



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Encapsulación de compuestos presentes en el extracto de pulpa de café usando como material de pared almidón modificado de malanga y evaluación de su actividad antihelmíntica.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
Maestro en Biotecnología

PRESENTA:

Gabino Misael López Rodríguez

Director de tesis:

Dr. Alejandro Aparicio Saguilán

Codirector de tesis:

Dra. Nallely Rivero Pérez

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. México, 2020



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2019/MBt/106
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 13 de noviembre de 2019

C. GABINO MISAEL LÓPEZ RODRÍGUEZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Presidente
Dr. Adrián Zaragoza Bastida	UAEH	Vocal
Dr. Alejandro Aparicio Saguilán	UNPA	Secretario
Dr. Aurelio Ramírez Hernández	UNPA	1er Suplente
Dra. Rubi Guadalupe Utrilla Coello	UNPA	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.



Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú

Dr. Adolfo Lopez Torres
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. Dr. Alejandro Aparicio Saguilán – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

M. en C. Héctor Lopez Arjona
Vice-rector Académico
VICE-RECTORIA ACADEMICA



CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/376
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 12 de diciembre de 2019

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del **C. Gabino Misael López Rodríguez**, matrícula **17140006**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **"Encapsulación de compuestos presentes en el extracto de pulpa de café usando como material de pared almidón modificado de malanga y evaluación de su actividad antihelmíntica"** para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

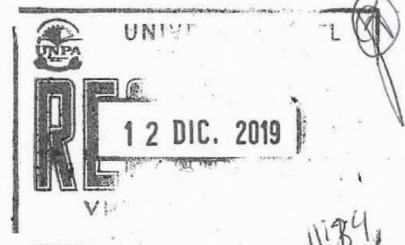
De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi jí jú



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Gabino Misael López Rodríguez – Estudiante
C.c.p. M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

Esta tesis fue realizada en los laboratorios del Taller de Alimentos, Análisis Instrumental e Innovación Tecnológica Sostenible en Materiales y Nanotecnología de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, así como en los laboratorios de Nutrición animal, Parasitología y Microbiología Veterinaria de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección del Dr. Alejandro Aparicio Saguilan y la Codirección de la Dra. Nallely Rivero Perez. Se contó con la asesoría de la Dra. Delia Paramo Calderón, Dr. Lucio Abel Vázquez León y la Dra. Guadalupe del C. Rodriguez Jiménez para la realización del proceso de secado por aspersión en los Laboratorios de Ingeniería de Alimentos de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz, Dr. Andrés Acosta Osorio para el análisis de distribución de tamaño de partícula en el Laboratorio de Nanotecnología de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz, Dr. Edgar Oliver Lopez Villegas en el análisis de microscopia electrónica de barrido en la Central de Microscopia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y del Dr. Oscar del Razo Rodriguez para el análisis de degradabilidad ruminal en los laboratorios de Nutrición Animal del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con numero de becario 872459 perteneciente al Programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo necesario para la realización de mis estudios de maestría.

A la Universidad el Papaloapan por permitir mi formación profesional y por las instalaciones prestadas.

A la Dra. Nallely por ser la pionera y mentora en mi formación dentro de la investigación, por su apoyo en los años que llevo bajo su tutela académica, por sus regaños, pero sobre todo por su confianza y creer en mí.

Al Dr. Alejandro por adquirir el compromiso del trabajo, por sus conocimientos brindados, así como el apoyo.

Al Dr. Adrián por formar parte de este trabajo apoyando en cada paso, por sus consejos, conocimiento y la confianza depositada en mí.

A la Dra. Delia por ser parte de mi formación por el apoyo, las críticas al trabajo y sus conocimientos brindados.

Al Dra. Rubí por ser mi maestra, amiga y critica en cada momento. Por el apoyo, consejos, conocimientos, regaños y por su confianza.

Al Dr. Lucio por ser la luz en el camino de esta investigación, por su apoyo, conocimientos, constancia y confianza.

A Jere por ser mi compañera, amiga y hermana formando parte de este camino juntos en los últimos años.

A mis amigos Alan, Silvia, y Daniel quienes fueron un gran apoyo durante estos dos años juntos, por su amistad y por siempre confiar en mi.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a todas aquellas personas que creyeron en mi y que fueron un gran apoyo directo e indirecto para llevarlo a cabo, pero en especial a:

Dios

Por brindarme la sabiduría, el coraje y la serenidad necesaria.

Mi madre

Que siempre ha sido el pilar más importante y quien ha sido mi más grande inspiración.

Ileri, Erandi y Fede

Quienes siempre han sabido ser mis cómplices, amigos y principalmente hermanos apoyándome a la distancia y brindándome sus consejos.

Miguel y Rafael

Quienes llegaron a mi vida para recordarme que siempre hay que ver la vida con una sonrisa, con alegría y valentía.

Irma y Benita

Que al igual que mi madre me han apoyado durante mi camino y son grandes figuras de inspiración de que siempre a pesar de las adversidades se puede salir adelante.

Edgar

Por su comprensión, apoyo incondicional y retroalimentación en estos años juntos.

PRODUCTOS DE INVESTIGACION DE ESTE TRABAJO

López RGM, Aparicio SA, Rivero PN, Zaragoza BA, Gonzales CM, Olmedo JA, Sosa GCG, Ojeda RD y Peláez AA. Evaluación del extracto hidroalcohólico de pulpa de café como inhibidor de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus in vitro*. LIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, 26-28 de septiembre de 2018, Nuevo Vallarta, Nayarit, México.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN.....	4
ABSTACT.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Importancia de la producción ovina en México.....	10
2.2 Impacto de las parasitosis en la producción ovina.....	11
2.3 Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i>	13
2.4 Métodos convencionales para el control de parasitosis, resistencia antihelmíntica y alternativas de control.....	14
2.5 El café y su producción en México.....	16
2.6 Residuos del café.....	17
2.7 Composición química del café y sus residuos.....	19
2.8 Encapsulación.....	22
2.8.1 Materiales de pared.....	23
2.8.2 Métodos de encapsulación.....	24
2.9 Almidón.....	26
2.9.1 Fuentes de almidón.....	28
2.9.2 Almidón de malanga, características y aplicaciones.....	29
2.9.3 Almidón modificado.....	31
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
4. JUSTIFICACIÓN.....	35
5. HIPÓTESIS.....	37
6. OBJETIVOS.....	37
6.1 GENERAL.....	37
6.2 ESPECÍFICOS.....	37
7. METODOLOGÍA.....	38

7.1 Obtención del extracto	39
7.2 Actividad antihelmíntica del extracto de pulpa de café <i>in vitro</i>	39
7.2.1 Obtención de huevo de <i>Haemonchus contortus</i>	39
7.2.2 Evaluación de la inhibición de la eclosión de huevo (IEH) sobre <i>Haemonchus contortus</i>	40
7.2.3 Recuperación de larvas L3 de <i>Haemonchus contortus</i>	41
7.2.4 Determinación de actividad antihelmíntica sobre larvas L3 de <i>Haemonchus contortus</i>	41
7.2.5 Pruebas de hemólisis directa	42
7.2.6 Porcentaje de hemólisis indirecta	43
7.3 Aislamiento del almidón de malanga	44
7.3.1 Modificación física del almidón de malanga	44
7.3.2 Modificación química del almidón de malanga	45
7.3.3 Caracterización morfológica del almidón nativo y modificado físicamente	46
7.3.4 Caracterización reológica del almidón nativo y modificado físicamente ...	46
7.3.5 Caracterización fisicoquímica del almidón nativo y modificado físicamente	48
7.4 Encapsulación del extracto mediante secado por aspersión	50
7.4.1 Preparación de la mezcla de alimentación	51
7.4.2 Secado por aspersión y rendimiento del proceso	51
7.5 Caracterización de las cápsulas	52
7.5.1 Humedad (%) y actividad de agua (a_w)	52
7.5.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	52
7.5.3 Distribución de tamaño de partícula (DTP)	53
7.5.4 Temperatura de transición vítrea (T_g)	53
7.5.6 Densidad aparente y compactada	53
7.5.7 Fluidez	54
7.5.8 Determinación de color	55
7.5.9 Contenido de fenoles totales (CFT)	55
7.6 Evaluación del encapsulado <i>in vitro</i>	56
7.6.1 Inhibición de la eclosión (% IEH)	56
7.6.2 Mortalidad larvaria (%ML)	56
7.6.3 Degradabilidad ruminal de las microcápsulas	56
7.7 Análisis estadístico	57

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
8.1 Evaluación antihelmíntica del extracto hidroalcohólico de pulpa de café sobre <i>Haemonchus contortus</i>	58
8.1.1 Inhibición de la eclosión del huevo (%IEH)	58
8.1.2 Prueba de mortalidad larvaria (% ML)	60
8.1.3 Pruebas de hemólisis directa	62
8.1.4 Pruebas de hemólisis indirecta.....	63
8.2 Caracterización morfológica del almidón de malanga nativo y modificado físicamente	68
8.2.1 Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	68
8.2.2 Distribución del tamaño de partícula (DTP).....	71
8.3 Caracterización reológica del almidón nativo y modificado físicamente	73
8.3.1 Perfil de viscosidad.....	73
8.3.2. Viscoelasticidad.....	76
8.4 Caracterización fisicoquímica del almidón nativo y modificado físicamente ...	84
8.4.1 Determinación de amilosa aparente	84
8.4.2 Difracción de rayos X (DRX)	86
8.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)	90
8.5 Caracterización del almidón modificado dualmente	92
8.5.1 Nivel de entrecruzamiento del almidón.....	92
8.5.2 Perfil de formación de pasta.....	94
8.5.3 Determinación de amilosa aparente	97
8.5.4 Difracción de rayos X (DRX)	98
8.5.5 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)	101
8.6 Encapsulación del extracto de pulpa de café mediante secado por aspersión utilizando almidón modificado de malanga	104
8.6.1 Secado por aspersión y rendimiento del proceso	105
8.7 Caracterización de las microcápsulas	108
8.7.1 Humedad (%) y actividad de agua (aw).....	108
8.7.2 Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	112
8.7.3 Distribución de tamaño de partícula (DTP).....	117
8.7.4 Temperatura de transición vítrea (Tg).....	121
8.7.5 Densidad	123
8.7.6 Determinación de color.....	127

8.7.7 Eficiencia de encapsulación y determinación de fenoles totales recuperados	128
8.8 Evaluación biológica <i>in vitro</i> de los encapsulados	132
8.8.1 Inhibición de la eclosión de huevo (%IEH).....	132
8.8.2 Mortalidad larvaria (%ML).....	134
8.8.3 Prueba de degradabilidad	138
9.- CONCLUSIONES	142
10.- PERSPECTIVAS	144
11.- BIBLIOGRAFÍA	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i> (L1) larva 1, (L2) larva 2 y (L3) larva 3.....	14
Figura 2.- Corte longitudinal del grano de café.	18
Figura 3.- Diagrama experimental	38
Figura 4.- Hemólisis indirecta en agar sangre.....	65
Figura 5.- Micrografías del almidón modificado de malanga nativo	69
Figura 6.- Distribución de tamaño de partícula del almidón nativo y modificado con diferentes tiempos de molienda por el método húmedo.	72
Figura 7.- Perfil de formación de pasta del almidón nativo.	74
Figura 8.- Barrido de amplitud de deformación del almidón nativo y los distintos tiempos de molienda a 90°C.	77
Figura 9.- Barrido de amplitud de deformación del almidón nativo y los distintos tiempos de molienda a 25°C.	78
Figura 10.- Barrido de frecuencia (90°C) de los módulos dinámicos del almidón nativo y los diferentes tiempos de molienda.	81
Figura 11.- Barrido de frecuencia (25°C) de los módulos dinámicos del almidón nativo y los diferentes tiempos de molienda.	82
Figura 12.- Patrones de difracción de rayos X.	87
Figura 13.- Perfil de formación de pasta.	95
Figura 14.- Patrón de difracción del almidón nativo (A), molienda 30 min(B), nativo entrecruzado (C) y modificación dual (D).....	99
Figura 15.- Micrografías de microencapsulados (1000 y 2000X) obtenidos en secado por aspersión, usando maltodextrina (A), almidón nativo (B), nativo entrecruzado (NA/EC), molienda por 30 min (M30) y molienda por 30 min/entrecruzado (M30/EC).	113
Figura 16.- Perfil de distribución de tamaño de partícula de las microcápsulas preparadas con maltodextrina (A), almidón nativo (B), nativo entrecruzado (C), molienda 30 min (D) y molienda 30 min entrecruzado (E).	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (%IEH) de <i>Haemonchus contortus</i> con el uso de extracto hidroalcohólico de pulpa de café.....	58
Tabla 2.- Porcentaje de mortalidad larvaria de <i>Haemonchus contortus</i> con el uso de extracto hidroalcohólico de pulpa de café.....	60
Tabla 3.- Porcentaje de hemólisis del extracto hidroalcohólico de pulpa de café sobre eritrocitos de ovino a dos tiempos de incubación.....	62
Tabla 4.- Contenido de amilosa (%) del almidón nativo y modificados por molienda mecánica de alta energía.....	84
Tabla 5.- Porcentaje de cristalinidad del almidón nativo y a sus diferentes tiempos de molienda.....	88
Tabla 6.- Calorimetría diferencial de barrido (CDB) del almidón nativo y modificado.....	90
Tabla 7.- Nivel de entrecruzamiento (%) del almidón nativo y molienda de 30 minutos.....	93
Tabla 8.- Contenido de amilosa aparente (%) del almidón nativo, molienda 30 min y sus respectivas modificaciones químicas.....	97
Tabla 9.- Calorimetría diferencial de barrido (CDB) del almidón nativo y M30, así como sus correspondientes entrecruzados.....	101
Tabla 10.- Rendimiento de secado de los materiales de pared utilizados.....	106
Tabla 11.- Contenido de humedad (%) y actividad de agua (a_w) de los microencapsulados de extracto hidroalcohólico de pulpa de café usando diferentes materiales de pared.....	108
Tabla 12.- Temperatura de transición vítrea (T_g) de las microcápsulas del extracto de pulpa de café.....	121
Tabla 13.- Densidad y propiedad de flujo de los microencapsulados preparados con diferentes materiales de pared.....	123
Tabla 14.- Color de los microencapsulados del extracto de pulpa de café.....	127
Tabla 15.- Eficiencia de encapsulación (%) y cuantificación de fenoles totales (CFT) de los microencapsulados preparadas con diferentes materiales de pared.....	129
Tabla 16.- Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevo de <i>Haemonchus contortus</i> (%) con el uso de microencapsulados de extracto hidroalcohólico de pulpa de café.....	132
Tabla 17.- Porcentaje de mortalidad larvaria (%ML) de <i>Haemonchus contortus</i> con el uso de microcápsulas del extracto hidroalcohólico de pulpa de café.....	135
Tabla 18.- Degradabilidad (%) de los microencapsulados del extracto hidroalcohólico de pulpa de café <i>in vitro</i>	139

ABREVIATURAS

AN	Almidón nativo
ANEC	Almidón nativo entrecruzado
CDB	Calorimetría diferencial de barrido
CFT	Contenido de fenoles totales
DTP	Distribución de tamaño de partícula
g EAG	Gramos equivalentes de ácido gálico
g SS	Gramos de sólidos secos
G´	Módulo de almacenamiento
G´´	Módulo de pérdida
GDE	Grado de dextrosa equivalente
IEH	Inhibición de la eclosión
L1	Larva 1
L2	Larva 2
L3	Larva 3
M20	Molienda 20 minutos
M30	Molienda 30 minutos
M30EC	Molienda 30 minutos entrecruzado
M40	Molienda 40 minutos
MD	Maltodextrina
MEB	Microscopía electrónica de barrido
ML	Mortalidad larvaria
MP	Material de pared
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SSF	Solución salina fisiológica

RESUMEN

La producción ovina es una de las actividades pecuarias de mayor importancia en México. Sin embargo, las unidades de producción se enfrentan a la presencia de *Haemonchus contortus* uno de los parásitos nematodos más prevalentes y altamente patógenos de los pequeños ruminantes ovinos. El desarrollo de resistencia y degradación de compuestos activos de fármacos antihelmínticos convencionales ha llevado a los productores e investigadores a buscar alternativas de control que tengan menor impacto ambiental y represente un menor gasto en programas de desparasitación en las unidades de producción. Existen reportes que el extracto hidroalcohólico de pulpa de café presenta actividad antihelmíntica debido a un grupo de compuestos de naturaleza fenólica, los cuales son sensibles a las condiciones externas (pH, O₂, enzimas o microorganismos) que sufren durante el proceso de digestión. Una alternativa para la protección de los compuestos de interés es la encapsulación con la ayuda de un material de pared ofreciendo ventajas en la aplicación, dosificación, resistencia a jugos gástricos, adsorción y acción terapéutica. El objetivo de este trabajo fue encapsular los compuestos bioactivos extraídos de la pulpa de café mediante secado por aspersion utilizando como material de pared almidón de malanga (*Colocasia esculenta*) modificado dualmente y determinar su actividad antihelmíntica *in vitro*, así como la resistencia a la degradabilidad ruminal de las microcápsulas *in vitro*. Para ello, se realizaron los ensayos *in vitro* para determinar la actividad antihelmíntica del extracto evaluando diferentes concentraciones, así como la actividad hemolítica. El almidón de malanga fue funcionalizado mediante modificación física con molino de bolas de nitruro de silicio durante 30 minutos, seguida de una segunda modificación por entrecruzamiento. Los materiales de pared obtenidos fueron caracterizados fisicoquímica, térmica, reológica y morfológicamente.

La encapsulación del extracto se realizó mediante secado por aspersión usando maltodextrina GDE (Grado de Dextrosa) 10 como testigo, almidón nativo, almidón nativo entrecruzado, molienda de 30 min y su homólogo entrecruzado. Las microcápsulas obtenidas fueron caracterizadas y se les evaluó la actividad antihelmíntica y la degradabilidad ruminal *in vitro*. El extracto hidroalcohólico de pulpa de café inhibió la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* y afectando la viabilidad de las larvas infectantes L3. El almidón de molienda de 30 minutos fue el material de pared que mostró las mejores propiedades siendo el material de pared apto en procesos de encapsulación como el secado por aspersión que mantiene la viabilidad de los compuestos responsables de la actividad biológica del extracto hidroalcohólico de pulpa de café sobre *Haemonchus contortus* en fase de huevo con 98% de la inhibición de la eclosión a 200 mg/mL con respuesta dosis dependiente y el 77% de mortalidad larvaria mostrando la misma tendencia dosis respuesta. Finalmente, el análisis de degradabilidad mostró que en un proceso de digestión ruminal *in vitro* que solo el 3.2 % de los microencapsulados eran degradados infiriendo resistencia por parte del material de pared.

En conclusión, las microcápsulas preparadas con almidón de molienda de 30 minutos mostraron los mejores resultados actuando como material de pared y, por lo tanto, este material funcionalizado mediante un método físico muestra propiedades similares a las de maltodextrina, la cual es ampliamente utilizada como material de pared pudiendo competir en el mercado como un agente encapsulante de menor costo al ser obtenido de una fuente de almidón no convencional.

ABSTRACT

Sheep production is one of the most important livestock activities in Mexico. However, the production units face the presence of *Haemonchus contortus* one of the most prevalent and highly pathogenic nematode parasites of small sheep ruminants. The development of resistance and degradation of active compounds of conventional anthelmintic drugs has led producers and researchers to look for control alternatives that have a lower environmental impact and represent a lower expenditure on deworming programs in the production units. There are reports that the coffee pulp hydroalcoholic extract exhibits anthelmintic activity due to a group of compounds of a phenolic nature, which are sensitive to external conditions (pH, O₂, enzymes or microorganisms) that suffer during the digestion process. An alternative for the protection of the compounds of interest is encapsulation with the help of a wall material offering advantages in application, dosage, resistance to gastric juices, adsorption and therapeutic action. The objective of this work was to encapsulate the bioactive compounds extracted from coffee pulp by spray drying using as modified wall material malanga starch (*Colocasia esculenta*) and determine its *in vitro* anthelmintic activity, as well as resistance to ruminal degradability of the microcapsules *in vitro*. For this, *in vitro* tests were performed to determine the anthelmintic activity of the extract evaluating different concentrations, as well as hemolytic activity. Malanga starch was functionalized by physical modification with silicon nitride ball mill for 30 minutes, followed by a second cross-linking modification

The wall materials obtained were characterized physicochemical, thermally, rheological and morphologically. The encapsulation of the extract was performed by spray drying using GDE maltodextrin (Dextrose Grade) 10 as control, native starch, crosslinked native starch, 30 min grinding and its crosslinked counterpart. The microcapsules obtained were characterized and the anthelmintic activity and ruminal degradability were evaluated *in vitro*. The hydroalcoholic extract of coffee pulp inhibited the hatching of *Haemonchus contortus* eggs and affecting the viability of the infecting larvae L3. The 30-minute grinding starch was the wall material that

showed the best properties, the wall material being suitable in encapsulation processes such as spray drying that maintains the viability of the compounds responsible for the biological activity of the hydroalcoholic extract of pulp coffee on *Haemonchus contortus* in egg phase with 98% of hatching inhibition at 200 mg / mL with dose dependent response and 77% larval mortality showing the same dose response trend. Finally, the degradability analysis showed that in a process of *in vitro* ruminal digestion that only 3.2% of the microencapsulates were degraded by inflating resistance by the wall material.

