, C. (2017). Xyloglucan: A functional biomacromolecule for drug delivery applications. *Int. J. Biol. Macromol*. 104: 799–812.

Kumar, Ch. S., Bhattacharya, S. (2008) Tamarind Seed: Properties, Processing and Utilization. Crit. Rev. *Food Sci. Nutr*. 48:1, 1-20.

Lavanda, I., Saad, S., Lobo, A., Colli, C. (2011) Prebióticos y su efecto en la biodisponibilidad del calcio. *Rev Nutr*. 24:333-344.

Leng X., Turgeon, S. (2007). Study of the shear effects on the mixture of whey protein/polysaccharides: Application of flow models in the study of the shear effects on WPI/polysaccharide system. *Food Hydrocoll*. 21:1014-1021.

Li, K., Wang, X.-F., Li, D.-Y., Chen, Y.-C., Zhao, L.-J., Liu, X.-G., Deng, H.-W. (2018). The good, the bad, and the ugly of calcium supplementation: a review of calcium intake on human health. *Clin Interv Aging*. 13: 2443–2452.

Liu, P., de Wulf, O., Laru, J. (2013) Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *Pharm Sci Tech*. 14(2): 748–756, 2013.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Livney, Y. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. Curr Opin Colloid Interface *Science*.15: 73–83.

López, C., Deladino, L., Navarro, S., Martino, M. (2012). Encapsulación de compuestos bioactivos con alignatos para la industria de alimentos. *Limentech Ciencia y Tecnología*. 10:18-27.

López, C., Peña, C., Reyes, J., Rodríguez, A. (2011). Effects of domestication on structural polysaccharides and dietary fiber in nopalitos (*Opuntia* spp). *Genet Resour Crop Ev*. 59:1015-1026.

Lopretti, M., Barreiro, F., Fernandez, I., Damboriarena, A., Ottati, C., Olivera, A. (2007). Microencapsulación de compuesto de actividad biológica. *Publicación anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*. 2: 19-23.

Madene, A., Scher, J., Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *Int. J. Food Sci. Technol*. 4(1): 1-21.

Malakar, J., Nayak, A., Pa, D., Jana, P. (2013) Potato starch blended alginate beads for prolonged release of tolbutamide: Development by statistical optimization and *in vitro* characterization. *Asian J Pharm.* 7: 43-51.

Mahkam, M., Hosseinzadeh, F., Galehassadi, M. (2012). Preparation of ionic liquid functionalized silica nanoparticles for oral drug delivery. *J Biomater Nanobiotechnol*. 3:391–395.

Martín J., Moya, B., Jiménez, M. (2015). Factores nutricionales en la prevención de la osteoporosis. *Rev Nutr*. 32: 49-55.

Martínez de Victoria, Emilio. (2016). El calcio, esencial para la salud*. Rev Nutr*. 33: 4, 26-31

Martino, A., Pavelkova, A., Maciulyte, S., Budriene, S., Sedlarik, V. (2016). Polysaccharide based nanocomplexes for co-encapsulation and controlled release of 5-fluorouracil and temozolomide. *Eur. J. Pharm*. 92:276-286.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Meneses, J., Corrales, C., Valencia, M. (2007). Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Revista Eia*, 8: 57-67.

Moran, S., Mina. A., Duque, J., Anaya, S., San-Martin, U., Yañez, P., Leal, R. (2013). Prevalence of lactose malabsorption in Mexican children: importance of measuring methane in expired air. *Arch Med Res*. 44(4):291-295.

Moreira, G., Maia Cost, M., Rodríguez, A., Sousa, E., Dantas, M., Azeredo, H. (2009). Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids. *LWT - Food Sci Technol*. 641-645.

Mota, A., Ibarz, A. (2006). Comportamiento viscoelástico de pulpa de membrillo en función de la concentración de sólidos solubles. *Food Sci Technol.* 26(1): 214-219.

Mota, E., Perales, E. (1999). Los mecanismos de absorción de calcio y los modificadores de absorción con base para la elaboración de una dieta de bajo costo para pacientes osteoporóticas. *Gac Med Mex*. 135: 3.