In conclusion, the microcapsules prepared with 30-minute grinding starch showed the best results acting as a wall material and therefore, this material functionalized by a physical method shows properties similar to those of maltodextrin, which is widely used as a material of wall being able to compete in the market as a lower cost encapsulating agent when obtained from an unconventional starch source.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial México ocupa el 4to lugar en producción ovina debido a que cuenta con estados productores de leche, carne y lana, con un total de 8, 792,663 cabezas en todo el país. Se tienen registradas alrededor de 53,000 unidades de producción distribuidas en las diferentes regiones del país, de las cuales se estiman 61,606,105 toneladas de producción (SIAP, 2017).

En zonas tropicales la producción ovina se ve afectada por la presencia de parásitos causantes de trastornos gastrointestinales que afectan el bienestar y salud de los animales, limitando así aspectos productivos, reproductivos, medioambientales y económicos (Partida de la Peña, 2013). Tal es el caso de *Haemonchus contortus*; nematodo gastrointestinal hematófago que causa signos como anemia (asociada al consumo de sangre por parte del parásito), trastornos digestivos, anorexia y en casos graves la muerte, reflejado en grandes pérdidas económicas directas e indirectas (Lane, 2015).

Existen en el mercado una amplia variedad de antihelmínticos que hasta hace algunos años eran efectivos. Sin embargo, nematodos como *Haemonchus contortus* han desarrollado mutaciones generacionales que los han hecho resistentes al tratamiento convencional (Kaplan, 2004).

Para contrarrestar los efectos de resistencia a fármacos las alternativas de control mediante el uso de plantas medicinales representan una alternativa viable pero además ambientalmente sustentable y la cual se basa en el uso compuestos fenólicos, saponinas y alcaloides que pueden afectar de forma significativa en alguna de las fases del ciclo de vida de los nematodos (Niezen, 2002).

La pulpa de café representa un material vegetal con potencial de extracción de fitoquímicos de interés farmacéutico y alimentario (Leandro, 2015). Dichos residuos tienen una cantidad importante de compuestos bioactivos como fenoles, alcaloides entre otros, los cuales han demostrado poseer actividad letal contra nematodos de importancia veterinaria, por lo que su uso como antihelmíntico es prometedor para su futura aplicación farmacológica.

Sin embargo, presentan la limitación al ser administrados de forma directa por posible degradación durante la fermentación ruminal y por lo tanto pérdida de la actividad biológica. Para ello, la encapsulación representa una de las alternativas con la intención de proteger los compuestos bioactivos de los factores que afecten su integridad y funcionalidad. (Ribeiro, 2017).

Existen diferentes materiales que son utilizados como material de pared para el proceso de encapsulación como; lípidos, proteínas y carbohidratos, dentro de los carbohidratos se encuentran las maltodextrinas y gomas por mencionar algunos y que son considerados materiales de calidad para el proceso de encapsulación. No obstante, tienen la limitante del costo elevado que implica la obtención de estos materiales. Sin embargo, en la actualidad se sigue investigando sobre la producción de nuevos materiales que sean fáciles de obtener y de bajo costo, que cumplan con las características adecuadas para ser utilizadas en el proceso de encapsulación (Aguilar, 2013).

El almidón es uno de los carbohidratos más abundantes en el medio ambiente y se puede aislar de diferentes fuentes como los cereales, frutas y tubérculos. La malanga o taro es una herbácea perteneciente a la familia *Araceae* (Torres, 2015). Este polímero es apto para cumplir la función de agente encapsulante debido a sus características fisicoquímicas. Además, dichas características pueden ser mejoradas realizando modificaciones por distintos métodos como los físicos, químicos y enzimáticos (Neira, 2013).

Basándose en lo anterior el objetivo del presente trabajo de investigación fue encapsular los compuestos bioactivos presentes en el extracto de pulpa de café utilizando almidón modificado de malanga como material de pared y evaluar su actividad contra *Haemonchus contortus in vitro*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia de la producción ovina en México

A nivel mundial la producción de carne ovina ocupa un lugar importante en cuanto a consumo, de acuerdo con datos de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), el 5% representa el consumo de carne de origen animal y se tienen inventariados cerca del 1,080,000 cabezas a nivel cosmopolita. China es considerando el mayor productor de carne ovina a nivel mundial debido a su creciente población. Sin embargo, su mercado interno no le permite exportar, por lo que todos los productos y subproductos son para el abasto interno (Partida de la Peña *et al.*, 2013). El segundo mayor sector de ovinos es Australia seguido de Nueva Zelanda, que actualmente son grandes exportadores de borregos de desecho, estos animales son retirados del ganado por considerarse no productivos al no cumplir con fenotipo deseado, problemas de salud o ha cumplido un ciclo productivo, esto con la finalidad de que el ganado se vuelva viejo en improductivo, por lo tanto son destinados para abasto en el mercado internacional incluido México (Fernández, 2001).

México es un país considerado diverso a nivel climático, el cual es un factor importante que favorece la producción de forrajes que en su mayoría están destinados a la alimentación del ganado. Una de las actividades más difundidas en el país es la ovinocultura que ocupa el 4to lugar a nivel mundial en producción ovina, debido a que cuenta con estados productores de leche, carne y lana, con un total de inventario de 8, 792, 663 cabezas de ganado en todo el país de las cuales se tienen registradas un 16% en el Estado de México y un 13% en el Estado de Hidalgo y Oaxaca con un 10%, lo que posiciona a este último estado como el cuarto lugar en producción ovina, donde al menos el 34% de la población se dedicada a esta actividad económica (Bautista, 2017), siendo el sustento principal de familias de zonas rurales.

En el estado se tienen registrados 5003 unidades de producción en los 570 municipios con los que cuenta; siendo las regiones Mixteca, Istmo y Valles centrales las que concentran el 74.78% de las unidades de producción (SIAP, 2017). En función de factores biológicos, ambientales, instalaciones, manejo, tecnología, alimentación, programas de medicina preventiva, maquinaria y equipo con los que se cuente, las unidades de producción se pueden clasificar como: unidades de traspatio, transición y tecnificado o empresarial (Partida de la Peña, 2013).

Existen registros en donde se ha reportado que en el estado de Oaxaca el 4.7% de las unidades de producción son consideradas como tecnificadas, el 33% en transición y el 62.3% de traspatio, dichas unidades se caracterizan proporcionar una alimentación a base de pastoreo, con poco o nulo suministro de minerales, en lo referente a sanidad, solo se aplican desparasitantes de forma irregular y solo cuentan con un corral de encierro por lo que los animales son más propensos a contraer diversas enfermedades (Bautista, 2017).

2.2 Impacto de las parasitosis en la producción ovina

En la producción ovina existe una gran variedad de microorganismos que pueden afectar de forma negativa la salud de esta especie, principalmente en zonas tropicales y subtropicales del país que presentan condiciones medioambientales favorables para el desarrollo de nematodos gastrointestinales que tienen un impacto significativo en la producción ovina, ya que los animales suelen morir por falta de tratamientos oportunos y efectivos para disminuir o eliminar las manifestaciones clínicas que impactan negativamente la respuesta productiva y reproductiva de los animales (Miller, 2010).

El estado de Oaxaca es considerado como uno de los más diversos en cuestión ambiental, es posible encontrar climas áridos, fríos, cálidos y húmedos. La región del Papaloapan es una zona que cuenta con condiciones medioambientales (humedad relativa, temperatura y pluviosidad) favorables para el desarrollo de parásitos como *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus spp*, *Cooperia oncophora*, *Chabertia ovina* entre otras.

Las larvas infectantes se encuentran en vida libre principalmente en los pastos, en esta etapa de su vida el parásito tiene la capacidad de adaptarse a diversas condiciones de humedad, temperatura, luminosidad e incluso al tipo pasto que ingiere el ganado (Kaplan, 2004). La fluctuación de humedad que se encuentra en el suelo es un factor que contribuye al aumento de la población nematodos gastroentéricos. Estudios recientes han determinado que tienden a sobrevivir con una humedad relativa de 40-60 % ya que requieren de una película de agua que le beneficie para su incubación y movimiento (Anderson, 2005).

Entre los nematodos gastrointestinales que más afectan a los pequeños rumiantes como los ovinos se encuentra *Haemonchus contortus*, nematodo gastrointestinal de ciclo de vida directo, cuyo órgano blanco es el abomaso, órgano en el que causa un síndrome de mala absorción y debido a que es un nematodo hematófago provoca anemias que en muchos casos puede llevar a la muerte (Liebano, 2011). Las parasitosis gastroentéricas poseen una gran relevancia debido a su carácter cosmopolita, ocasionando grandes pérdidas económicas que pueden ser directas como la muerte de los animales reflejado en la tasa de mortalidad del 20 al 50%, o indirecta que se manifiesta en el retraso del crecimiento de los animales, diarreas persistentes y baja producción; estas vertientes están involucradas en la pérdida de peso de hasta un 50% de los animales (Nari, 2011).

2.3 Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*

El ciclo de vida de *Haemonchus contortus* (Figura 1) es de tipo directo, las larvas L3 son ingeridas por el hospedero en el pasto, se convierten en adultos infecciosos en el abomaso y producen huevos que se eliminan en las heces. Los huevos se incuban en las heces y sufren dos mudas, convirtiéndose en larvas L3 que pueden migrar por las hojas de la hierba en gotas de humedad. En condiciones adecuadas, el huevo depositado en las heces tarda solo 3-4 días en desarrollarse en la etapa L3. Dependiendo de la temperatura y la humedad, las larvas L3 pueden sobrevivir en el pasto hasta 6 meses. (Paddock, 2010).

Los huevos de *Haemonchus contortus* tienen una medida promedio de entre 70-85 micras conteniendo un embrión de 16 a 32 células. En caso de contar con las condiciones ambientales requeridas este se desarrollará entre las primeras 24 a 30 horas de incubación, por acción de enzimas como las quinazas y las proteasas rompen la pared de los huevos permitiendo entonces la ecdisis de larva en su primer estadio (L1), cuya medida es de 369 μm de longitud total, su estructura consta de cavidad oral y un aparato bulbar característico en forma de "Y". Posteriormente la larva sostiene un segundo proceso de modificación en donde muda su epidermis, esto al completar su crecimiento a larva (L2), en donde aún mantiene algunas características en cuestión de morfología y mide 516 μm en promedio, en este mismo estadio sufre una segunda ecdisis. Sin embargo, en esta segunda muda la nueva epidermis no será desechada ya que esta la provee de protección contra las inclemencias del tiempo como el frío, calor y radiación solar. Las larvas en los estadios L1 y L2 no tiene la capacidad de infectar a un individuo ya que no cuenta con la capacidad de sobrevivir a la acción de los jugos gástricos (Anderson, 2005).

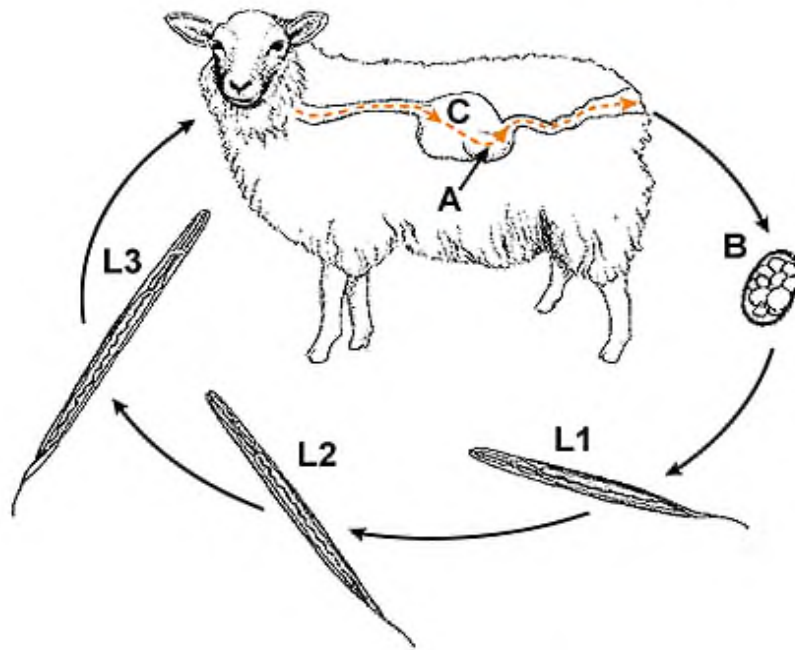


Figura 1.- Ciclo biológico de *Haemonchus contortus* (L1) larva 1, (L2) larva 2 y (L3) larva 3 (Johnstone, 1998).

2.4 Métodos convencionales para el control de parasitosis, resistencia antihelmíntica y alternativas de control

Los antihelmínticos en el mercado están agrupados de acuerdo con su naturaleza química y los efectos sobre el parásito. En este sentido los benzimidazoles, imidazotiazoles y las lactonas macrocíclicas son de los compuestos más empleados por considerarse de amplio espectro (Medina, 2014). Sin embargo, el uso excesivo e inadecuado de fármacos de origen sintético además de generar un costo monetario importante para el productor, es una de las causas que ha orillado a originar poblaciones de nematodos gastrointestinales resistentes a este tipo de principios activos (Kaplan, 2004).

La resistencia antihelmíntica es un fenómeno a nivel cosmopolita caracterizado por la disminución gradual del efecto antihelmíntico sobre los parásitos de todas las especies, incluyendo la humana (Medina, 2014). Además, esta es una capacidad heredable del helminto que les permite continuar su ciclo de vida pese al tratamiento a dosis terapéutica, que normalmente causan la inhibición de la eclosión o bien la muerte de los parásitos en una población susceptible (Torres, 2007).

De forma adicional, el uso de este tipo de compuestos genera una preocupación de índole ambiental, ya que de un 100% de fármaco administrado durante el tratamiento, tan solo el 30% es responsable del efecto sobre los parásitos y el 70% restante es desechado en heces y orina, lo que representa un daño para con el medio ambiente (Herve, 2006).

Se han desarrollado alternativas que están basadas en ser amigables con el medio ambiente, ser disponibles para los productores y ser efectivas como método de control frente a poblaciones resistentes a principios activos sintéticos. Además, de ofrecer productos orgánicos cuyo objetivo es garantizar la inocuidad y calidad de los alimentos de origen animal como leche y carne (Nari, 2011). Dentro de estas alternativas se encuentra el uso de agujas de cobre, hongos nematófagos, manejo de pastoreo y herbolaria; que han demostrado tener un efecto sobre los helmintos sin afectar la inocuidad de los alimentos, lo que permite el consumo durante el tratamiento (Von Son-de Fernex *et al.* 2015).

Dentro del control de parásitos se han utilizado diversas plantas que contienen sustancias bioquímicas a las que se les atribuye el efecto antihelmíntico (Martínez, 2010) , como los taninos, terpenoides, saponinas y otros compuestos polifenólicos que afectan de forma significativa alguna de las fases del ciclo vital de los nematodos gastrointestinales (Newman, 2016).

Estos compuestos son denominados metabolitos secundarios; que son compuestos químicos sintetizados a partir de excedentes del metabolismo primario que no participan en el crecimiento, pero si en la supervivencia de las plantas ya que actúan como método de defensa ante situaciones de estrés o para no ser ingeridas por los animales (Castillo, 2014).

La búsqueda de los metabolitos secundarios con propiedades en diversas vertientes como agronomía y la producción de insecticidas o en la industria farmacéutica, (Figueiredo, 2008) está basada en el uso tradicional de distintas plantas a las que de forma empírica se les atribuyen múltiples actividades biológicas.

Con este enfoque Hernández y López (2000) estudiaron el efecto antihelmíntico de extractos de las siguientes plantas medicinales: estafiate (*Artemisia ludoviciana*), epazote (*Dysphania ambrosoides*), semilla de calabaza (*Cucurbita sp*) y ajo (*Allium sativum*), reportando una acción antiparasitaria variable y con eficacia de moderada a baja en comparación con antihelmínticos comerciales como la ivermectina. De igual forma, Martínez *et al.*, (2010) evaluó el efecto de plantas ricas en taninos y otros compuestos antioxidantes como *Lysolima latisiliquum*, *Onobrychis viciifolia* y *Chinopsis sp*, donde sugiere que los compuestos presentes intervienen en la movilidad, metabolismo y posiblemente en la reproducción de los nematodos.

No obstante, la evaluación de distintas plantas sigue siendo objeto de estudio debido a que comparten muchos de los metabolitos secundarios con diversas actividades. Tal es el caso de la planta de café, que comparte con una amplia variedad de frutos y vegetales su contenido de metabolitos como compuestos polifenólicos (ácido clorogénico, ácido cafeico, ferúlico y cumárico), un grupo variado y complejo de antioxidantes naturales a los que se les atribuyen diferentes actividades biológicas como antibacteriana, antifúngica entre otras (Zudaire, 2010).

2.5 El café y su producción en México

El cafeto es un arbusto originario del continente africano del grupo de las *Coffeáceas*, siendo la *Coffea arábica* la principal y más cultivada en numerosas partes del mundo, posicionándolo como uno de los productos básicos que más se comercializa en el mundo. Este producto no solo representa un importante origen de divisas, sino una de las principales fuentes de ingresos de las zonas rurales (Echeverri, 2005). Para México, el café representa una de las actividades estratégicas que emplea a cerca de 500 mil productores, con un aproximado de 600 mil hectáreas sembradas en 12 entidades federativas y 391 municipios; esta involucra una derrama en la exportación de 897 millones de dólares anuales, colocándolo como el principal productor de café orgánico en el mundo (SIAP, 2017).

En los últimos 4 años se dispone de un inventario en campos renovados por 450 millones de plantas, cuyos incrementos de producción se verán reflejados en un lapso de aproximadamente 5 años según datos de la FAO.

En el sur de México estados como Chiapas, está considerado como el pionero en producción de café liofilizado, debido a la instalación de la primera planta de café liofilizado en México y Centroamérica, que procesa 4,200 toneladas de café al año, principalmente para abastecer los mercados europeos y japoneses (SIAP, 2017).

Debido a que la planta de café requiere de condiciones climáticas específicas, es que los estados con una alta producción de café se encuentran en el sur de México, principalmente en estados como Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Puebla que representan un 84% de superficie sembrada, seguido de Guerrero, San Luis Potosí, Nayarit e Hidalgo con 15%, finalmente, Jalisco, Querétaro, Colima y Tabasco con el 1% (AMECAFE, 2017).

2.6 Residuos del café

Es claro que, en los países productores de café, los residuos y los subproductos de su procesamiento constituyen una fuente de grave contaminación por las grandes cantidades de desechos que generan problemas ambientales (Wong, 2013). Dichos residuos en su mayoría están conformados por cafeína, melanoidinas y polifenoles en general, por lo que dada su naturaleza se pueden llegar a considerar tóxicos en altas concentraciones y representan un riesgo para el medio ambiente al no ser tratados de forma adecuada para evitar alguna repercusión al medio ambiente (Silva, 2011).

De acuerdo con la morfología del fruto del café (Figura 2) es que se derivan diversos residuos durante su procesamiento, el cual está conformado por el endospermo (grano del café), endocarpio (cascara o cascarilla) y mesocarpio (pulpa) (AMECAFE, 2017).

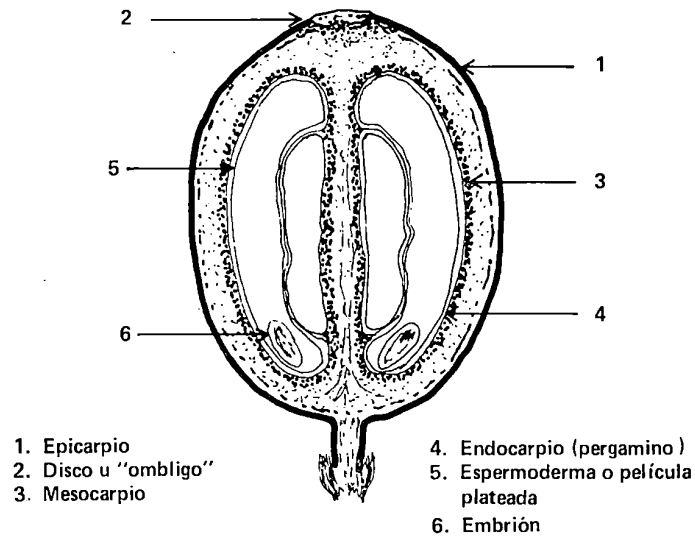


Figura 2.- Corte longitudinal del grano de café (Solá *et al.*, 2000).

El procesamiento del café consta de dos operaciones, un proceso húmedo, del cual proviene la pulpa, mucilago y aguas de desecho. El segundo proceso consta de separar la cascara o cascarilla del grano del café (Machado, 2009).

En el caso de la pulpa desde mediados del siglo pasado se ha buscado proponer alternativas de aplicación, como la producción de biogás, pienso para la alimentación del ganado y abono (Rathinavelu, 2005). Sin embargo, debido a su composición es que ha resultado difícil la aplicación en diferentes áreas.

En años recientes se ha evaluado la capacidad de 7 diferentes cepas fúngicas para crecer y liberar compuestos fenólicos de residuos de café en condiciones de cultivo sólido con el objetivo de desintoxicación biológica de este material y así poder emplearlo como abono, en efecto las cepas *Aspergillus niger* y *Neurospora spp*, mostraron una buena capacidad de liberación de compuestos fenólicos de la estructura del material por lo que se propone como una desintoxicación biológica para su posterior aprovechamiento (Borelli, 2004).

Se ha evaluado la posibilidad de que estos desechos pudieran formar parte de la dieta en animales como los rumiantes, conejos y pollos, pero el alto contenido de lignina limita su uso. Demostró que puede usarse como una fuente potencial para la producción de biodiesel y pellets de combustible (Rathinavelu, 2005).

Otra de sus aplicaciones es a nivel industrial como combustible en las calderas de la misma industria debido a su alto poder calorífico de aproximadamente 5,000 kcal/kg. Sin embargo, esta debe de considerarse por la producción de material particulado afectando la calidad del aire por lo que su uso ha sido descartado (Silva, 2011).

Por otro lado, en el área farmacológica, debido a la composición química de estos residuos es que la industria ha centrado sus investigaciones por considerarse un residuo como fuente de antioxidantes entre otros compuestos. Y, por ende, como un alimento útil para proteger al organismo (Machado, 2009).

En una investigación realizada por Ortiz *et al.*, (2016) empleando un extracto acetónico de percolado de café demostró que este posee actividad antihelmíntica de forma *in vitro*. Sin embargo, al realizar la prueba *in vivo* alimentando a los animales con el percolado no logro observar dicha actividad y concluye que la ausencia de la actividad podría deberse a la degradación de los compuestos antes de llegar al abomaso y a la baja susceptibilidad a los compuestos secundarios de plantas ricas en taninos que presento el aislado de *Haemonchus contortus*.

2.7 Composición química del café y sus residuos

La composición química de los subproductos del café tiene una variación en relación con el método de procesamiento en seco, húmedo, tostado y elaboración de cerveza, con notables cambios principalmente en contenido de fibra, carbohidratos y cafeína (Pandey, 2000).

La materia seca está constituida por minerales y sustancias orgánicas como carbohidratos, lípidos y proteínas. Además, compuestos como alcaloides, trigonelina, algunos ácidos carboxílicos y fenólicos (Moore, 2008).

Uno de los compuestos en mayor abundancia es la cafeína como componente principal del café y tiene capacidad de penetrar la membrana celular para activar la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático e induce una contracción transitoria de disminuye a medida que el calcio se remueve del citosol (Echeverri, 2005). Existen reportes que mencionan los beneficios del consumo de cafeína que incluyen un menor riesgo de padecer diabetes mellitus tipo dos y obesidad (Hino, 2007).

Otros estudios revelan que altas concentraciones de cafeína pueden ser toxicas de acuerdo con bioensayos realizados con embriones de pollo muestran actividad teratogénica y proliferación neuronal interrumpida (Borelli, 2004). No obstante, Almeida *et al.* (2015) demostraron la capacidad prebiótica y antimicrobiana de los residuos del café, atribuyendo dicha capacidad a la producción de melanoidinas, el cual es un compuesto generado durante la fase seca del procesamiento del café y que además se ha demostrado su potencial antioxidante, antihipertensivo, y antifúngico.

Una de las actividades biológicas que se les atribuye a los compuestos del café es la actividad antioxidante, concretamente los polifenoles debido a su potencial beneficioso para la salud. Los polifenoles son agentes antioxidantes que ayudan a combatir el daño por radicales libres y ayudan a hacer frente al estrés oxidativo (Renouf, 2010). Una subdivisión de los fenoles son los taninos, que se encuentran comúnmente en la corteza de plantas vasculares y menor medida en hojas, frutos, flores y semillas (Osman, 2012). Estos compuestos son considerados anti nutricionales lo que limita su uso dentro de la dieta animal (Pandey, 2000). Los taninos, sin embargo, parecen mostrar otras actividades biológicas como antibacterianos, antiinflamatorios, anticolinérgicos además de ayudar en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (De Nicola, 2007). Algunos reportes existentes mencionan que los efluentes industriales se aproximan a concentraciones de taninos de 100 mg/L (Koyunluoglu, 2006).

En un estudio realizado por Palomo *et al.* (2012) en caprinos infectados con *Haemonchus contortus* mostró que el consumo de un alimento que contiene el subproducto percolado de *C. arábica* ocasiona un efecto antihelmíntico evidente con relación a la fecundidad y al tamaño de las hembras de *H. contortus*. Sin embargo, el porcentaje de reducción del desenvaine de forma *in vitro* fue variada, la cual puede deberse a la diferencia del procesamiento como secado, tostado, percolado y extracción de los compuestos presentes en el extracto. En la evaluación antihelmíntica *in vivo* fue observada una actividad nula. No obstante, las investigaciones también sugieren que los metabolitos secundarios pudieran llevar a cabo las actividades biológicas antes mencionadas de forma individual o bien de forma sinérgica, dado que de forma natural estos compuestos tienen la finalidad de conferir a las plantas procesos de defensa y supervivencia (Herve, 2006). Sin embargo, por su naturaleza los compuestos tienen la limitante de ser altamente sensibles a diferentes factores del medio interno como el pH, temperatura, actividad enzimática y degradación por microorganismos, así como del medio externo como la degradación por rayos UV, actividad de agua, temperatura y humedad relativa (Quesada, 2009).

Al considerarse compuestos con potencial en la industria farmacéutica, surge la necesidad de la búsqueda de alternativas con la finalidad de protegerlos contra los factores que afecten su actividad biológica.

La encapsulación es una excelente alternativa para la protección de compuestos manteniendo la viabilidad de una gran cantidad de compuestos bioactivos. Existe una variedad de materiales de diversas fuentes (proteínas, lípidos y carbohidratos) que son utilizados como material de pared para la encapsulación de compuestos bioactivos (Desai *et al.*, 2005). Debido a los costos de importación de algunos materiales, se han buscado fuentes no convencionales como el uso del almidón por ser uno de los polisacáridos más abundante en la naturaleza y las diversas aplicaciones para el proceso de encapsulación.

La ventaja de utilizar este tipo de materiales es que las fuentes de las cuales provienen son de fácil acceso y su costo de obtención es menor. También cabe señalar que el uso de polisacáridos se ha utilizado para la encapsulación de enzimas, y algunos fármacos, mostrando un amplio campo de aplicaciones futuras (Neira *et al.*, 2013).

2.8 Encapsulación

La encapsulación es un proceso tecnológico que permite contener una sustancia o agente activo en el interior de otra que recibe el nombre de recubrimiento (Borelli, 2004). Este proceso mejora la incorporación de moléculas bioactivas o nutraceuticas (antioxidantes, minerales, vitaminas, luteínas, ácidos grasos, etc.), así como de células vivas (probióticos). Existen diversas razones para emplear el método de encapsulación, una de ellas es proporcionar una barrera física entre los compuestos bioactivos sensibles y el medio ambiente, lo que permite estabilizarlo durante el procesamiento reduciendo la degradación por oxidación o hidrólisis, de esta manera incrementa la biodisponibilidad de los principios activos (Desai K. G., 2005). Además, permite que el mecanismo de liberación sea controlado con relación al tiempo o condiciones específicas (Nedovic, 2011).

El tamaño de partícula obtenido dependerá de la técnica utilizada para la encapsulación. Thies (2013) menciona que se puede considerar como microcápsulas a aquellas partículas con un tamaño entre 1-1000 μm , partículas menores a 1 μm se consideran nanopartículas y aquellas mayores a 1000 μm se pueden definir como macrocápsulas. El uso de estas tecnologías permite incrementar la viabilidad de compuestos sensibles como vitaminas, disminuir la evaporación y degradación de bioactivos volátiles (Fathi, 2012).

Para la producción de las cápsulas se han propuestos diversos métodos que se dividen en procesos físicos, fisicoquímicos y químicos. La selección del método dependerá del tamaño de cápsula requerido, propiedades fisicoquímicas del encapsulante y la sustancia a encapsular, la aplicación del material encapsulado, mecanismo de liberación y el coste (Saupe, 2004).

2.8.1 Materiales de pared

Los materiales de pared son aquellos materiales con la capacidad de formar una película alrededor de un núcleo con el objetivo de proteger y permitir su liberación bajo condiciones específicas a una velocidad controlada.

Existe una amplia variedad de materiales de distintas fuentes para encapsular como pueden ser gomas (acacia, carragenina, alginato de sodio), carbohidratos (almidón, quitosano, sacarosa, jarabe de maíz), lípidos (ceras, parafinas, aceites, grasas, tristearina), proteínas (gluten, caseína, albumina) y algunos materiales inorgánicos (sulfato de calcio, silicatos). Sin embargo, algunos de estos materiales muestran un comportamiento y características diferentes en las técnicas de encapsulado empleadas (Gharsallaoui, 2007).

La selección del material de pared depende principalmente de las características fisicoquímicas del encapsulante y las características del compuesto a encapsular, por lo que dependiendo de estas vertientes el compuesto se liberará a través de diversos mecanismos como hinchazón, disolución o degradación (Desai *et al.*, 2005). Por otro lado, es importante considerar que el material de pared sea compatible con los métodos de encapsulación en cuanto a su comportamiento durante el proceso de encapsulado, ya que se pueden comportar de una manera diferente en los distintos procesos y se verá reflejado en la calidad, estabilidad y eficiencia del encapsulado.

Algunos reportes como el de Fathi *et al.*, (2012) sugieren que los sistemas de entrega basado en carbohidratos pueden interactuar con una gran cantidad de compuestos bioactivos a través de los grupos funcionales, lo que los hace portadores más versátiles que se unen y atrapan una gran variedad de ingredientes alimentarios bioactivos hidrófilos e hidrófobos.

Por otra parte, se consideran como una coraza adecuada bajo procesos de alta temperatura debido a su estabilidad en comparación con otros sistemas a base de lípido y proteínas que tienden a desnaturalizarse (Gharsallaoui, 2007). Finalmente, las aplicaciones que tendrán los encapsulados son criterios que de igual forma están relacionados con el método de encapsulado y de ello dependerá si es aplicado algún método físico, químico o físico- químico.

2.8.2 Métodos de encapsulación

La encapsulación de los ingredientes activos se puede llevar a cabo por diferentes métodos, el cual está relacionado con las propiedades del centro activo y del material de pared que se pretende utilizar (Desai K. G., 2005). De forma general se pueden apreciar 3 procesos de encapsulación, los fisicoquímicos (coacervación simple, evaporación emulsión-solvente y atrapamiento por liposomas), químicos (polimerización interfacial e inclusión molecular) y físicos (secado por aspersion, extrusión y liofilización) (Gharsallaoui, 2007).

La encapsulación por el método de secado por aspersion es uno de los métodos más usados en la industria de los alimentos , el cual consiste en la dispersión de sustancias a encapsular con el agente encapsulante, seguido de una atomización de la muestra en una cámara a alta temperatura, por lo que el solvente es evaporado rápidamente y quedando el compuesto activo atrapado dentro de una película del material utilizado (Figueroa, 2016).

Comúnmente el encapsulado obtenido mediante el secado por aspersion tienen un tamaño aproximado de 10-50 μm o bien 2-3 mm, de esto dependerá el tipo de secador que se utilice y del material de soporte empleado, así como las condiciones de operación (Rapelo, 2013).

Una limitante de este método está relacionada con los materiales de recubrimiento disponibles debido a que en la industria se lleva a cabo a partir de formulaciones acuosas, por lo tanto, el material de pared debe cumplir con ser soluble en agua entre otras características (Desai K. &, 2005).

La diversidad de los materiales que son utilizados en la encapsulación se debe a que no todos cumplen con las características adecuadas para este método de encapsulación.

Uno de los materiales más usados como encapsulante empleando secado por aspersión es la goma arábica por sus buenas características como encapsulante. Sin embargo, la producción de estos para el caso de México es una de las grandes limitantes, ya que su precio de importación en el caso de las gomas asciende a los 4 millones de dólares anuales. Por esta razón diversas investigaciones se han encaminado a la búsqueda de nuevas fuentes de materiales para encapsular y aminorar los costos en importación.

Los polisacáridos representan a uno de los materiales con mayor uso y aplicaciones en alimentos y encapsulación de nutraceuticos debido a las características que poseen (Nedovic, 2011). Estos pueden ser aislados a partir de semillas, algas, exudados, tubérculos y algunos frutos. Se ha demostrado que los sistemas de encapsulación basados en carbohidratos como el almidón son aptos en la para interactuar con una amplia gama de compuestos bioactivos por medio de sus grupos funcionales, lo que hace que sean más versátiles, biocompatibles y biodegradables.

2.9 Almidón

Es un polisacárido considerado como una fuente energética de reserva en las plantas y puede ser comúnmente encontrado en productos como los cereales, tubérculos, leguminosas y algunas frutas (Sefa-Dehen, 2002). El almidón de forma general está constituido por dos polímeros que influyen en su funcionalidad; la amilosa, que consta de unidades lineales de D-glucosa α 1-4 y pocas ramificaciones con enlaces α 1-6 (Bello, 2006). Tiene la característica de formar una hélice y en algunos estudios se sugiere que se entrelazan incluso a través de la amilopectina.

Además, tiende a formar un complejo muy fuerte con el yodo produciendo una coloración azul intensa. Debido a esta característica se pueden hacer análisis rápidos de contenido de amilosa de forma cualitativa.

A diferencia de la amilosa, la amilopectina es altamente ramificado con cadenas cortas de enlaces α 1-4, que se ramifican en los enlaces α 1-6 entre cada 25 o 30 unidades de glucosa y es sintetizado usando glucosa-1-fosfato a través de una serie de reacciones enzimáticas complejas (Luallen, 2017). Son definidos dos grupos de cadenas que la conforman, las cadenas A y las cadenas B. Los racimos están asociados a las cadenas A principalmente y son responsables de las regiones cristalinas dentro del gránulo. Las áreas amorfas se pueden presentar cada 0.6-0.7 nm y son los que contienen la mayor cantidad de enlaces α 1-6 por lo que son las áreas con mayor susceptibilidad a ser atacadas por agentes hidrolíticos (enzimas y ácidos) (Bello, 2006).

La biosíntesis de los gránulos de almidón se inicia en el hilio, el centro orgánico del gránulo y las cadenas de almidón se alargan radialmente hacia la periferia por oposición. Además, tienen la característica de ser insolubles en agua a temperatura ambiente y en la mayoría de los solventes orgánicos (Sefa-Dehen, 2002).

La amilosa y la amilopectina al ser sus componentes principales son las que confieren diferentes propiedades en su conjunto al gránulo de almidón y que generalmente se consideran para determinar la aplicación a diferentes áreas y productos.

Con el paso de los años los almidones han sido utilizados ampliamente en diferentes aplicaciones industriales no alimenticias como papel, cartón, cosméticos y algunos productos farmacéuticos (Lalduhsanga, 2013).

En el ámbito de la industria farmacéutica ha sido estudiado el almidón nativo de taro como un excipiente farmacéutico. Sarkar *et al.* (2015) demostraron que la liberación de paracetamol de la tableta se retrasó en medios gastrointestinales simulados hasta aproximadamente 8 h cuando se usaron diferentes cultivares de *C. esculenta* al noroeste de la india. También se encontró que el almidón de taro en su forma nativa era comparable con el almidón de maíz estándar como disgregante en la formulación de comprimidos.

Al considerarse los compuestos bioactivos dentro de la industria alimentaria y farmacéutica se ha dado un giro en la combinación de ambas áreas, dado que el almidón no solo puede ayudar en el mecanismo de liberación de fármacos, sino que también de compuestos conocidos como nutraceuticos. Yousof *et al.* (2018) prepararon nanopartículas de almidón de diferentes fuentes botánicas, empleando el método de nano precipitación, determinaron que las nanopartículas se veían afectada por el origen del almidón y se reflejaba en el porcentaje de carga de quercetina, cinética de liberación y actividad antioxidante. Dando como resultado que el almidón de fuentes como cereales tenían baja eficiencia en la encapsulación en comparación con las nanopartículas de tubérculos y leguminosas.

En los últimos años se ha considerado como uno de los polímeros de origen natural que es biocompatible, biodegradable y muestra propiedades de bioadherencia, convirtiéndolo en uno de los polímeros naturales más prometedores y sobre todo al ser el segundo material de biomasa más abundante en la naturaleza por encontrarse en raíces, tallos, semillas y cultivos básicos (Le Corre *et al.*, 2010). No obstante, la elección de la fuente de almidón y sus aplicaciones dependerán de factores como región, clima, condiciones de crecimiento y cultural.

2.9.1 Fuentes de almidón

En diferentes investigaciones mencionan a una gran cantidad de alimentos con alto contenido de almidón, tal es el caso de algunos cereales como el trigo, el centeno, cebada, sorgo, mijo y maíz, este último es uno de los más usados en ciertas industrias por su producción a gran escala (Acevedo *et al.*, 2013). Sin embargo, no solo los cereales poseen este tipo de compuesto, algunas frutas y vegetales tienen una importante cantidad de almidón que pueden ser usados para la obtención de este polisacárido y que son conocidas como fuentes no convencionales.

Este tipo de fuentes son llamadas no convencionales debido a que de forma común no se habían manipulado con fines de extracción de almidón. Por lo tanto, la demanda de productos convencionales para su comercialización ha generado la búsqueda de productos de donde se pueda obtener almidón para cubrir las necesidades de las industrias que hacen uso de estos materiales (Aguilar, 2013).

En zonas del sur del país crece una gran variedad de semillas, vainas, frutas y legumbres que pueden ser transformadas en harinas y ser aprovechadas en la alimentación humana, animal o bien en las industrias como aditivo. Este tipo de aprovechamiento tiene diferentes objetivos, por un lado, disminuir la pérdida postcosecha y por otro, su participación en el desarrollo de productos como los encapsulados o en la innovación de otros alimentos de consumo (Sira *et al.*, 2016).

2.9.2 Almidón de malanga, características y aplicaciones

El almidón aislado de fuentes como raíces y tubérculos son una alternativa para solventar los problemas de hambre en países de Latinoamérica principalmente, en el caso de la malanga, para reemplazar a las materias primas convencionales en la industria con diversas aplicaciones (Rapelo *et al*, 2013).

La malanga o taro (*Colocasia esculenta*) es una planta de rápido desarrollo vegetativo, perteneciente a la familia de las aráceas con un tubérculo subgloboso. Por lo general es cultivada en climas húmedos o en zonas de lluvia constante. Además, es un tubérculo aprovechable casi en su totalidad y distribuida en distintas zonas del sur del país por su contenido nutricional (Torres, 2015), debido a sus altos contenidos de almidón cercanos a un 80% es empleada como materia prima para la elaboración de diversos productos alimenticios (Aguilar, 2013).

En el ámbito cultural es un alimento tradicional en países de Latinoamérica, en el caso de México en estados del sur como Oaxaca, Chiapas y Tabasco (Naturalista, 2017). Es considerada como una fuente de alimento en la población de la cuenca del Pacífico. La planta de taro tiene un valor triple en el sentido de que el tallo puede usarse para la obtención de almidón fácilmente y en buena cantidad (NRCS, 2017).

Existen investigaciones que informan que la malanga tiene un porcentaje de entre el 70-80% de almidón con gránulos pequeños, también es rico en goma (mucilago) y se ha extraído hasta en un 9.1% de mucosidad de malanga (Aboubakar *et al*, 2008). Debido a que los gránulos de almidón de malanga son pequeños es que su digestión es altamente rápida, estas características hacen posible que la malanga pueda reemplazar a productos como el maíz, el ñame, yuca y papa en la industria alimentaria (Rapelo, 2013).

En estudios recientes se reporta que la malanga tiene además un alto porcentaje de amilosa y amilopectina entre 18 y 20 % considerablemente alto, se sabe que esto está estrechamente relacionado con el tamaño y forma del gránulo (Torres, 2015). Una de las propiedades únicas del almidón de taro es su tamaño de gránulo, que varía entre 1 y 5 μm , lo que lo convierte en el tamaño de gránulo más pequeño entre los almidones de tubérculos y raíces (Pachua et al., 2018). Estas características son las que le brindan la posibilidad de ser empleadas en diferentes industrias tanto alimentarias como no alimentarias, tal es el caso de la industria del papel, textil, adhesivos, cosmética y farmacéutica. Esta última emplea almidones nativos y modificados como material de pared como sistema de entrega de algún ingrediente activo (Bello, 2006).

Existen reportes en el que se ha aprovechado el almidón de malanga en su forma nativa debido a su capacidad de formar agregados esféricos, Gonzales *et al.* (2011) prepararon y caracterizaron agregados esféricos de almidón de malanga incluyendo una etapa de secado por aspersión.

Se concluye que las condiciones de secado, características como tamaño de gránulo y contenido de proteínas produjeron este tipo de estructuras esféricas que pueden ser una alternativa para la encapsulación de sustancias empleadas en la industria alimentaria y farmacéutica.

De igual forma se sabe que una de las grandes desventajas del almidón en su forma nativa está relacionada con las limitadas aplicaciones que puede tener como su baja tolerancia a los procesos, alta retrogradación y sinéresis. Estos hechos motivaron al empleo almidones modificados como ingredientes funcionales en los alimentos procesados mejorando sus propiedades funcionales y que muestran mejoras sobre los almidones no modificados (Bidyut, 2016).