Nagajothi, M. S., Balasubramanian, A., Renganayaki, A.R., Sudha, P. (2017). Optimizing Roasting Standards for Quality Gum Production in Tamarind Seed Gum Production. *Int. J. Curr. Microbiol.* App. Sci. 6(5): 1964-1968.

Nayak, N., Khedkar, C., Khedkar, G., Khedkar, C. (2016). Osteoporosis. *Encycl. Food Heal*. 181–185. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00507-9.

Nicorescu, I., Loisel, C., Riaublanc, A., Vial, C., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2009). Effect of dynamic heat treatment on the physical properties of whey protein foams. *Food Hydrocoll*. 23(4): 1209–1219.

NIH (National Institutes of Health). (2013). Calcium: dietary supplement fact sheet. Office of Dietary Supplements. https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-HealthProfessional/. Fecha de consulta: 28 de agosto de 2018.

NOF National Osteoporosis Foundation. (2018). Calcium and vitamin D. https://www.nof.org/patients/treatment/calciumvitamin-d/. Fecha de consulta 20 de abril de 2019.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Pacifici, R. (2018). Bone remodeling and the microbiome. *Perspectives in Medicine*. 9:1-20.

Pardeshi, C. V., Kulkarni, A. D., Belgamwar, V. S., & Surana, S. J. (2018). Xyloglucan for drug delivery applications. Fundamental Biomaterials. *Polymers*. 143–169.

Parra, R. 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Rev Fac Nac Agron Medellin*. 62(1): 4967-4982.

Parra, R. (2010a). Food microencapsulation: a review. *Rev Fac Nac Agron Medellin*. 63(2): 5669-5684.

Parra, R. (2010b). Digestión Anaerobia de Lactosuero: Efecto de Altas Cargas Puntuales. *Rev Fac Nac Agron Medellin*. 63(1): 5385-5394

Phani Kumar, G., Gangarao, B., Kotha, N. Lova, R. (2011). Isolation and evaluation of Tamarind seed polysaccharide being used as a polymer in pharmaceutical dosage forms. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* 2(2): 274.

Quert, R., Martínez, M., Leyva, M., García, B., Gelabert, F. (2001). Rendimiento de aceite esencial en Pinus caribaea MorElet según el secado al sol y a la sombra. *Rev. Cuba. de Farm*. 35(1): 47-50.

Ramírez, E., Díez, C., Sánchez, M., Goñi, I. (2011). *In vitro* calcium bioaccessibility in raw and cooked cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). *J. Food Sci. Technol*. 44: 1611-1615.

Ricaurte, P., Rodas, S. Mármol, L. (2017). Obtención de una bebida simbiótica a partir de suero dulce de quesería. *Industrial Data*. 20(2): 7-13.

Rodríguez, Y., Curbelo, C. (2012). Leaching kinetics of the red mangrove bark in water. *Rev. Cuba. de Farm*. 46(1): 80-86.

Sáez, V., Hernández, R., Peniche, C. (2007) Microspheres as delivery systems for the controlled release of peptides and proteins. *Biotecnol*. 24:108-116.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Sáez, V., Hernáez, E., Agulo, L., Katime, I. (2004). Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. *Rev Iberoam Polim*. 5:87-101.

SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (2017) Tamarindo: dulce y terapéutico. Disponible en: https://www.gob.mx/sagarpa/es/articulos/el-tamarindo-dulce-y-terapeutico. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2018

Sandoval, V., Cu, T., Peraza, G., Acereto, P. (2016). Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutracéuticas. Cap 1. En: Alimentos Funcionales de Hoy. Ed: OmniaScience. Barcelona, España. 181-218.

Santa, C. y López B. (2013). Materiales poliméricos en Nanomedicina: transporte y liberación controlada de fármacos. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas*. 37(142): 115-124.

Secretaría de Salud. (2011).Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 10 ed. México.

Sepúlveda, E., Saenz, C., Aliaga, E., Aceituno, C. (2007). Extraction and Characterization of Mucilage in Opuntia spp. *Journal of Arid Environments*. 68. 534-545. 10.1016/j.jaridenv.2006.08.001.

Shen, J., Burgess, D. (2013) *In vitro* dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. *Drug Deliv Transl Res*. 3(5): 409-415.