2.9.3 Almidón modificado

Las propiedades y funcionalidades del almidón como la resistencia mecánica y flexibilidad dependen de la cantidad de amilosa y amilopectina, del grado de ramificación y de la distribución del peso molecular (Peraza, 2016). El uso del almidón modificado surge debido a las limitaciones que surgen al ser empleados en diferentes industrias como textiles, alfombras y aglutinantes en la industria alimentaria, entre otras (Aguilar, 2013). Este uso limitado está asociado a su fragilidad, deterioro de propiedades mecánicas e incompatibilidad con algunos solventes. Debido a esto se realizan diferentes modificaciones que den soluciones a las limitaciones más frecuentes por lo que existen 3 principales métodos del tipo físico, químicos y enzimáticos, aunque de igual forma se puede hacer una combinación de estos con la finalidad de mejorar la modificación de acuerdo con las características que se busquen.

Entre los diversos métodos de modificación los más empleados son los métodos químicos. Sweedman *et al.* (2013) proponen que la esterificación con anhídrido octenil succinato (AOS) otorga al almidón anfifilicidad, propiedad que es fundamental para estabilizar las emulsiones de agua en aceite y aceite en agua para las industrias de alimentos, cosméticos y farmacéuticos. Sin embargo, la generación de desechos químicos durante la modificación con AOS podría conducir a la contaminación del medio ambiente.

Como el concepto de “procesamiento verde” se vuelve cada vez más importante en las industrias alimentarias y no alimentarias, ha habido un gran interés por el diseño y desarrollo de tecnologías para la producción de almidones modificados un poco más innovadoras y menos dañinas (Nannan, 2017).

Las técnicas emergentes, especialmente aquellas basadas con enfoques físicos, ha atraído la atención en la modificación del almidón, ya que pueden reducir en gran medida los desechos del procesamiento y pueden generar productos de alta seguridad alimentaria al no emplear sustancias químicas. Se ha confirmado la molienda mecánica de bolas, como técnica física, económica y amigable con el medio ambiente, puede regular algunas propiedades funcionales del almidón (solubilidad, digestibilidad y pegado). Lui *et al.* (2011) estudiaron el efecto del tratamiento de molienda de bolas de alta energía sobre la estructura y porosidad del gránulo de maíz. Los estudios de MEB mostraron que las superficies de los gránulos de almidón se modificaron significativamente y observaron cavidades en la región central de los gránulos distorsionados. Además, concluyen que los almidones molidos exhiben la capacidad de adsorción que puede ofrecer una nueva oportunidad para la aplicación del almidón, como, por ejemplo, sorbete en alimentos o encapsulante de productos farmacéuticos y nutracéuticos (Lui, 2011).

Se sabe que los tratamientos mecánicos alteran la estructura de los gránulos de almidón, las propiedades fisicoquímicas y la digestibilidad, dependiendo del tipo de tratamiento, severidad, material de molienda, así como de la fuente de almidón. Han *et al.* (2002) mencionan que los almidones cerosos o almidones bajos en amilosa se dañan fácilmente empleando molienda mecánica, lo que los hace más vulnerables a la amilólisis.

Por otro lado, Chen *et al.* (2003) reportaron que el aumento del tiempo de molienda del almidón de arroz causa la reducción y desaparición de birrefringencia, los picos de difracción de rayos X y el evento endotérmico característico de la gelatinización, lo que indica que los gránulos semicristalinos se convierten progresivamente en un estado amorfo, por lo que su temperatura de gelatinización dependerá del nivel de daño que este tenga, datos que coinciden con Sushill *et al.* (2010) los cuales proponen que debido al proceso de molienda, el gránulo es sometido a fuerzas como impacto, cizallamiento y desgaste, que pueden causar la descomposición física de los gránulos, produciendo mayor cantidad de fracciones solubles.

Además, descubrieron que un sistema de molienda agua-almidón protege a los gránulos durante la molienda absorbiendo la energía disipada durante el proceso.

En el caso particular la malanga Deepika *et al.*, (2013) encontraron que el taro en su forma nativa puede actuar como excipiente farmacéutico para la liberación de paracetamol. También se demostró que la tensión superficial y la viscosidad del almidón de taro nativo se consideraron la razón de la propiedad de unión del almidón en los comprimidos preparados. Pachau *et al.*, (2018) aislaron y caracterizaron almidón de taro, de igual forma realizaron una modificación química utilizando ácido crítico para mejorar su propiedad como excipiente. Demostraron que el almidón en su forma citratada tenía una mejor eficiencia como desintegrante de comprimidos mejorando su biodisponibilidad.

Por otro lado, Siéntate *et al.* (2014) investigaron el efecto del tratamiento de ultrasonido sobre el rendimiento del almidón aislado y propiedades funcionales del almidón de taro. Se obtuvo un rendimiento de 18.97% comparado con un método convencional el cual ronda el 15.29%. También observaron una ligera disminución en la claridad de las pastas del almidón después del pretratamiento por ultrasonido. Se encontró que la estabilidad al congelamiento y deshielo mejoraba en comparación que cuando se modifica con un método convencional.

Hazarika & Sit., (2016) realizaron una modificación dual del almidón de taro mediante hidroxipropilación y entrecruzamiento. Encontraron que el contenido de amilosa disminuía debido a la modificación simple y doble. Para la modificación doble, se observó que el poder de hinchamiento, solubilidad y claridad aumentaban con el nivel de hidroxipropilación y disminuían con el nivel de entrecruzamiento. En cuanto a viscosidad, los almidones modificados dualmente mostraron una mayor firmeza que el almidón nativo.

Finalmente concluyen que las propiedades específicas de los almidones modificados químicamente pueden adaptarse a aplicaciones específicas, como los productos alimenticios que requieren tanto una alta viscosidad como una estabilidad de almacenamiento.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México la ovinocultura es una actividad económica importante en diversos estados del país, especialmente en zonas tropicales. Sin embargo, su productividad se limita por problemas asociados a agentes infecciosos como los parásitos gastrointestinales. *Haemonchus contortus* es un nematodo gastrointestinal que afecta pequeños rumiantes, asociado a los problemas de salud más importantes que impacta a nivel económico en las unidades de producción, no solo por las pérdidas asociadas a la baja producción de los animales. Además, por los costos que representa la implementación de programas de medicina preventiva como la desparasitación. No obstante, el uso constante y sin control de los antihelmínticos comerciales ha llevado a la generación de poblaciones de nematodos resistentes a los compuestos activos que se usan comercialmente, por lo que actualmente diversos grupos de investigadores alrededor del mundo se han centrado en la búsqueda de tratamientos alternativos efectivos y económicos.

El uso de extractos de plantas o los subproductos de estas, como la cáscara de café, son una alternativa para el control y tratamiento de algunas helmintiasis debido a que contiene un porcentaje significativo de metabolitos secundarios, de los cuales existen reportes de su potencial actividad contra nematodos gastrointestinales de importancia veterinaria. No obstante, este tipo de compuestos se sabe que son altamente degradables tanto por condiciones externas como internas, por lo que se debe desarrollar un material de pared que permita su protección de la oxidación, volatilización o degradación por microorganismos.

Uno de los sistemas de entrega de fármacos con mayor relevancia son los sistemas de entrega basado en carbohidratos como el almidón que puede ser mejorado mediante modificaciones y así emplearse como agente encapsulante, permitiendo la contención y protección de los metabolitos para su posterior liberación.

4. JUSTIFICACIÓN

La producción ovina en zonas tropicales en México es un área que por las condiciones climáticas favorece el desarrollo de parásitos gastrointestinales de importancia veterinaria como lo es *Haemonchus contortus*, un parásito que en las unidades de producción genera pérdidas económicas de índole directa como la muerte de los neonatos e indirecta como la infertilidad en las hembras y pérdida en el peso de los animales adultos. Aunado a esto la situación de las poblaciones de nematodos resistentes a los compuestos químicos más comercializados ha incrementado en los últimos años y ha llevado a los productores e investigadores a buscar alternativas de control que tengan menor impacto ambiental y represente un menor gasto en programas de desparasitación en las unidades de producción.

Existen reportes de plantas que cuentan con un alto porcentaje de metabolitos secundarios con actividad antioxidante, antibacteriana y antihelmíntica. Debido a su potencial biológico y benéfico en el organismo son considerados productos nutracéuticos. Uno de ellos es la cáscara de café, el cual es un subproducto derivado de la industria cafetera que en los últimos años se ha considerado como un residuo tóxico en los ríos ya que libera compuestos que impactan de forma negativa en el medio ambiente. Dada la naturaleza química de estos compuestos es que toman relevancia, se ha demostrado que algunos compuestos como los fenoles, alcaloides y otros metabolitos han tenido un impacto positivo a nivel biológico, lo que convierte a la pulpa de café un candidato potencial para la encapsulación de los metabolitos presentes en el extracto y así mantenerlos en condiciones viables para utilizarlos como una alternativa para atacar la problemática en la producción ovina.

Debido a que los materiales de encapsulación de origen lipídico y proteico tienen a desestabilizarse en condiciones de altas temperaturas, se propone el desarrollo de un material de pared basado en carbohidratos no convencionales como el almidón de malanga.

Se ha demostrado que los sistemas de entrega de fármacos a base de carbohidratos son uno de los materiales más adecuados al considerarse materiales biocompatibles, biodegradables y su proceso de obtención es económicamente viable. Una de las grandes limitantes de estos sistemas son sus pocas aplicaciones en la industria debido a las propiedades fisicoquímicas en su forma nativa. No obstante, existen métodos de modificación que ayudan con el mejoramiento de las propiedades del almidón. Un método que en los últimos años se ha investigado es el uso de métodos físicos como la molienda mecánica de alta energía. Existen reportes que mencionan que el uso de este método de modificación mejora algunas características como solubilidad, digestibilidad y capacidad formadora de película, por lo que el almidón modificado por este método lo convierte en un material de pared adecuado para encapsular compuestos bioactivos utilizando secado por aspersión.

5. HIPÓTESIS

El almidón de malanga modificado dualmente (molienda mecánica y entrecruzamiento) servirá como material de pared para encapsular los compuestos bioactivos presentes en el extracto hidroalcohólico de pulpa de café mediante secado por aspersión.

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Encapsular los compuestos bioactivos extraídos de la pulpa de café mediante secado por aspersión utilizando como material de pared almidón de malanga (*Colocasia esculenta*) modificado dualmente y determinar su actividad antihelmíntica *in vitro*.

6.2 ESPECÍFICOS

1. Obtener almidón de malanga modificado dualmente.
2. Caracterizar fisicoquímica, reológica y morfológicamente el almidón modificado dualmente.
3. Establecer las condiciones de secado por aspersión para la encapsulación de compuestos bioactivos.
4. Evaluar la actividad antihelmíntica del extracto y de los encapsulados *in vitro*.
5. Determinar la degradabilidad del encapsulado *in vitro*.
6. Determinar la actividad hemolítica del extracto de pulpa de café *in vitro*.

7. METODOLOGÍA

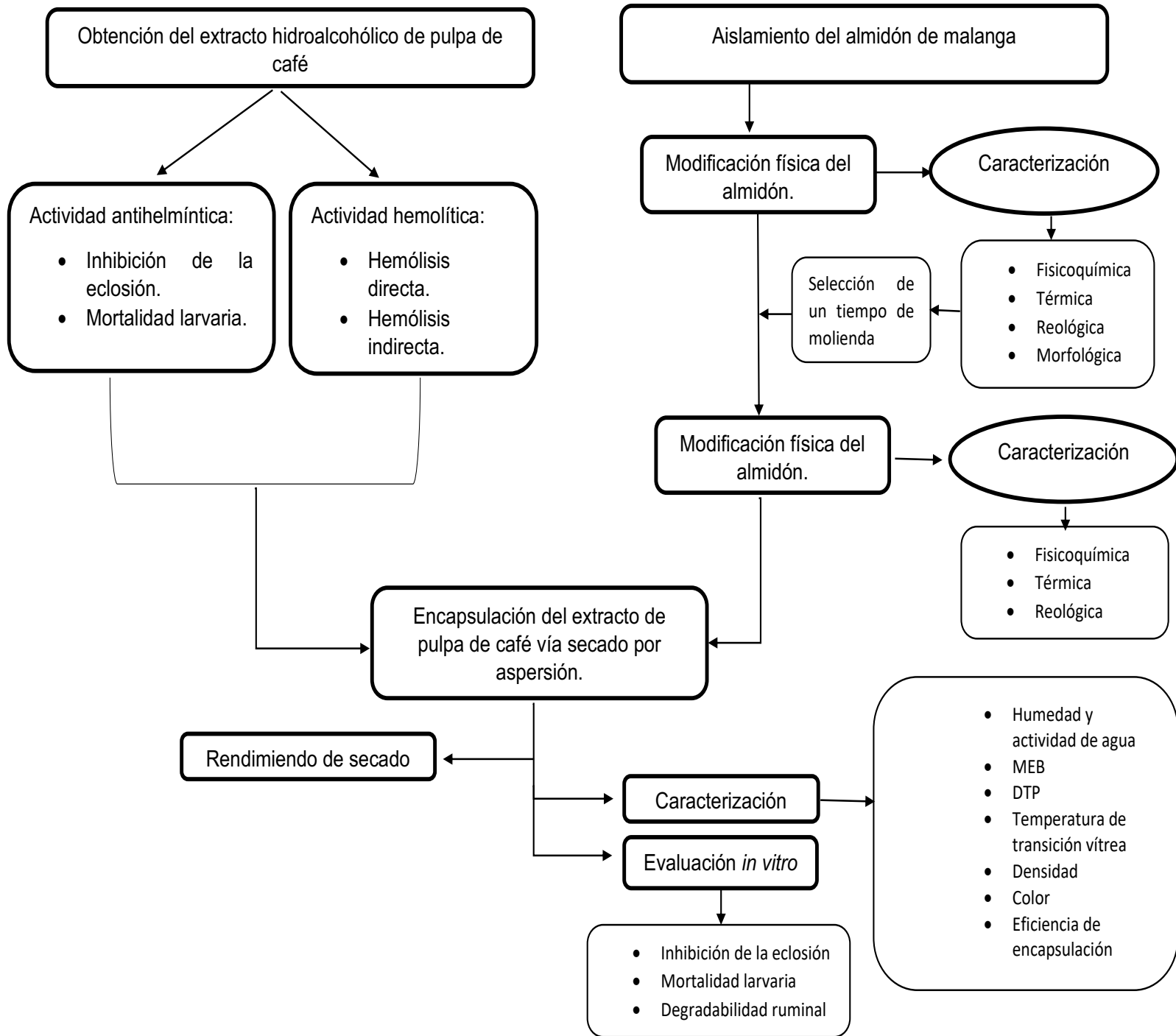


Figura 3.- Diagrama experimental

7.1 Obtención del extracto

Para la elaboración del extracto se siguió la metodología descrita por González-Alamilla *et al.* (2019). Se tomaron 500 g de la pulpa de café secado a la sombra, posteriormente se mezcló 1 L de una solución hidroalcohólica en una proporción 70:30 agua y metanol. Se dejó reposar durante 72 h evitando ser expuesto a la luz por la sensibilidad de los compuestos secundarios.

Una vez pasadas las 72 h se concentró en un evaporador rotativo (Büchi R-300, Suiza) para eliminar el solvente.

7.2 Actividad antihelmíntica del extracto de pulpa de café *in vitro*

La determinación de la actividad antihelmíntica se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Von Son de Fernex *et al.* (2016) descrita a continuación.

7.2.1 Obtención de huevo de *Haemonchus contortus*

Se infestó un ovino raza Hampshire de 3 meses de edad con larvas L3 (fase infectante) de *Haemonchus contortus* cepa INIFAP, a razón de 350 larvas por kg de peso vivo.

Se dejó un periodo de incubación por 21 días, una vez culminado se procedió con la recolección de heces directamente del recto para determinar la cantidad de huevos por gramo de heces por medio de la técnica de Mac Máster, una vez determinada la cantidad de huevos, se colectaron 30 g de heces que fueron lavadas con agua destilada en tamices de 200,100, 75 y 37 μm , esto con la finalidad de concentrar los huevos en el último tamiz. Se recuperó el concentrado y se agregó a un tubo falcón de 15 mL en el que previamente se agregaron 6mL de solución salina saturada, luego se centrifugaron a 3,000 rpm/ 3 min.

Se obtuvo el concentrado de huevos y se agregó a otro tubo con agua destilada volviendo a centrifugar 3 veces para eliminar el exceso de solución salina y materia orgánica hasta obtener una solución con huevo limpio.

Una vez obtenida la solución con el huevo limpio se determinó la concentración de huevos en 50 μL (contando al microscopio óptico la cantidad de huevos en 10 alícuotas de 5 μL), para la realización del bioensayo se agregaron de 150-200 huevos en 50 μL .

7.2.2 Evaluación de la inhibición de la eclosión de huevo (IEH) sobre *Haemonchus contortus*

En una placa de 96 pozos se colocaron 50 μL de una solución de agua destilada con 150 huevos/pozo y se agregaron 50 μL de cada extracto a las diferentes concentraciones (200, 100, 50, 25, 12.5 mg/mL) para conseguir un volumen final de 100 μL / pozo. Se utilizó como control positivo Ivermectina (5 mg/mL) y como control negativo agua destilada. Se incubó a 30° C por 48 h en una cámara húmeda. Después de la incubación se procedió con la lectura de placa donde se observaron 10 alícuotas de 10 μL en el microscopio con el objetivo 4x y se determinó la cantidad de huevos y larvas en cada alícuota.

Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de inhibición de la eclosión

$$\% \text{ de inhibición de la eclosión} = \frac{L1}{L1 + \text{Huevo}} \cdot 100$$

Donde L1 es igual a larva 1.

7.2.3 Recuperación de larvas L3 de *Haemonchus contortus*

Se obtuvieron heces directamente del recto del ovino donador, las cuales fueron mezcladas con agua destilada y espuma de poliuretano (1.5 x 1.5 x 0.5 cm), fueron incubadas por 10 días a temperatura ambiente (15 a 20°C), transcurrido el tiempo de incubación se procedió a montar la técnica de Bearman para recuperar las larvas L3 de *Haemonchus contortus*. Se lavaron con solución salina saturada, hasta eliminar la mayor cantidad de materia orgánica.

Una vez recuperadas las larvas se procedió a realizar el desvainado de larvas donde se mezclaron 2 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 3% con 3 mL de la suspensión de larvas L3 de *Haemonchus contortus* por un minuto (durante este tiempo se agito en el vortex y se verificó al microscopio que las larvas perdieran su vaina), transcurrido este tiempo las larvas fueron lavadas 3 veces con 3 mL de agua destilada para eliminar los restos de hipoclorito de sodio.

Posteriormente se determinó la cantidad de larvas en 50 µL de agua destilada (contando al microscopio óptico la cantidad de larvas en 10 alícuotas de 5 µL), para montar el bioensayo, fueron agregadas de 150-200 larvas en 50 µL.

7.2.4 Determinación de actividad antihelmíntica sobre larvas L3 de *Haemonchus contortus*

Una vez obtenida la larva desvainada, en una placa de 96 pozos se colocaron 50 µL de una solución de agua destilada con 150-200 larvas, posteriormente se agregaron 50 µL del extracto a las diferentes concentraciones, con cuatro repeticiones cada una, se utilizó como control positivo Ivermectina (5mg/mL) y agua destilada como control negativo, la placa se incubo en una cámara húmeda a 30° C por 72 h.

Transcurrido este tiempo se realizó la lectura de la placa, colocando 10 alícuotas de 10 µL para diferenciar y contabilizar larvas vivas de las larvas muertas (vivas en movimiento y muertas sin movilidad) con ayuda de un microscopio óptico y el objetivo 4X.

Los datos obtenidos se utilizaron para determinar el porcentaje de mortalidad usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{\text{Larvas muertas}}{\text{Larvas totales}} \cdot 100$$

7.2.5 Pruebas de hemolisis directa

Una prueba que es de utilidad en la evaluación de extractos de plantas, así como en el desarrollo de nuevos fármacos es la determinación de la actividad hemolítica. Cualquier producto candidato a uso en un modelo biológico debe conocerse su comportamiento a nivel celular y que este no afecte a nivel estructural o funcional.

Para la realización de esta prueba se obtuvo sangre de un ovino raza Hampshire de un año aproximadamente. La muestra fue procesada de acuerdo con la metodología parcialmente modificada de Rahaman *et al.*, (2017). La muestra de sangre (5 mL) se centrifugo a 2, 500 rpm durante 10 min. Se separó el plasma dejando los eritrocitos. Se tomaron 1250 μ L de eritrocitos y se mezclaron con 5 mL de solución salina fisiológica al 0.9% para realizar lavados y centrifugados en 3 ocasiones a 3,000 rpm/10 min. Finalmente fueron suspendidos en 5 mL de solución salina fisiológica.

Se etiquetaron tubos Eppendorf de 2.0 mL de la siguiente manera: control negativo SSF, control positivo agua oxigenada y carbonato de sodio, 200 mg/mL, 100 mg/mL y 12.5 mg/mL de acuerdo con las concentraciones con efecto en mortalidad larvaria.

A los tubos de control se agregaron 150 μ L de solución con eritrocitos y 50 μ L de las soluciones control (SSF, H₂O₂ Y Na₂Co₃), las cuales fueron utilizadas de acuerdo con la metodología propuesta por Martínez *et al.*, (2016). para los tratamientos se agregaron 150 μ L de solución con eritrocitos y 50 μ L de las diferentes concentraciones de extracto liofilizado (200, 100 y 12.5 mg/mL).

Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 30 y 60 min. Cumplido el periodo de incubación fueron centrifugadas a 2,500 rpm/ 5 min y fueron tomados 100 µL de la muestra y colocada en una placa de 96 pozos donde se midió absorbancia de la solución a una longitud de onda de 540 nm, y el mismo procedimiento para la muestra de 60 min.

La lisis de los eritrocitos se calculó empleando la siguiente formula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{AM - ACN}{ACP - ACN} \cdot 100$$

Donde: A= Absorbancia, M= Muestra, CN= Control negativo, CP= Control positivo.

7.2.6 Porcentaje de hemólisis indirecta

Se preparó agar sangre en cajas Petri, una vez que el agar se enfrió con ayuda de un tubo de ensayo de aproximadamente 6 mm de diámetro se removió una capa de agar en 3 sitios equidistantes.

Con la ayuda de un mechero se calentó un agitador de vidrio de 1 a 2 mm de diámetro, e inmediatamente se sellaron los bordes del agar de cada agujero, para impedir que el extracto acuoso del vegetal no se difundiera por debajo de la capa de agar. Fueron añadidos 20 µL de las diferentes concentraciones a evaluar, así como del control positivo (Tween 80) y el control negativo (agua destilada). Finalmente se incubó por 24 horas a 35°C y se midió el halo de hemólisis correspondiente.

7.3 Aislamiento del almidón de malanga

Para la obtención del almidón de malanga, se realizó una colecta del material vegetal. Primero se realizó el descascarillado de malanga, posteriormente se eliminaron todas las impurezas para pesarla. Se procedió con el corte en partes pequeñas de malanga sin cáscara, se lavó y sometió a un proceso de molienda añadiendo 10 L de agua destilada, con el objetivo de mejorar el proceso de precipitación de la masa presente en el agua.

Al cabo de 24 h se realizó el primer lavado del almidón; se pasó la muestra precipitada por una malla con orificios de 1,0 mm de abertura, realizando un proceso de colado y desechando el residuo sobrante que quedará en la malla. El líquido se dejó precipitar una vez más durante 24 h en la nevera a 6°C, para evitar procesos de fermentación en la muestra.

Transcurrido ese periodo se repitió el proceso de lavado con agua destilada, pero en esta ocasión se utilizó un tamiz malla de 100 (150 µm), desechando el material que no logró pasar por la malla y dejando reposar el precipitado durante 24 h nuevamente. Después de estos procesos se retiró el sobrenadante líquido y el precipitado se llevó al horno en capsulas de porcelana a una temperatura de 45 ° C durante 48 h. Se retiró del horno, se trituro con un mortero y se pasó por un tamiz malla 100 (150 µm), obteniendo así el almidón.

7.3.1 Modificación física del almidón de malanga

La modificación física se realizó usando un molino de bolas de alta energía (Pulverisette 7, FRITCH. Idar-Oberstein, Germany) de acuerdo con la metodología descrita por Lin *et al.*, (2011) en el que se colocaron en una relación 10:1:1 (bolas de nitruro de silicio, almidón y agua desionizada) en el tazón de molienda de 80 mL. Las muestras fueron homogenizadas con ayuda de una espátula. Posteriormente se colocaron los tazones en el molino bajo las condiciones de molienda de 800 rpm/ 5 min y de dejaron reposar en intervalos de 10 min hasta completar los ciclos deseados (20, 30 y 40 min).

Al término de la molienda las muestras fueron recuperadas, lavadas con agua desionizada y centrifugadas a 5000 rpm/ 10 min. Una vez concluidos los lavados las muestras se colocaron en charolas de aluminio y secadas en un horno de aire a 45° C por 24 h.

Concluido el proceso de secado las muestras se trituro con ayuda de un mortero hasta obtener un polvo fino, el cual fue tamizado en un tamiz malla 100 (150 µm).

7.3.2 Modificación química del almidón de malanga

El almidón entrecruzado con fosfatos fue preparado empleando la metodología de (Seib, 1999). Se preparó una mezcla de almidón (10 g), trimetafosfato de sodio (1.19 g, 6 % w/w), tripolifosfato de sodio (0.01 g, 0.5%) y sulfato de sodio (1 g, 10%) en 700 mL de agua destilada. Esta mezcla fue ajustada a un pH de 11.5 adicionando aproximadamente 25 mL de hidróxido de sodio 1.0 M. Se mantuvo la mezcla a una temperatura de 45° C por un periodo de 3 h en agitación constante. Al termino la muestra de almidón se neutralizó ajustando a un pH de 6.5 con ácido clorhídrico 1.0 M. La muestra se recuperó por centrifugación a 5,000 rpm/ 5 min, se realizaron 3 lavados de la muestra empleando agua destilada y finalmente fue secada a 40°C en estufa de secado por 24 h.

7.3.3 Caracterización morfológica del almidón nativo y modificado físicamente

7.3.3.1 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Se realizó MEB con la finalidad de observar la morfología de los gránulos de almidón de malanga siguiendo la metodología descrita por Gil & Rosell (2017). Las muestras fueron espolvoreadas sobre una cinta conductora de cobre con doble adhesión. Posteriormente empleando un ionizador de metales (JOEL, Japón) se cubrieron con una capa de oro para luego ser fijadas en un soporte de aluminio del microscopio electrónico de barrido JOEL (modelo JSEM 35X; Japan Electronic Optical Limited, Japón). Las muestras se observaron a un voltaje de 15 kV y una amplificación de 1000x, 2000x y 4000x.

7.3.3.2 Distribución de tamaño de partícula (DTP)

La determinación de tamaño de partícula se realizó usando un analizador de tamaño de partícula (Malvern Mastersizer 3000), usando el accesorio Hydro, oscurecimiento en un intervalo entre 1-20% y ultrasonicador al 90%. Se colocaron 500 mL de agua destilada (disolvente) en un vaso de precipitado que posteriormente fue acoplado al equipo introduciendo las aspas y se agregó 1 g de muestra. Se realizaron 3 mediciones por muestra.

7.3.4 Caracterización reológica del almidón nativo y modificado físicamente

Como tal la reología es una ciencia que se encarga del estudio de la relación entre el esfuerzo y la deformación a través de matemáticas constitutivas reológicas de estado. Esta describe de alguna manera ciertas características mecánicas de los materiales bajo diferentes condiciones de esfuerzo y deformación. La reología se puede clasificar en viscosidad o flujo viscoso, elasticidad o deformación elástica y viscoelasticidad (Steffe *et al.*, 2010). Esta caracterización se realizó con la finalidad de conocer ciertas propiedades reológicas y el comportamiento del almidón en su forma nativa, así como en las modificaciones y que podrían impactar al emplearse como materiales de pared en un proceso como el secado por aspersion.

7.3.4.1 Perfil de viscosidad

Se utilizó un reómetro TA instrument Discovery HR-1 con geometría de celda de pegado (SPC, starch pasting cell) para muestras semilíquidos. Se peso 3 g de la muestra y fueron solubilizados en 30 mL de agua destilada, posteriormente se agregó la mezcla al contenedor accesorio del equipo y fueron colocados los parámetros Gap= 500 μm para iniciar con el proceso (Pardo, 2013).

Las condiciones de oscilación de 10 rad/s a 25° C por 100 s, seguido de una rampa de calentamiento de 25° C a 90° C durante un tiempo de 250 s, posteriormente se lleva hasta cocción durante 400 s a 80° C, finalmente se realiza una etapa de enfriamiento de 90°C a 25°C durante 500 s.

7.3.4.2 Viscoelasticidad

La evaluación reológica proporciona información de las interacciones partícula-partícula y las propiedades de red de la matriz continua en las que se suspenden estas partículas. En este caso se determinó el tipo de propiedades viscoelásticas del almidón nativo y modificado dualmente bajo condiciones específicas de calentamiento y enfriamiento.

Se preparó una suspensión de almidón/ agua al 10% (p/v) en base seca y fueron analizadas en el Reómetro Híbrido Discovery HR-2 con un sistema de cono placa de 40 mm de diámetro y con un GAP de 500 μm . las temperaturas de medición fueron temperatura ambiente (25 °C), calentamiento (90 °C) y seguido del enfriamiento (25 °C), con velocidad de 5 °C/ min. Las mediciones se hicieron en tres ciclos, para la temperatura ambiente y calentamiento fue mediante barridos ascendentes y descendientes.

La cinética de gelatinización-gelificación se llevó a cabo en el mismo equipo bajo las mismas condiciones de suspensión. Fueron observadas con pruebas oscilatorias de baja amplitud con el accesorio tipo placa de 40 mm de diámetro con espesor de placa muestra de 500 μm . Se llevaron a cabo barridos de amplitud de deformación en intervalos de 0.1 a 10 % con frecuencia constante de 1 Hz en un ciclo de calentamiento de 25° a 90° dejando constante 90° durante 10 min.

La etapa de enfriamiento fue de 90 a 25 °C, con los mismos intervalos de deformación. Posteriormente se realizaron barridos de frecuencia en el rango de 0.1 a 10 Hz, con una amplitud de deformación constante del 5%.

Para las cinéticas de retrogradación se empleó una velocidad de calentamiento-enfriamiento de 25 °C/ min, la dispersión se llevó de 25 °C a 90 °C y se mantuvo durante 10 min, 5% de amplitud de deformación con una frecuencia de 1 Hz.

7.3.5 Caracterización fisicoquímica del almidón nativo y modificado físicamente

7.3.5.1 Determinación de contenido de amilosa aparente

El contenido de amilosa aparente se determinó por una modificación de Hoover & Ratnayake, (2001) al método propuesto por McGrance *et al.*, (1998). La amilosa tiene una afinidad de formar complejo con el yodo, con una capacidad de enlazamiento de 20 mg de yodo por 100 mg de amilosa, los complejos producen una coloración azul que puede ser cuantificado colorimétricamente (Buléon *et al.*, 1998). Se disolvieron 20 mg de almidón (bs, base seca) en 8 mL de KOH 1 M, y se agitó por 20 min en baño de agua a 85°C, posteriormente se ajustó el pH a 7 con HCl. Se aforó a un volumen de 25 mL con agua. Se transfirió 1 mL de esta solución a un matraz aforado de 50 mL, se agregaron 40 mL de agua destilada y 5 mL de una solución de I₂/IK (0.0025 M I₂ y 0.0065 M KI), se aforó y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente antes de leer la absorbancia a 600 nm.

La cuantificación de amilosa se realiza por interpolación en una curva estándar preparada usando una mezcla de amilosa y amilopectina (en un intervalo de 0-100 % de amilosa), se reportó en porcentaje y la cantidad de amilopectina se calcula por diferencia.

7.3.5.2 Difracción de rayos X

La técnica de difracción de rayos X (DRX) actualmente cumple un papel importante en la caracterización bien establecida para analizar el nivel cristalino de los polímeros, enfocados en el ordenamiento de largo rango y que puede brindar información de su estructura (Otthenhof, 2003).

En el caso de los almidones esta técnica ayuda a diferenciar el grado de cristalinidad, tipo de cristal y ordenamiento de las cadenas entre almidones de cereales, tubérculos y semillas (Zobel *et al.*, 2008), además es útil para revelar cambios en el grado cristalino de la amilopectina, causados por diferentes tratamientos a los que se ha sometido a él almidón.

Se colocó aproximadamente 2 g de muestra en la porta muestra del difractor de rayos X de ángulo ancho (Bruker D8 Advance, Massachusetts, USA.), equipado con fuente de cobre, operado a 40 kV y 30 mA, produciendo una radiación de CuK α con una longitud de onda de 1.54 Å, a un ángulo 2θ con intervalo de 0.05° y una velocidad de 60 s° . Las muestras fueron corridas por triplicado (Otthenhof, 2003).

7.3.5.3 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

La técnica de calorimetría diferencial de barrido (CDB) es empleada para el estudio de los fenómenos de gelatinización y retrogradación del almidón. Su principio fundamental es detectar los cambios de flujo de calor asociado con transiciones de primer orden y de segundo orden de los polímeros (Atweel *et al.*, 1998).

Estos resultados nos arrojan información acerca del orden - desorden de las moléculas dentro del sistema. Los parámetros medidos comúnmente son la temperatura de transición, dada como la temperatura pico y la entalpia de gelatinización, es decir la energía que se requiere para que se lleven a cabo las transiciones (Eliasson *et al.*, 1994).

Para esto las muestras fueron procesadas de acuerdo con la metodología de Paredes *et al.* (1999) Se pesó 2 mg de muestra en base seca dentro de una charola de aluminio hermética (10 mm de diámetro y 5 mm de altura), se adicionaron 7 μ L de agua desionizada y se dejó hidratar durante 30 min. Posteriormente se pesó y sello herméticamente para proceder con el análisis. La muestra fue sometida a un programa de calentamiento en un intervalo de temperatura de 20-120° C y una velocidad de 10° C/ min.

7.4 Encapsulación del extracto mediante secado por aspersión

Previo al proceso de microencapsulación fueron elegidos los materiales de pared a utilizar y un testigo que se describen a continuación:

MD: maltodextrina dextrosa equivalente 10, la cual fue utilizada como testigo al conocer su propiedad filmógena.

AN: almidón nativo de malanga.

AN/Ec: almidón de malanga modificado por entrecruzamiento.

M30: almidón de malanga modificado mediante molienda mecánica por 30 min.

M30/Ec: almidón modificado dualmente, molienda mecánica por 30 min y entrecruzamiento.

7.4.1 Preparación de la mezcla de alimentación

Se formularon las mezclas de alimentación con los diferentes materiales de pared (MP) considerando una proporción MP: sólidos de extracto 1:2 (m/m). Se suspendió el correspondiente material de pared en un matraz con la cantidad suficiente de agua y extracto para alcanzar una concentración final de 20% de sólidos (material de pared + sólidos de extracto). La mezcla se mantuvo en agitación a 30°C durante 15 min previo al secado.

7.4.2 Secado por aspersion y rendimiento del proceso

El secador por aspersion escala laboratorio (Büchi, B-290; Flawil, Switzerland) se configuró en modo abierto, esto es utilizando aire del entorno como gas de secado, además, el equipo se acoplo a un deshumidificador (Büchi, B-296; Flawil, Switzerland). Las condiciones de secado fueron ajustadas a una temperatura de entrada de 150°C y una temperatura de salida de 80°C de acuerdo con el trabajo de Gonzalez-Soto *et al.*, (2011).

Se utilizó una boquilla estándar de 0.7 mm de diámetro y el flujo de gas de secado se mantuvo a 538 L/h. La tasa de aspiración se mantuvo al 100% de la capacidad de operación (35 m³/h) de acuerdo con las especificaciones del fabricante considerando la limpieza del filtro.

Para determinar el rendimiento del proceso se contemplaron los gramos de sólidos en la mezcla de alimentación y los gramos de producto seco recuperados al final del ciclón de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{microcápsulas recuperadas (g)}}{\text{sólidos secos alimentados (g)}} \cdot 100$$

7.5 Caracterización de las cápsulas

Posterior al proceso de secado fueron caracterizados los productos obtenidos con la finalidad de conocer sus características morfológicas, estructural, fisicoquímica y así como su estabilidad física.

7.5.1 Humedad (%) y actividad de agua (a_w)

Para el contenido de humedad fueron pesados aproximadamente 500 mg de muestra y fueron colocados en charolas de aluminio previamente llevadas a peso constante. Se dejaron secar en una estufa de vacío (SHEL LAB. OREGON, USA) a 60 °C con 15 psi de presión manométrica hasta llegar a peso constante (aproximadamente por 24 h). Por diferencia de pesos se calculó el porcentaje de humedad para los diferentes productos (AACC,2000).

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \cdot 100$$

En cuanto a la actividad de agua se determinó utilizando un equipo AquaLab Vapor Sorption Analyzer (Decagon Devices, Inc., AquaLab VSA; Pullman, WA, EE. UU.) Antes de las mediciones se verificó la calibración del equipo con cloruro de litio ($a_w=0.250$). Posteriormente se introdujo en una de las bandejas 1.5 g de muestra en la cámara y se registraron los datos arrojados.

7.5.2 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Se realizó MEB con la finalidad de observar la morfología del producto obtenido, siguiendo la metodología descrita por Gil & Rosell (2017). Las muestras fueron espolvoreadas sobre una cinta conductora de cobre con doble adhesión. Posteriormente empleando un ionizador de metales (JOEL, Japón) se cubrieron con una capa de oro para luego ser fijadas en un soporte de aluminio del microscopio electrónico de barrido JOEL (modelo JSEM 35X; Japan Electronic Optical Limited, Japón). Las muestras se observaron a un voltaje de 15 kV y una amplificación de 1000x, 2000x y 4000x.

7.5.3 Distribución de tamaño de partícula (DTP)

La determinación de tamaño de partícula se realizó usando un analizador de tamaño de partícula (Malvern Mastersizer 3000), usando el accesorio Hydro, oscurecimiento en un intervalo entre 1-20% y ultrasonicador al 90%. Se colocaron 500 mL de agua destilada (disolvente) en un vaso de precipitado que posteriormente fue acoplado al equipo introduciendo las aspas y se agregó 1 g de muestra. Se realizaron 3 mediciones por muestra.

7.5.4 Temperatura de transición vítrea (Tg)

La temperatura de transición vítrea (Tg) de las microcápsulas fue determinada con un calorímetro diferencial de barrido (TA Instrument Discovery, DSC 2500). El gas de purga utilizado fue nitrógeno seco de alta pureza (50 mL/min). Se utilizó una charola de aluminio hermética vacía como referencia. Fueron colocados 2 mg de muestra en charolas de aluminio herméticas y selladas para su análisis. La muestra se sometió a un programa de calentamiento en un intervalo de temperatura de -10 a 150°C a una velocidad de 10°C/min para determinar la temperatura de transición vítrea. La prueba se realizó por duplicado y los datos fueron analizados con el software TA Instruments Tríos versión 4. (New Castle USA). La temperatura de transición vítrea (Tg) se registró como la temperatura media de la discontinuidad en la curva de flujo de calor.

7.5.6 Densidad aparente y compactada

Densidad aparente

Se utilizó una probeta graduada (10 mL) la cual fue pesada en una balanza para el registro de su peso vacía. Se agregó la muestra hasta un volumen de 5mL y fue registrado el peso. La densidad aparente de la muestra de polvo se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad aparente } (\rho_B) = \frac{\text{masa del polvo (g)}}{\text{volumen del polvo (mL)}}$$

Densidad compactada

Después de haber tomado el peso de la técnica de densidad aparente, la probeta con el polvo fue sometida a un proceso de golpe mecánico hasta alcanzar un volumen constante. La densidad compactada se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad compactada } (\rho\tau) = \frac{\text{masa del polvo (g)}}{\text{volúmen compactado (mL)}}$$

7.5.7 Fluidiez

La fluidez de los microencapsulados se evaluó en términos de índice de Hausner (HR) y la su relación con el índice de Carr (IC). Para densidad aparente se empleó una probeta de 10 mL a la cual se le registro el peso. Se agregó la muestra a un volumen de 5 mL y fue registrado el peso. Para densidad compactada esa misma muestra fue sometida a un golpeteo constante hasta obtener un volumen final compactado y se registró el peso. (Jinapong *et al.*, 2008).

Tanto el IC como el HR se calcularon a partir de las densidades en masa extraídas de los polvos mediante las ecuaciones siguientes:

$$HR = \frac{\text{Densidad compactada}}{\text{densidad aparente}}$$

$$IC = \frac{\text{densidad compactada} - \text{densidad aparente}}{\text{densidad compactada}} \cdot 100$$

7.5.8 Determinación de color

Para la determinación de color se utilizó un colorímetro digital (HUNTER LAB Mod. Mini SCAN) el cual registra los datos en un sistema de CIE L a* b*. Para L se considera como el grado de luminosidad o el brillo y el cual va de negro (0) a blanco (100), a* que representa la tendencia de rojo (60) a verde (-60) y b* representando la tendencia de amarillo (60) a azul (-60). El equipo fue calibrado previo a su uso con el accesorio de teja blanca y trampa de luz. Las muestras se colocaron en charolas de plástico de 4 cm de diámetro y 1 cm de altura. La lectura de las muestras se realizó por triplicado, los datos se expresaron como luminosidad (L), intensidad de color en croma (C*) y la tonalidad en ángulo Hue (H°). Para la determinación de los valores (H°) y (C*) fueron empleados los datos obtenidos y las siguientes ecuaciones:

$$H^{\circ} = \tan^{-1} (b^*/a^*)$$

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$$

7.5.9 Contenido de fenoles totales (CFT)

Se realizó la determinación de fenoles totales de Folin-Ciocalteu mediante la metodología descrita por Chumark *et al.*, (2008). Se pesó 200 mg de muestra aforadas a 10 mL de agua destilada. Se mantuvieron en baño ultrasónico por 20 min para asegurar la ruptura de las cápsulas. Posteriormente la solución del matraz aforado se transfirió a tubos falcón de 15 mL y se centrifugó a 3000 rpm/5min. Se transfirió 100 µL del sobrenadante recuperado a tubos de vidrio, adicionando 6 mL de agua destilada y 0.5 mL del reactivo de Folin Ciocalteu, seguido de agitación en vortex.