Singhvi, G., Singh, M. (2011). In-vitro drug release characterization models. Int J Pharm Stud Res. 2: 77-84.

Sinko, P. (2011). Drug release and dissolution. Cap. 13. En: Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences. Ed: Wolters Kluwer. Ohio, EE.UU. 300-317.

Soria, C. (2017). *Evaluación de temperatura y tiempo de tostado en la degradación de ácidos grasos poliinsaturados de la semilla de sacha inchi (plukenetia volubilis i.).*

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Micaela Bastidas De Apurimac. Perú. Disponible en: http://repositorio.unamba.edu.pe/handle/UNAMBA/660.

Spellman, D., O'Cuinn, G., FitzGerald, R. (2009). Bitterness in Bacillus proteinase hydrolysates of whey proteins. *Food Chem*. 114(2): 440–446.

Spotti, M., Perduca, M., Piagentini, A., Santiago, L., Rubiolo, A. y Carrara, C. (2013). Gel mechanical properties of milk whey proteinedextran conjugates obtained by Maillard reaction. *Food Hydrocoll*. 31:26-32.

Thakkar, V., Shah, P., Soni, T., Parmar, M., Gohel, M. (2009). Goodness-of-fit model-dependent approach for release kinetics of levofloxacin hemihydrates floating tablet. *Dissolution Technol.* 16(5): 35-39.

Timilsena, Y., Adhikari, R., Barrow, C., Adhikari, B. (2016). Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *Int J Biol Macromol*. 91:347-357.

Thongkaew, C., Hinrichs, J., Gibis, M., Weiss, J. (2015). Sequential modulation of pH and ionic strength in phase separated whey protein isolate-Pectin dispersions: Effect on structural organization. *Food Hydrocoll*. 47: 21-31.

Turgeon, S., Beaulieu, M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocoll*. 15:583-591.

Varma, A., Kennedy, J., Galgali, P. (2004). Synthetic polymers functionalized by carbohydrates: a review. *Carbohydr. Polym*. 56(4): 429-445,

Vila J. (2001). Microencapsulación de medicamentos. Cap. 10. En: Tecnología farmacéutica. Ed: Síntesis. Madrid, España. 591

Veldurthy, V., Wei, R., Oz, L., Dhawan, P., Jeon, Y. Christakos, S. (2016). Vitamin D, calcium homeostasis and aging. *Bone Res*. 4:16041.

Voss, D. (1992). Relating colorimeter measurement of plant color to the Royal Horticultural Society Colour Chart. *Hort Science*. 27: 1256-1260.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Watts, N. (2010). American association of clinical endocrinologists' medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Prac*. 16:4-37

Weaver, C., Janle, E., Martin, B. (2009). Dairy versus calcium carbonate in promoting peak bone mass and bone maintenance during subsequent calcium deficiency. *J Bone Min Res*. 24(8):1411-1419.

Whisner, C., Castillo, L. (2018). Prebiotics, bone and mineral metabolism. *Calcif. Tissue Int*. 102: 443-479.

White, F. (2008). Flujo viscoso en conductos. Cap. 6. En: Mecánica de fluidos. Madrid: McGraw Hill. p. 896

Willis, H., Thomas, W., Eldridge, A., Harkness, L., Green, H., Slavin, J. (2010). Increasing doses of fiber do not influence short-term satiety or food intake and are inconsistently linked to gut hormone levels. *Adv Food Nutr Res*. 54:5135.

Xu, X., Khan, M., Burgess, D. (2012). A two-stage reverse dialysis *in vitro* dissolution testing method for passive targeted liposomes. *Int J Pharm*. 426(1-2): 211–218.

Ye, A., Flanagan, J., Harjinder, S. (2006). Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. *Biopolymers.* 82. 121-33.

Ye, A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: Principles and applications - A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43: 406 - 415.

Zhang, J., Liu, X., Subirade, M., Zhou, P., Liang, L. (2014). A study of multi-ligand beta-lactoglobulin complex formation. *Food Chem*. 165:256-261.

Zhu, K., Prince, R. (2012). Calcium and bone. *Clin Biochem*. 45(12): 936-42.

Dirección General de Bibliotecas UAQ