Después de 5 min, se le adicionaron 1.5 mL de una solución acuosa de Na_2CO_3 al 20% a cada tubo para detener la reacción y nuevamente fue agitado. La solución se aforó a 10 mL con agua destilada y se dejó un periodo de incubación de 2 horas. Finalizado este periodo se procedió a la lectura espectrofotométrica (Equipar, Mod. G 10S UV-VIS) a 760 nm. Para la curva de calibración fue construida a partir de una solución stock de ácido gálico con el disolvente de extracción a 1 mg/mL que fue diluido para obtener 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 mg/mL.

Los resultados obtenidos fueron expresados como equivalentes de ácido gálico en gramos por cada 100 g de base seca del extracto (g EAG/100 g bs).

7.6 Evaluación del encapsulado *in vitro*

7.6.1 Inhibición de la eclosión (% IEH)

Metodología descrita en el apartado anteriormente.

7.6.2 Mortalidad larvaria (%ML)

Metodología descrita en el apartado anteriormente.

7.6.3 Degradabilidad ruminal de las microcápsulas

Para determinar la degradabilidad ruminal *in vitro* de los microencapsulados se siguió el protocolo recomendado por el fabricante del sistema de incubación DAISY II ® (Ankom 2014) con ligeras modificaciones, usando bolsas filtro ANKNOM F-57 (Ankom Technology, Macedon, NY, USA) con tamaño de poro de 25 μm y dimensiones de 5 x 4 cm fabricadas de poliéster/polietileno con filamentos extruidos en una matriz de tres dimensiones (Giraldo *et al.*, 2007).

La muestra de líquido ruminal se extrajo directamente del rumen de un ovino del rastro. Se preparó con anterioridad la solución buffer (A) (saliva artificial) con fosfato de sodio dibásico anhidro (10 g/L), sulfato de magnesio (0.5 g/L), cloruro de sodio (0.5 g/L), cloruro de calcio (0.1 g/L) y urea grado reactivo (0.5 g/L). También, una solución (B) a base de carbonato de sodio (15 g/L) y sulfuro de sodio (1 g/L) aclimatadas en una placa de calentamiento a 39°C.

Las bolsas ANKOM F-57 fueron sometidas previo al experimento a un proceso de lavado con acetona durante 3 min y secadas al aire para permitir la evaporación. Se identificó y pesó cada una de las bolsas en una balanza analítica para el registro del peso antes de agregar la muestra, así como de una canica para asegurar que las bolsas quedaran sumergidas en el frasco con líquido ruminal. Una vez concluido el pesaje se agregó la muestra (500 mg) de cada uno de los microencapsulados y de un testigo (bolsa vacía). Las bolsas fueron selladas utilizando una selladora de impulso-calor para evitar la salida de las muestras. Por cada tratamiento se prepararon 3 muestras.

Para el montaje se agregó 500 mL de la solución A, 100 mL de la solución B y 150 mL de líquido ruminal en un frasco de digestión. Se colocaron las bolsas con la muestra dentro del frasco y se llevó a una incubadora con agitación orbital (INCU-SHAKER Mini. New Jersey, USA) por un periodo de 48 h.

Al término de la incubación las bolsas fueron lavadas con agua destilada (3 veces) hasta obtener las bolsas limpias y posteriormente secadas en un horno a 100°C por 24 h. Fueron pesadas y registradas para obtener por diferencia de pesos el porcentaje de muestra degradada usando la siguiente ecuación:

$$\% DTIV BS = \frac{100 - (W_3 - (W_3 \cdot C_1)) \cdot 100}{(W_2 \cdot DM)}$$

Donde:

W_3 = peso de la bolsa tarada.

W_2 = peso final de la bolsa seca post-digestión *in vitro*.

C_1 = Corrección de la bolsa blanco (testigo).

7.7 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA. En los casos pertinentes se realizaron comparación de medias por Tukey. Se estableció un valor de (p) de 0.05. para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico Minitab 18.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Evaluación antihelmíntica del extracto hidroalcohólico de pulpa de café sobre *Haemonchus contortus*

8.1.1 Inhibición de la eclosión del huevo (%IEH)

Los resultados de las pruebas de inhibición de la eclosión (%IEH) mostraron que las concentraciones de 200 y 100 mg/mL obtuvieron un %IEH del 99% y las concentraciones de 50, 25 y 12.5 mg/mL obtuvieron un efecto del 98% y no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con ivermectina (Tabla 1).

Tabla 1.- Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (%IEH) de *Haemonchus contortus* con el uso de extracto hidroalcohólico de pulpa de café.

Concentración (mg/mL)	Inhibición de la eclosión (%)
Agua	4.44 ± 0.56 ^b
Ivermectina (5 mg/mL)	100 ± 0.54 ^a
Extracto de pulpa de café 200 mg/mL	99.67 ± 0.90 ^a
Extracto de pulpa de café 100 mg/mL.	99.30 ± 1.11 ^a
Extracto de pulpa de café 50 mg/mL	98.21 ± 0.72 ^a
Extracto de pulpa de café 25 mg/mL	98.19 ± 0.52 ^a
Extracto de pulpa de café 12.5 mg/mL	98.69 ± 0.27 ^a

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Mitre *et al.* (2017) encontraron que el extracto hidroalcohólico de *Acacia cochliacantha* mostró una inhibición total de la eclosión de huevo de *Haemonchus contortus* en una concentración del 100 mg/mL. Los principales compuestos encontrados en este extracto fueron ácidos cafeíco, P-cumárico, ferúlico, cafeato de metilo y quercetina.

De igual forma León *et al.* (2015) realizaron estudios con extractos acuosos de la misma planta y lograron obtener efectos similares contra los nematodos de los rumiantes a través de la reducción de los huevos por gramo de heces (EPG) en cabras infectadas artificialmente con *H. contortus*.

El mecanismo de acción de los compuestos presentes en plantas sigue siendo uno de puntos más importantes en la investigación. No obstante, existen reportes donde sugieren que las disminuciones de la carga parasitaria en animales infectados con nematodos gastrointestinales sufren daños a nivel de embrión y a la larva en desarrollo frente a la exposición de compuestos como los polifenoles. En el estudio realizado por Mitre *et al.* (2017) el ácido cafeico y el cafeato de metilo fueron los compuestos más activos contra el huevo de *H. contortus*. Aunque no se descarta un efecto sinérgico de los compuestos.

8.1.2 Prueba de mortalidad larvaria (% ML)

Los resultados que se presentan en la Tabla 2 indican que el extracto hidroalcohólico de pulpa de café a concentraciones de 200 a 100 mg/mL mostraron diferencias significativas en la mortalidad larvaria (%ML) ($p < 0.05$) en comparación con ivermectina y agua. Por otro lado, las concentraciones de 50 a 12.5 mg/mL mostraron diferencias significativas con el control de agua e ivermectina obteniendo los menores %ML con 24, 22 y 20 % respectivamente.

Tabla 2.- Porcentaje de mortalidad larvaria de *Haemonchus contortus* con el uso de extracto hidroalcohólico de pulpa de café.

Concentración (mg/mL)	Mortalidad larvaria (%)
Agua	5.98 ± 0.50 ^e
Ivermectina (5 mg/mL)	100 ± 0.10 ^a
Extracto de pulpa de café 200 mg/mL	82.85 ± 0.60 ^b
Extracto de pulpa de café 100 mg/mL.	51.25 ± 0.68 ^c
Extracto de pulpa de café 50 mg/mL	24.04 ± 1.03 ^d
Extracto de pulpa de café 25 mg/mL	22.16 ± 0.16 ^d
Extracto de pulpa de café 12.5 mg/mL	20.50 ± 1.04 ^d

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Este porcentaje de mortalidad del 82.85% por parte del extracto tiene relación con un estudio realizado por Williams *et al.*, (2014) quienes evaluaron la actividad antihelmíntica de 5 plantas con alto contenido de taninos condensados en diferentes etapas de desarrollo de las larvas (L1, L2, L3 y L4) 3 de los extractos mostraron una mortalidad del 90% a una concentración de 125 µg/ mL observando además una respuesta dosis dependiente donde a menor concentración se perdía el efecto. La diferencia con lo reportado por estos investigadores es que utilizaron una concentración más baja a la utilizada en este trabajo de investigación. No obstante, existen factores que pueden influenciar la respuesta de los metabolitos frente a helmintos como por ejemplo aquellos propios de la planta (tipo de planta, edad, región de cultivo), así como factores asociados al método de extracción (solventes

utilizados, tratamiento del material vegetal y método de extracción) (Sepúlveda-Jiménez *et al.* 2003).

Este mismo comportamiento se observó en la evaluación del extracto hidroalcohólico de pulpa de café con una disminución del efecto del extracto en la concentración de 100 mg/mL, el cual obtuvo 51% de mortalidad y su tendencia de disminución del efecto con relación a la disminución de la concentración del extracto.

Ortiz *et al.*, (2016) evaluaron el efecto antihelmíntico del percolado de café de forma *in vitro* e *in vivo* sobre un aislado de *H. contortus* con baja susceptibilidad a taninos. En el estudio *in vitro* concluyeron que el extracto acetónico del percolado de café posee un efecto antihelmíntico al inhibir el desenvaine de las larvas L3, obteniendo un porcentaje de inhibición del 61% a 150 µg/mL y un 100% de inhibición del desenvaine a una concentración de 1200 µg/mL con respecto al control. Sin embargo, en esta investigación no se realizó el bioensayo de inhibición del desenvaine.

Para el estudio *in vivo* fueron alimentados 18 ovinos de pelo (cruza no definida de Pelibuey, Dorper y Katadin), fueron asignados en grupos de 3. Uno alimentado de forma convencional sin el percolado, el segundo con una dieta que contenía el 10% de percolado de café y un último grupo que recibió una dieta que contenía el 10% de percolado de café adicionado con polietilen glicol como un bloqueador de taninos. Concluyendo que el consumo de alimento conteniendo un 10% del subproducto no produjo un efecto antihelmíntico en ovinos infectados con el asilado utilizado. También que la ausencia del efecto antihelmíntico se puede atribuir a la baja actividad de los compuestos sobre el aislado de *H. contortus*. No obstante, Covarrubias *et al.*, (2013) logró observar un efecto antihelmíntico con un asilado diferente en cabras alimentadas con el mismo subproducto (percolado). Sin embargo, el efecto podría asociarse a que estas cabras consumieron una mayor cantidad del percolado y al tiempo de consumo al que estuvieron expuestas.

En esta vertiente, Yoshihara *et al.*, (2015), empleando un extracto de corteza de Sauce a 300 µg/ mL y una temperatura de incubación a 38 °C, se encontró que a las 24 h el porcentaje de mortalidad era muy bajo y mostraban un efecto de disminución de la motilidad, los cuales se dejaron incubar hasta 30 h obteniendo así la mortalidad larvaria de 60%. Además, en el estudio de microscopia se verifico si las larvas habían muerto debido a inanición o disminución de la motilidad agregando *Echerichia coli* fluorescente, observaron que la actividad de bombeo de la faringe se vio afectada al consumir los taninos condensados y otro porcentaje presente en tracto digestivo de los nematodos. Por lo que concluyen que el tiempo de exposición, la concentración y el tamaño de los compuestos son tres parámetros importantes que influyen en la actividad antihelmíntica de los extractos vegetales.

8.1.3 Pruebas de hemolisis directa

En la tabla 3 se muestran los valores de hemolisis para las concentraciones evaluadas. De acuerdo con las pruebas realizadas con las tres concentraciones del extracto hidroalcohólico de pulpa de café que presentaron la mejor actividad provocando la mortalidad larvaria a los 30 y 60 minutos, no se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones 100, 12.5 mg/mL del extracto y los controles positivos, pero si entre las dos concentraciones y el control negativo a los dos tiempos de incubación (30 y 60 min).

Tabla 3.- Porcentaje de hemólisis del extracto hidroalcohólico de pulpa de café sobre eritrocitos de ovino a dos tiempos de incubación.

Tratamientos.	30 min	60 min
SSF 0.9% (-)	0.6 ± 0.00 ^b	0.6 ± 0.00 ^b
Agua oxigenada 10% (+)	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a
Carbonato de sodio 0.1% (+)	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a
200 mg/mL	FD	FD
100 mg/mL	74 ± 1.1 ^a	45.8 ± 1.4 ^a
12.5 mg/mL	55 ± 1.01 ^a	60 ± 2.1 ^a

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos. FD: Fuera de Rango

Este efecto podría asociarse con la sensibilidad de los eritrocitos al contacto con cualquier sustancia provocando una ruptura de la membrana liberando hemoglobina. Para el caso de la concentración de 12.5 mg/mL se obtuvo un 55% de hemólisis a un tiempo de incubación de 30 minutos y un 60% a 60 minutos. Bajo este criterio, el efecto de hemólisis puede sugerirse que es dependiente de la concentración y a su vez del tiempo de exposición ya que a mayor concentración y mayor tiempo de contacto de eritrocitos con el extracto hay una mayor cantidad de hemoglobina presente.

Este tipo de ensayos son importantes debido a la toxicidad de los compuestos presentes en los extractos vegetales, dicha toxicidad de acuerdo con algunos reportes está asociados a compuestos de naturaleza polifenólica, de los cuales destacan compuestos como ácido clorogénico, ácido ferúlico, cafeína y algunas isoformas de estos afectando la homeostasis celular (Sepúlveda-Jiménez *et al.* 2015).

A pesar de que los metabolitos secundarios pueden tener efectos terapéuticos, muchos de ellos además pueden ser tóxicos actuando como agentes hemolíticos. Por lo tanto, el alto porcentaje de hemólisis obtenido en este trabajo concuerda con lo reportado por Madariaga *et al.*, (2009) quienes evaluaron concentraciones de 0.5 mg/mL hasta 3.0 mg/mL obteniendo porcentajes de hemólisis similares a los alcanzados en esta investigación. Siendo así que la proporción de los diferentes metabolitos secundarios presentes en los extractos influyen en las diferencias observadas, así como los tiempos de incubación. No obstante, los ensayos directos que emplean eritrocitos suelen presentar la desventaja de una ruptura de la membrana al contacto con extractos por un desequilibrio homeostático. Es por ello por lo que existen otro tipo de pruebas menos drásticas como pruebas de hemólisis indirectas.

8.1.4 Pruebas de hemólisis indirecta

La prueba de hemólisis indirecta permite analizar el comportamiento de los eritrocitos ante un agente hemolítico sin afectar su homeostasis de forma abrupta.

La relativa simplicidad estructural y funcional del eritrocitos, además de la presencia de una bicapa lipídica semejante a la del resto de las células, permiten inferir que un daño en su membrana se correlacionaría con una alta probabilidad de que otra célula más compleja y con mayor cantidad de organelos susceptibles al daño en sus sistema membranoso puedan responder igual o con mayor intensidad que los eritrocitos, por ello es que este tipo de célula constituye un buen modelo primario para el estudio de diversas sustancias sobre membranas biológicas (Madariaga *et al.* 2009).

En la Figura 4 se muestran las concentraciones del extracto evaluadas, así como los controles positivo y negativo. La SSF 0.9 % control negativo (A), Tween 80 % control positivo (B) y las concentraciones de extracto (mg/mL) que fueron 200 (C), 100 (D), 50 (E), 25 (F) y 12.5 (G).

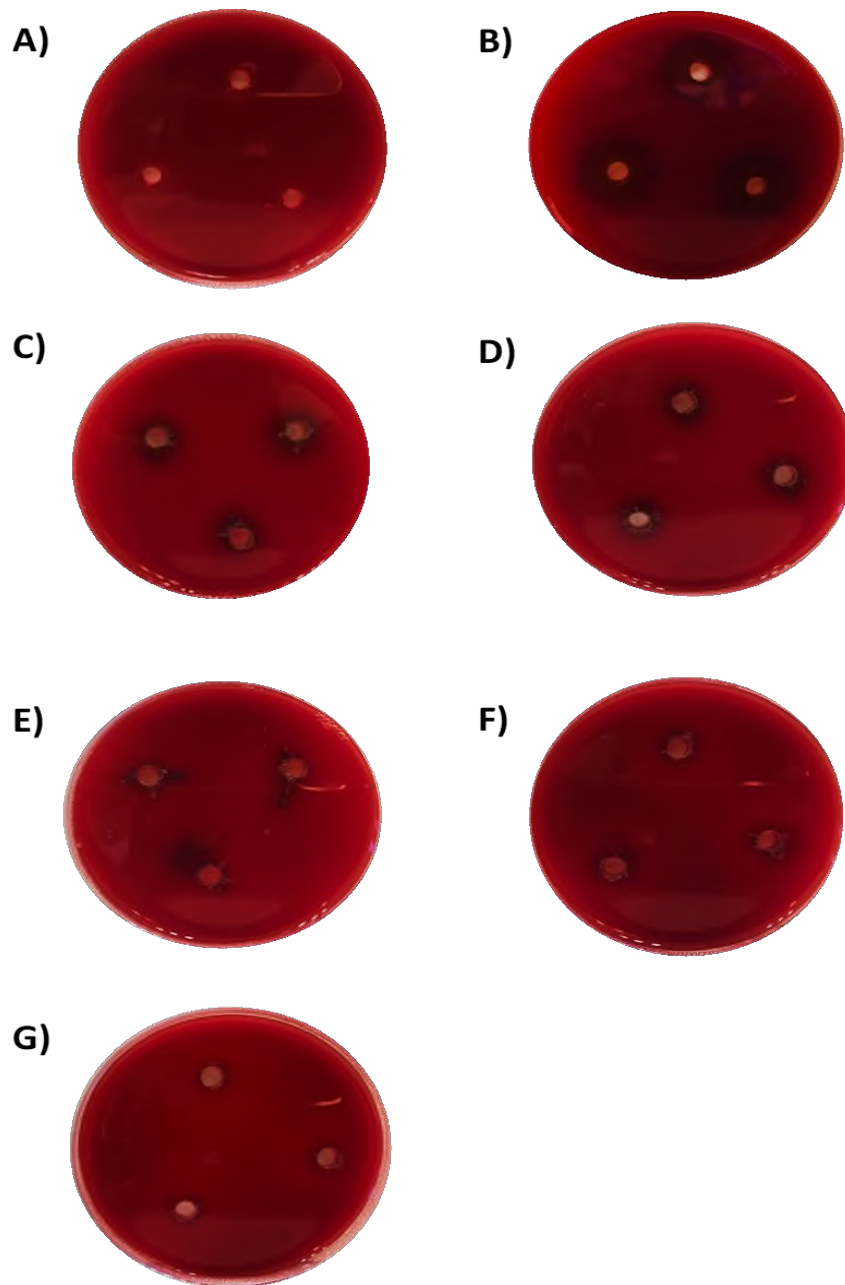


Figura 4.- Hemólisis indirecta en agar sangre, control negativo (A), control positivo (B), 200 mg/mL (C), 100 mg/mL (D), 50 mg/mL (E), 25 mg/mL (F) y 12.5 mg/mL (G).

Para el caso de los controles tanto negativo como positivo los resultados fueron los esperados en donde la solución salina al 0.9% no generó la formación de un halo de hemólisis. Por otro lado, el control positivo que es Tween 80% obtuvo halos de hemólisis de 9 mm debido a su conocida actividad surfactante y ampliamente usado para romper las membranas celulares liberando el contenido celular, por lo tanto, de acuerdo con los halos formados se puede inferir que se generó ruptura de la membrana de los eritrocitos liberando a la hemoglobina.

Existen reportes donde se han estudiado mediante estudios *in vitro* compuestos presentes en extractos de plantas ricos en polifenoles, ya que si bien son considerados como agentes de alto potencial terapéutico podrían ser también agentes tóxicos generando lisis celular (Mena *et al.* 2015). No obstante, a pesar de que la pulpa de café es rica en compuestos del tipo polifenol como ácido clorogénico, catequina, epicatequina, rutina, cafeína entre otros de acuerdo con el ensayo no logro una formación de halo de hemólisis aparente en las distintas concentraciones utilizadas por una posible ausencia de compuestos altamente hemolíticos como las saponinas. Algunos autores plantean, que las saponinas son capaces de formar complejos con los esteroides de la membrana celular de los eritrocitos, en consecuencia, ocurre un aumento de la permeabilidad celular, continuo de la ruptura de la membrana del eritrocito y la pérdida o liberación de hemoglobina (Castillo *et al.* 2002).

De acuerdo con Mena *et al.*, (2015) quienes realizaron un tamizaje fitoquímico de pulpa de café, indicaron la presencia de compuesto del tipo fenólico, flavonoides, taninos y bajo en saponinas. Por lo tanto, la ausencia de hemólisis en placa podría asociarse a la baja concentración de saponinas presentes en el extracto hidroalcohólico de pulpa de café.

Aunque los saponósidos son solubles en agua e insolubles en disolventes orgánicos de media y baja polaridad durante el proceso de extracción del extracto hidroalcohólico de pulpa de café al ser el metanol el solvente de mayor presencia pudiera no haberse extraído las saponinas presentes en el material vegetal además no realizar el proceso de dilapidación que se menciona en reportes como el de Lopez *et al.*, (2001) quienes establecen que para el aislamiento se utilizan alcoholes de alta polaridad tras un proceso de deslipidación, ya que de no hacerlo dificulta el proceso de extracción.

La proporción relativa de los diferentes metabolitos presentes en el extracto estudiado podría estar influyendo en las diferencias observadas entre las concentraciones empleadas con el control positivo (Tween 80). Estos resultados fueron similares a lo reportado por Madariaga *et al.*, (2009) quien realizó ensayos de hemólisis con los extractos acuosos de *Solanum melongena*, *Ciccus sicyoides* y *Plantago major* y no encontró hemólisis producida asociándolo a que las concentraciones de los extractos evaluados son menos agresivas con los eritrocitos en comparación que con los agentes hemolíticos. Si bien este resultado pudiera estar justificado, en buena medida, por la ausencia en el extracto de pulpa de café de algún tipo de fenol o tanino, metabolitos que pudieran tener efecto protector al daño en la membrana; además en el extracto si se llegaran a presentar valores muy bajos de alcaloides también puede influir en el comportamiento frente al eritrocito considerando además que existen factores externos que pudieran intervenir en la lisis de los eritrocitos como pH, temperatura y tipo de sangre.

A pesar no presentar halos de hemólisis para ninguna de las concentraciones de extracto evaluadas se pudo observar una ligera tendencia de pigmentación dependiente de la concentración, que iba de un color café-oscuro a uno marrón casi transparente. Esta característica de color en la especie *Coffea arabica* está relacionada con el grado de maduración del fruto y este a su vez está asociada con el color del epicarpio o parte externa de la pulpa (Azcón & Talón, 2000).

8.2 Caracterización morfológica del almidón de malanga nativo y modificado físicamente

8.2.1 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Las formas de los gránulos de almidón dependen de la fuente botánica de la que fueron extraídos. Además, la morfología y tamaño son variadas e incluso en algunos casos una mezcla de ambos. Para el caso del tamaño se pueden clasificar en grandes, como el caso de la papa, medianos como el maíz, pequeño como la yuca y muy pequeños. Para el almidón de malanga en su forma nativa (Figura 5A) se observaron gránulos pequeños en un intervalo de entre 5-9 μm , en su mayoría con morfología variada, destacando los gránulos en forma poligonal y otros con forma esférica. Datos que son similares a los obtenidos por Jane *et al.*, (1992) la cual menciona que el almidón de malanga presenta gránulos de forma irregular y poligonal con un tamaño aproximado de 3-6 μm en promedio. Misma situación en el caso de Torres *et al.*, (2013) en donde comparó las propiedades funcionales la malanga en su variedad blanca y morada. En cuanto al tamaño de gránulo reportó que la morfología no se veía afectada por la variedad de malanga. Sin embargo, reportó una ligera diferencia en cuanto al tamaño del gránulo que podría estar asociado a los distintos orígenes del almidón.

Para la micrografía 5B que corresponde a la molienda mecánica de 20 min no se logran percibir cambios morfológicos aparentes. No obstante, se puede observar que a ese tiempo de molienda se mantiene integra la estructura granular e incluso la morfología. Caso contrario lo que se muestra en las micrografías 5C y 5D.

En específico para la micrografía 5C correspondiente a los 30 min de molienda mecánica se presentó un fenómeno de aglomeración de gránulos de tamaños no mayores a 5 μm , a pesar de haber aumentado el tiempo de molienda se logra mantener estructura granular de forma parcial. Finalmente, para 5D este comportamiento de aglomeración se manifestó de forma más evidente al poder observar poblaciones de tamaños considerablemente grandes. A pesar de ello, aun se logran observar poblaciones de gránulos pequeños que podrían oscilar entre los 10 y 50 μm .

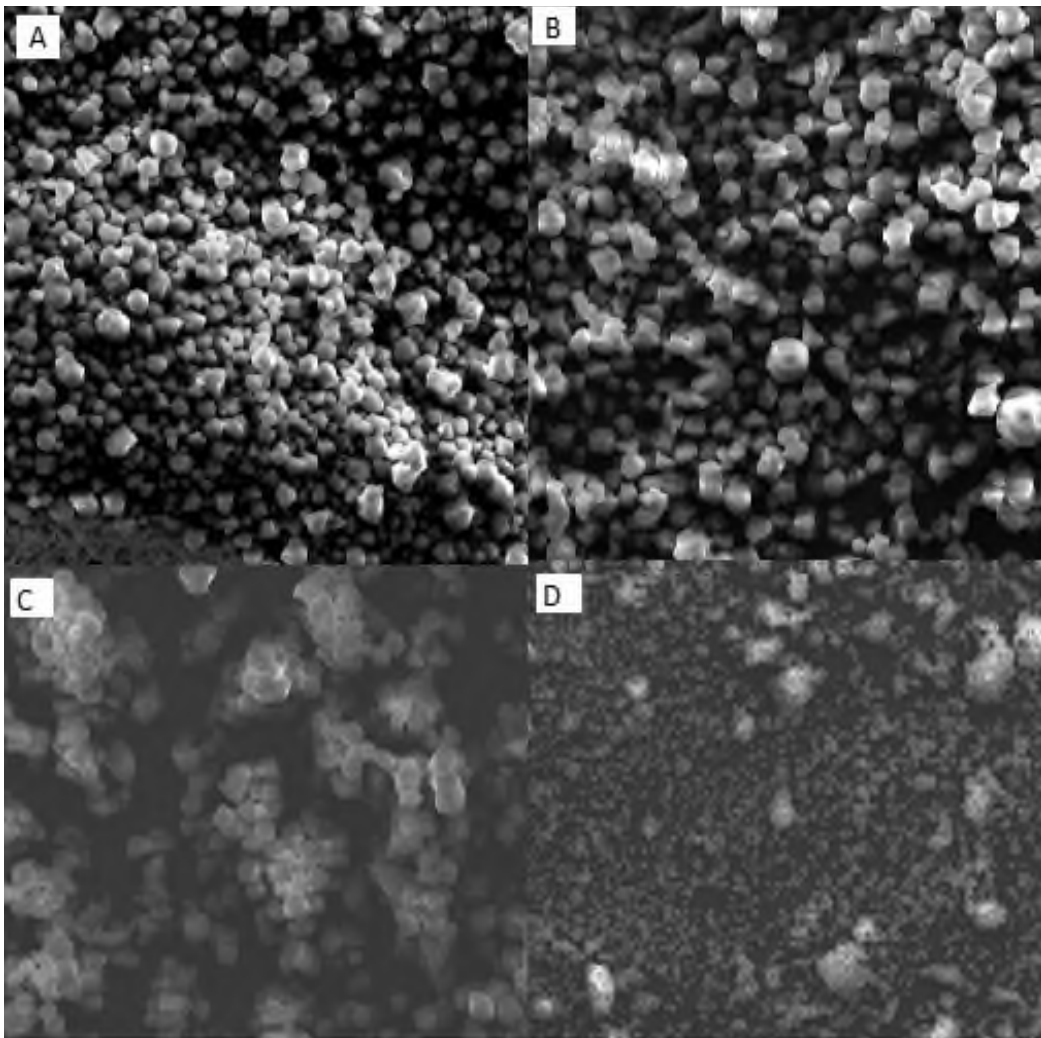


Figura 5.- Micrografías del almidón modificado de malanga nativo (A) 2000x, molienda de 20 minutos (B) 2000x, molienda de 30 minutos (C) 4000x y molienda de 40 minutos (D) 4000x.

Se pudo observar que en el almidón modificado mediante molienda mecánica de alta energía con bolas de nitruro de silicio en una relación 10:1:1 (bolas, almidón y agua desionizada) los gránulos tendían a formar aglomerados con relación al aumento del tiempo de molienda. No obstante, la morfología de los gránulos se no se vio afectada directamente por lo que conservó su estructura granular. Debido a que los tiempos de molienda no fueron amplios, la reducción del tamaño del gránulo no fue tan significativa, además es importante mencionar que el almidón de malanga en su forma nativa posee gránulos de tamaño pequeño en un intervalo de 5-9 μm .

Lin *et al.* (2011) obtuvieron nano partículas a partir de almidón de papa el cual posee gránulos grandes (16 μm) de hasta 120 nm después de triturar la muestra por 90 min. La superficie de la partícula era rugosa, con una característica similar a la felpa, y la capacidad de absorción era seis veces mayor a la del almidón nativo. Por lo tanto, las partículas de almidón de tamaño nanométrica se podrían considerar como un buen medio de inclusión en materiales biomédicas y químicas.

En términos generales el tamaño de partícula es una de las propiedades primordiales para poder emplear a los polímeros como el almidón en procesos como el secado por aspersion ya que al implementarlo como material de pared este puede impactar en las características del producto final.

El almidón de malanga en particular al tener gránulos considerados pequeños posee la capacidad de formar agrupaciones inducidas por fuerzas electrostáticas aunado al contenido de proteína u otros componentes como lípidos. Por lo tanto, considerando lo anterior el conjunto de estas características deben considerarse importantes para la implementación del almidón como agente encapsulante.

Se ha sugerido que la proteína del almidón de malanga es aproximada entre 7g/100g de almidón. Gonzáles *et al.*, (2011) mencionan que al poseer un alto porcentaje de proteína y considerar que la malanga tiene un gránulo pequeño esta podría actuar como un agente de unión a través del efecto de reticulación mediado por proteínas en la superficie de los gránulos al ser procesados por una etapa como el secado por aspersión. De igual forma Huang *et al.* (2015) encontraron que la combinación de la fricción, colisión, y fuerza pueden generar cambios en las propiedades funcionales del almidón modificando la morfología del gránulo, cristalinidad y peso molecular.

8.2.2 Distribución del tamaño de partícula (DTP)

Para en análisis de distribución de tamaño de partícula fueron empleados dos métodos, un método seco el cual funciona con aire a presión y un método húmedo empleando ultrasonificador, este último fue el método seleccionado para el análisis de tamaño de partícula. En la Figura 6 se muestra el patrón distribución de tamaño de partícula por el método húmedo. El almidón nativo (A) mostró una distribución del tipo multimodal al contar con 3 diferentes poblaciones en tamaño, el primero entre 0.5 a 1 μm , el segundo entre 2-8 μm y el último que fue de 10 - 40 μm . Con respecto a los diferentes tiempos de molienda 20 (B), 30 (C) y 40 (D) min. Las poblaciones menores de 0.5 a 1 μm y las mayores a 40 μm se veían disminuidas de forma gradual dependientes del tiempo y se veía reflejado en el aumento con respecto al volumen de la población de 2-8 μm , donde a mayor tiempo de molienda esta población se veía mayormente beneficiada en términos de volumen (%).

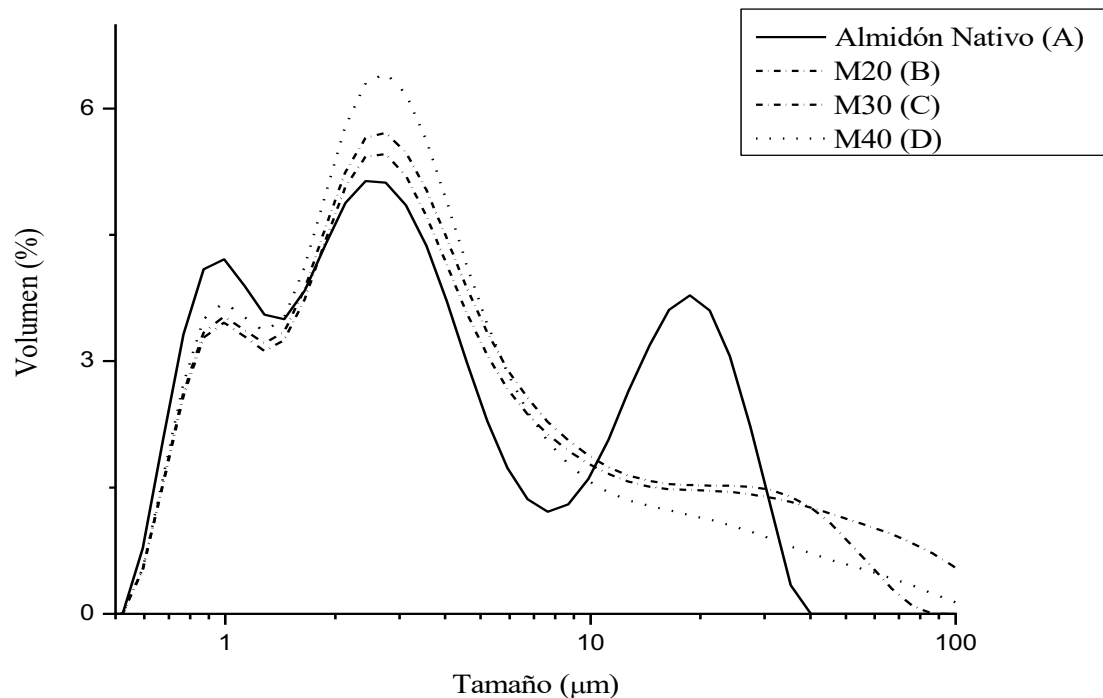


Figura 6.- Distribución de tamaño de partícula del almidón nativo y modificado con diferentes tiempos de molienda por el método húmedo.

Por otro lado, de acuerdo con el análisis, en los tres diferentes tiempos se logró observar una población mayor a 40 μm que podría estar asociada a la formación de aglomerados como efecto de la molienda aunado al tema de contenido de proteína enlazados por fuerzas electrostáticas como las de Van der Waals.

En una investigación realizada por (Zang, 2015) encontraron que el almidón de maíz modificado físicamente mediante molienda mecánica de bolas y etanol mostró un aumento en volumen en comparación con el almidón nativo. De igual forma mencionan que el material de bolas utilizado podría intervenir en los tamaños obtenidos después del proceso de molienda de acuerdo con la densidad del material del tazón y de bolas. (Li, 2014) menciona que el grado de daño de los gránulos de almidón depende de las condiciones de molienda, lo que incluye la fuerza, temperatura y el contenido de humedad.

En el caso de los picos con mayor volumen como se pudo comprobar con SEM podría estar asociada a la formación de agregados de los gránulos. Cabe mencionar que la malanga al poseer de forma nativa un gránulo pequeño tiene la característica de formar este tipo de aglomerados, así como a la presencia de proteínas y lípidos que pueden reforzar estas aglomeraciones.

8.3 Caracterización reológica del almidón nativo y modificado físicamente

8.3.1 Perfil de viscosidad

El perfil de formación de pasta es un fenómeno que ocurre cuando el almidón es calentado de forma constante llamada fase de calentamiento (30 a 95°C) en un medio acuoso excesivo, es entonces cuando los gránulos de almidón se hinchan absorbiendo el agua del medio lo que le va proporcionando cierta viscosidad y se registra como el inicio del hinchamiento de los gránulos. Al continuar calentando los polímeros de bajo peso molecular como la amilosa comienzan a lixivarse desde el gránulo dando lugar a un valor o pico máximo de viscosidad que es donde la mayoría de los gránulos se han hinchado totalmente. Posteriormente, en la etapa de cocción (95°C), el proceso es estabilizado a dicha temperatura de cocción por unos minutos y se presenta una disociación molecular continuando con la lixiviación de los polímeros (amilosa y amilopectina) quedando dispersos en el medio acuoso donde se registra una disminución de la viscosidad. Ya en la etapa de enfriamiento (95 a 40°C) tanto la amilosa como la amilopectina comienzan a reasociarse siendo la primera la más rápida en llevar a cabo este proceso por ser menos compleja a nivel estructural y se registra un ligero aumento en la viscosidad. Este segundo aumento es atribuido al proceso de gelificación o formación de pasta.

En la Figura 7 se puede observar el perfil de formación de pasta del almidón de malanga en su forma nativa (A) y sus tratamientos de molienda 20 (B), 30 (C) y 40 (D) min. Para el almidón nativo (A) se obtuvo el pico máximo de viscosidad en 2.7 P.a. con una temperatura de 90°C.

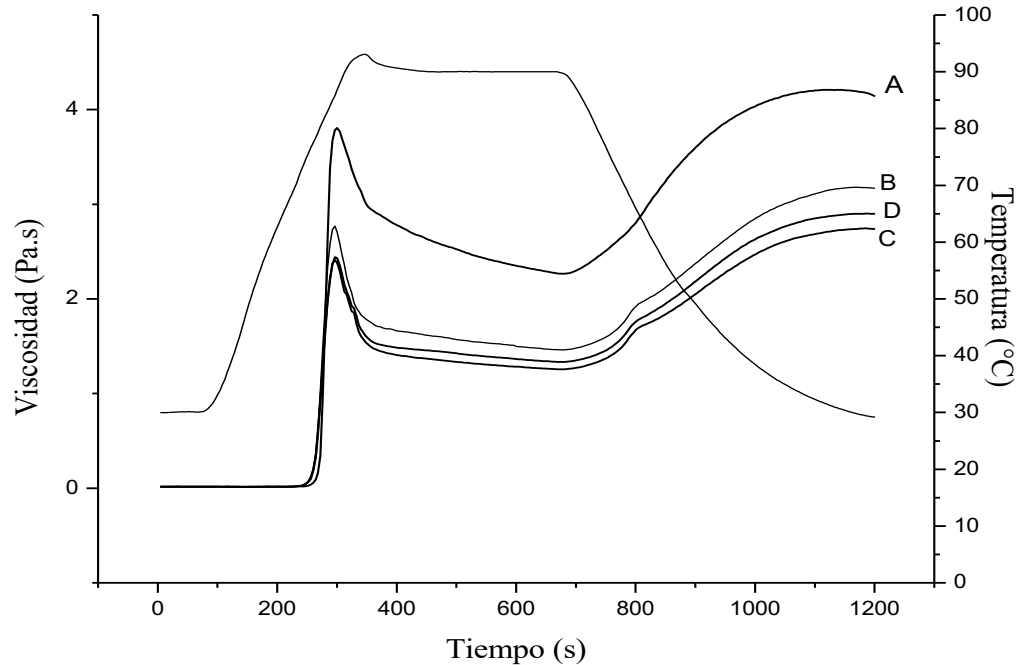


Figura 7.- Perfil de formación de pasta del almidón nativo (A) en el que se observa la disminución de la viscosidad conforme al tiempo de molienda 20 (B), 30 (C) y 40 (D) min.

Posteriormente al llegar a la etapa de cocción (95 °C por 10 minutos) esta viscosidad se ve disminuida debido a la disociación molécula, pérdida de la birrefringencia y por ende pérdida de la estructura granular tanto la amilosa como la amilopectina quedan dispersas. Durante la etapa de enfriamiento se puede apreciar una un incremento de la viscosidad debido a la reasociación molecular que lleva a cabo la amilosa que se encuentra de forma libre formando mallas tridimensionales con las moléculas de agua presentes por medio de enlaces de puentes de hidrógeno.

En el caso del almidón modificado con los diferentes tiempos de molienda se puede observar una disminución en la viscosidad máxima de 2.7- 2.3 P.a. S Siendo la modificación de 30 y 40 min los que logran tener viscosidades más bajas. Bajo ese esquema la disminución de la viscosidad podría asociarse al daño estructural de los gránulos de almidón, específicamente a las regiones semicristalina representadas por la amilopectina, la cual se sabe es la encargada principalmente del poder de hinchamiento. Durante la etapa de cocción el comportamiento es similar para los 3 diferentes tiempos de molienda. Para la etapa de enfriamiento la gráfica muestra una disminución en la viscosidad.

Esta disminución en la viscosidad coincide con los resultados de Zhang *et al.* (2015) quienes encontraron que después de realizar molienda mecánica de bolas al almidón de maíz el pico de viscosidad, y temperatura de transición vítrea habían disminuido, dado que al estar dañada la estructura granular el proceso de hinchamiento era menor y se requería menor cantidad de energía para gelatinizarlo. Además, el almidón tratado con molienda podía ser gelatinizado más fácilmente. Esto sugiere que los daños fueron más hacia la estructura cristalina.

Por otro lado, Martínez *et al.*, (2012) reportó que la viscosidad del almidón de yuca tratado con molino de bolas disminuía con respecto al aumento del tiempo de molienda, en este caso después de observar el efecto de la molienda a diferentes tiempos se realizó la elección del tiempo de molienda de 30 min basados en los resultados obtenidos en viscosidad, morfología y tamaño de partícula obtenida para su implementación como agente encapsulante en un proceso de secado por aspersión.

En este sentido Liu *et al.*, 2011 y Tan *et al.*, 2015 mencionan que las técnicas emergentes, especialmente aquellas basadas en enfoques físicos han atraído una atención considerable, ya que se ha demostrado que se tiene una menor producción de desechos durante el procesamiento y se pueden generar productos de alta seguridad.

Para el caso del molino de bolas se puede atribuir que es una técnica de modificación física rentable y sobre todo ecológica, se han reportado datos como los de Liu *et al.*, (2011) que han confirmado que la técnica es capaz de regular algunas propiedades como la solubilidad, digestibilidad y formación de pasta del almidón relacionada con el material de bolas utilizada y el tiempo de molienda.

8.3.2. Viscoelasticidad

En términos de reología esta se puede definir como el estudio de la deformación y el comportamiento de flujo de la materia, las cuales abarcan la viscosidad, elasticidad y en algunos casos la plasticidad (Barbosa *et al.*, 1999). Existen varias razones para justificar este tipo de estudios, como, por ejemplo: contribuir en el conocimiento de la estructura del material de estudio, así como la relación que existe entre el tamaño de partícula y forma molecular. Además, el grado de entrecruzamiento de los polímeros como el almidón y su elasticidad.

Otro ejemplo es a nivel industrial en grandes farmacéuticas e incluso en industrias alimentarias donde con ayuda de estos análisis se puede predecir el comportamiento de los materiales sometidos a procesos de encapsulación tales como el secado por aspersión, ya que al ser un método que requiere de materiales con características específicas se debe analizar la muestra a procesar. Basado en lo anterior, en un equipo de secado por aspersión de acuerdo con Botrel *et al.* (2014) se prefieren materiales con propiedades viscoelásticas mejoradas en términos elásticos, que permiten una buena formación de partículas con acabados superficiales suaves y de mejor calidad, e impactando en otras características del producto final.

El análisis de pruebas oscilatorias permitió el monitoreo del proceso de gelificación de los almidones. Este fenómeno es considerado de naturaleza compleja y la cual en algunos casos involucra la asociación de cadenas intermedias en regiones ordenadas de la estructura.

8.3.2.1 Barrido de amplitud de deformación

En las figuras 8 y 9 se muestran los barridos de amplitud de deformación para las dos etapas, en la primera etapa (90°C) se generó el hinchamiento máximo de almidón y en la segunda (25°C) se observó el proceso denominado gelificación, que da como resultado la formación de un gel. En estos barridos de forma general se apreció y estableció la denominada región viscoelástica lineal de las muestras de almidón. Por lo tanto, se infiere que al 2% de deformación a una temperatura de 90°C se puede realizar el barrido de frecuencia para todas las muestras.

En el proceso de gelatinización a 90°C en la Figura 8 el almidón nativo (N) presentó un comportamiento dominante del módulo de almacenamiento (G') sobre el módulo de pérdida (G'') hasta un 2% de deformación. Del mismo modo, los almidones tratados por molienda a 30 y 20 min presentaron valores y comportamientos similares en el módulo de almacenamiento (G') así como para los valores del módulo de pérdida (G''). Caso contrario se presentó para el almidón tratado por molienda a 40 min, el cual mostró una tendencia viscoelástica lineal hasta el 10% de deformación por lo que se infiere cierto nivel de estabilidad.

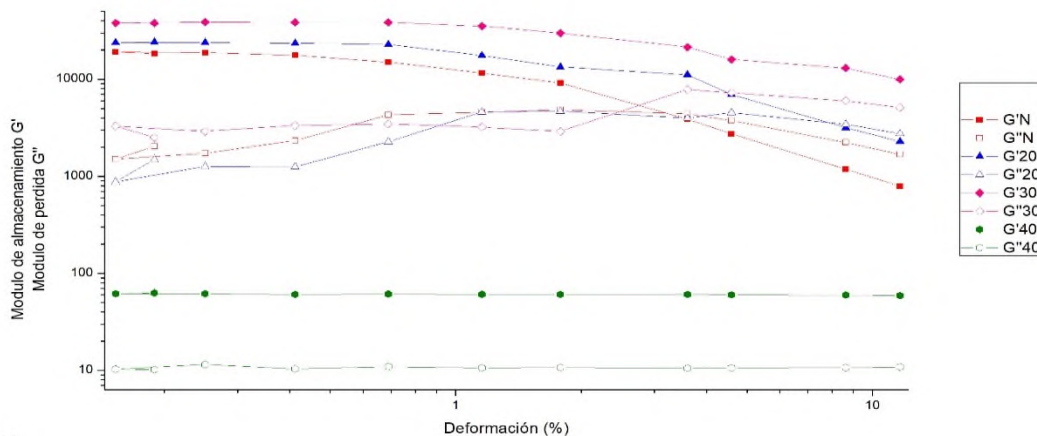


Figura 8.- Barrido de amplitud de deformación del almidón nativo y los distintos tiempos de molienda a 90°C.

Este tipo de patrón mostrado para el almidón nativo, molienda de 20 y 30 min puede asociarse al proceso de hinchamiento de los gránulos de almidón a esa temperatura (90°C) ya que a pesar de haber sufrido un tratamiento de molienda retomando las micrografías se conserva dicha estructura, por lo que el hinchamiento puede mostrarse similar al no presentar cambios drásticos. Por otro lado, para el almidón de molienda a 40 min al presentar este comportamiento lineal constante nos podría sugerir ciertos cambios estructurales de los gránulos de almidón asociando tamaño de partícula y presencia de componentes como proteínas u otras impurezas. Sin embargo, la tendencia presentada para estos almidones fue dominante en el módulo de almacenamiento (G') a 90°C pesar de los diferentes tiempos de molienda con respecto al nativo. Por lo tanto, se pueden considerar como materiales con un comportamiento más elástico a 90°C.

No obstante, en la Figura 9 si se presentó cierta diferencia, considerando que la temperatura era menor (25°C) siendo la fase de enfriamiento, dónde al llevarse a cabo el reordenamiento de la amilosa de forma más rápida debido a su estructura menos compleja, se encontraron ciertas diferencias en el comportamiento de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'').

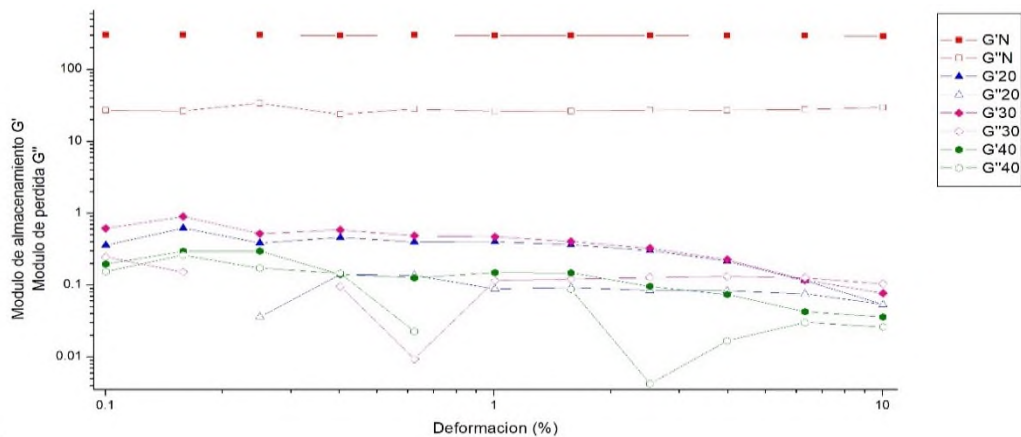


Figura 9.- Barrido de amplitud de deformación del almidón nativo y los distintos tiempos de molienda a 25°C.

Para esta etapa destaca el almidón nativo (N) la predominancia del módulo de almacenamiento (G') sobre el módulo de pérdida (G'') hasta un 10% de deformación. Dicho de otra forma, el almidón nativo presenta un comportamiento del tipo elástico a 25°C durante el proceso de reorganización.

En el caso del almidón de molienda a 20 y 30 min al igual que el grafico anterior muestran mantener el comportamiento similar a 25°C por lo que se sugiere que entre esos dos tiempos no hay una diferencia tan notable asociándolo a términos de tamaño y morfología. No obstante, para el almidón de molienda a 40 min se observa un comportamiento menos estable en el módulo de pérdida (G'') lo que sugiere ruptura del gel. A pesar de eso, cabe mencionar que tanto el almidón de molienda de 20 y 30 min en contraste con el de 40 min en cuanto a su comportamiento lineal es rescatable que predomina el módulo de almacenamiento (G') a 25°C siendo el carácter elástico el parámetro más importante en la estructura del gel de almidón.

En general tanto en la etapa de cocción (90°C) y en la etapa de enfriamiento (25°C) las diferencias entre los almidones tratados por molienda con el almidón nativo podrían explicarse debido a que a cierto nivel de daño y desorganización estructural de forma parcial por efecto del molino de bolas, afectando a las regiones de amilopectina ya que se muestran ciertos cambios de comportamiento lineal en la etapa de cocción (90°C) al ser el polímero encargado del proceso de hinchamiento principalmente. Este comportamiento se puede asociar con los resultados en el perfil de formación de pasta y difracción de rayos x, dónde se pudieron observar cambios en la fracción de amilopectina, por un lado en el perfil de formación de pasta al disminuir el primer punto máximo de viscosidad de forma gradual al aumentar el tiempo de molienda y por otro en la difracción de rayos x, donde mostró la misma tendencia de disminución, en este caso disminuyendo los picos máximos de intensidad relativa conforme al aumento del tiempo de molienda.

Por lo tanto, este tipo de cambios en la estructura del gránulo de almidón provocan que en el análisis de viscoelasticidad se muestren dichas diferencias entre los tratamientos en comparación con el almidón nativo, dando como resultado características de gelatinización y gelificación modificadas.

Este comportamiento reológico de las suspensiones de almidón está relacionado con la fracción de volumen de los gránulos de almidón, así como de su firmeza. La cantidad del material lixiviado y su naturaleza polimérica pueden influir en las propiedades reológicas de los geles de almidón final. En un primer paso durante la gelificación de la amilosa es la formación de la red tridimensional de acuerdo con Elliason *et al.* (1996). En un gel de almidón como los presentados anteriormente puede estar relacionado con una mezcla de gránulos parcialmente hinchados, dañados o rotos, con la fase continua del material lixiviado (amilosa y amilopectina), puede depender de la concentración, la temperatura, el cizallamiento durante el calentamiento, la temperatura de almacenamiento y la presencia de otros compuestos. Además, se conoce que la presencia de gránulos dañados va a influir notoriamente en los análisis fisicoquímicos y reológicos de este tipo de sistemas (Ortega *et al.*, 2003).

La tendencia presentada en el barrido de amplitud de deformación presenta cierta similitud con lo obtenido en el barrido de frecuencia, en los cuales el módulo de almacenamiento (G') de carácter elástico es más predominante que el módulo de pérdida (G'') de carácter viscoso, y que se presenta a continuación.

8.3.2.2 Barrido de frecuencia

Para la primera etapa del barrido de frecuencia (90°C) de forma general para ambos módulos G' y G'' se presentó un comportamiento lineal ascendente de 0.1 – 10 Hz mostrando así una dependencia a la frecuencia.

En específico para como se muestra en la Figura 10 en la etapa de cocción (90°C) tanto el almidón nativo como los tiempos de molienda de 20, 30 y 40 min mostraron un dominio lineal ascendente del módulo G' con carácter elástico sobre el módulo G'' que carácter viscoso.

Por su parte el almidón nativo (N) presentó su módulo G' sobre los módulos G' de las moliendas de 20 y 30 min, las cuales presentaron valores y comportamientos similares, tales que se observa cierto nivel sobrepuesto, indicando así que no hay diferencias de comportamiento ni a bajas ni altas frecuencias.

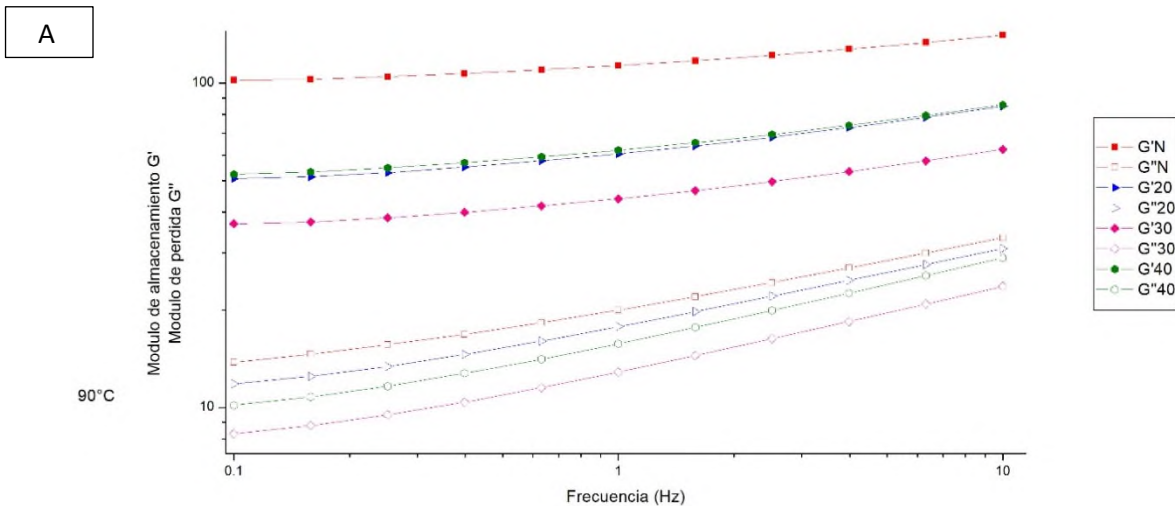


Figura 10.- Barrido de frecuencia (90°C) de los módulos dinámicos del almidón nativo y los diferentes tiempos de molienda.

Por su parte el almidón de molienda de 40 min mostró el mismo patrón lineal ascendente que los anteriores. De esta forma se infiere que el comportamiento de las muestras a la temperatura de cocción es dependiente de la frecuencia, indicando además que se tiene una estructura de biopolímero suave y elástico en solución.

Este tipo de patrón se relaciona directamente con un proceso de hinchamiento por parte de los gránulos de almidón al contar con las condiciones necesarias de temperatura y medio acuoso. Aunado al hecho de que al mismo tiempo se produce la liberación de pequeñas cantidades de amilosa de los gránulos del almidón (Elliason *et al.*, 1996). De acuerdo con Ortega *et al.* (2003) reportó que los polímeros hidratados pueden cumplir una función de relleno, reafirmando la matriz continua de modelos en la estructura.

Para el caso de la segunda etapa (25°C) que se muestra en la Figura 11 el comportamiento del almidón nativo (N) fue muy similar al comportamiento mostrado en la etapa anterior a 90°C en donde del mismo modo, el módulo de almacenamiento G' se encuentra sobre el módulo de pérdida G'' , con un patrón lineal ascendente sin alteraciones asociadas a la frecuencia. Dicho esto, se infiere que el almidón nativo conserva su propiedad de carácter elástico a una temperatura de 25°C atribuido a fracciones de amilosa sin alteraciones por baja o alta frecuencia.

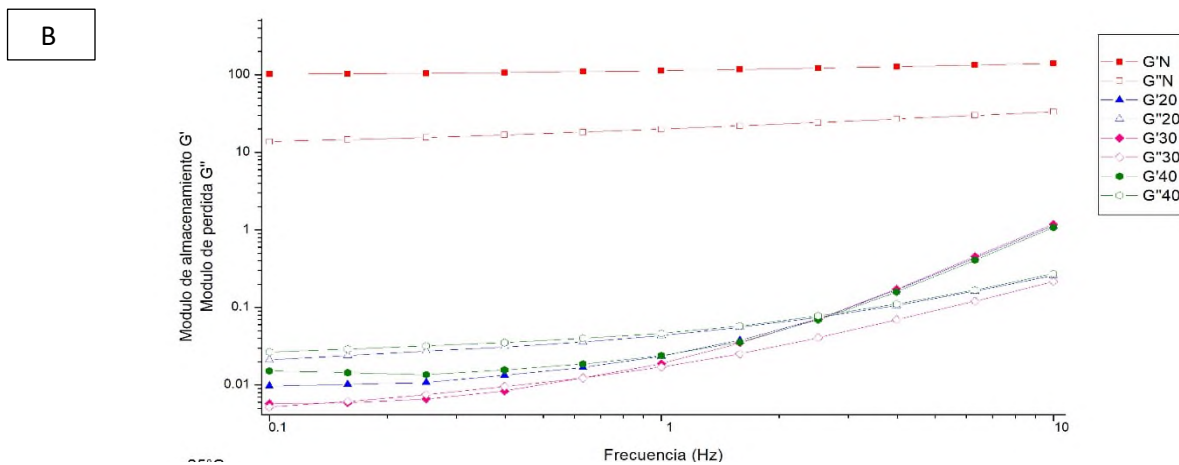


Figura 11.- Barrido de frecuencia (25°C) de los módulos dinámicos del almidón nativo y los diferentes tiempos de molienda.

Por otro lado, para los almidones tratados por molienda a 20, 30 y 40 min las diferencias entre los módulos presentaron una dependencia a la frecuencia. En primera instancia el almidón de 20 y 30 min mostró el mismo comportamiento a frecuencias menores a 2.5 Hz, donde se presentó un dominio del módulo G'' sobre el módulo G' . No obstante, al aumento de la frecuencia (> 2.5 Hz) se veía beneficiado el módulo G' . Por su parte, el almidón de 40 min, presentó el mismo patrón lineal de ambos módulos a bajas frecuencias hasta 1 Hz, donde se observó una separación de dichos módulos predominando el módulo G' y unificándose con los de molienda de 20 y 30 min. Por lo tanto, se sugiere que el almidón de molienda de 40 min posee ligera dependencia a mayores frecuencias a 1 Hz.

Este fenómeno presentado concuerda con lo mencionado por Tecante *et al.*, (2001), quienes describen que el patrón característico de un gel está constituido por una red tridimensional que no muestra un flujo en estado estacionario. Lo que significa que al menos los almidones tratados con molienda mecánica a diferentes tiempos a una temperatura de 25 °C tuvieron un comportamiento de carácter viscoso a bajas frecuencias comparándolo con el almidón nativo, el cual conservó su comportamiento elástico a pesar de la temperatura y la frecuencia. Por lo tanto, se infiere que los almidones sometidos al tratamiento físico tienden a formar un gel de carácter viscoso a bajas frecuencias y ligeramente más elástico a altas frecuencias.

En general las modificaciones por tratamientos físicos destruyen o producen cambios en el empaquetamiento de las moléculas de polisacárido de almidón dentro del gránulo y a nivel superficial. Dichos cambios como se ha visto afectan de forma evidente el comportamiento y funcionalidad del almidón, así como algunas propiedades como lo son la formación de geles.

En estudios realizados por Moorthy *et al.*, (2008) quienes estudiaron las propiedades reológicas de plantas del tipo *Areacea* a la que pertenece la malanga, encontraron que el almidón de *Colocasia* exhibió valores bajos para todos los parámetros, resaltando que el comportamiento que mostró fue del tipo elástico en diferentes concentraciones evaluadas, el cual coincide con el comportamiento encontrado en esta investigación. De igual forma Meng *et al.*, (2015) reportaron resultados similares para el almidón de plantas del género *Amorphophallus* y la cual pertenece a la misma familia.

En cuanto a la estructura molecular tanto de amilosa como de amilopectina para los análisis de barridos de deformación y barridos de frecuencia puede influenciar las propiedades reológicas del gel de almidón (Freitas *et al.*, 2004). La amilopectina por su parte de acuerdo con Charles *et al.*, (2005) basados en un análisis de correlación de la propiedad de la estructura de la amilopectina mostró que la proporción de las cadenas unitarias más largas (> 35) se relacionaba positivamente con la resistencia al corte y la independencia a la frecuencia.

Cabe destacar que, a pesar de haber realizado un tratamiento físico de modificación, este tipo de propiedades reológicas como la viscoelasticidad, pueden verse afectadas por factores ambientales. Así lo mencionan Asaoka *et al.* (1992) quienes determinaron que factores ambientales como mes de cosecha, prácticas agronómicas y genética del cultivo influyeron en las propiedades reológicas del almidón de papa dulce.

8.4 Caracterización fisicoquímica del almidón nativo y modificado físicamente

8.4.1 Determinación de amilosa aparente

El contenido de amilosa del almidón varía dependiendo de las fuentes botánicas y es afectado por las condiciones del clima de la región donde se producen. Existen diversas enzimas que están involucradas en la biosíntesis del almidón que pueden ser responsables de la variación del contenido de amilosa y amilopectina.

En la Tabla 4 se muestra el contenido de amilosa del almidón nativo y sus diferentes tiempos de molienda. De acuerdo con el análisis estadístico los diferentes tiempos de molienda no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en comparación con el almidón nativo tanto en el porcentaje de amilosa como en amilopectina. Este resultado es similar a lo reportado por Zhu *et al.* (2015) en almidón de yuca con 14% en contenido de amilosa.

Tabla 4.- Contenido de amilosa (%) del almidón nativo y modificados por molienda mecánica de alta energía.

Muestra	Amilosa (%)	Amilopectina (%)
Almidón nativo.	14.54 ± 0.9 ^a	85.45 ± 0.9 ^a
Molienda 20 min.	14.93 ± 0.6 ^a	85.06 ± 0.6 ^a
Molienda 30 min.	15.30 ± 0.2 ^a	84.70 ± 0.2 ^a
Molienda 40 min.	15.60 ± 0.6 ^a	84.40 ± 0.6 ^a

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

La mayoría de los informes de contenido de amilosa en tubérculos oscila entre el 20 y el 27%. Por otro lado, al someter al almidón nativo a un proceso de molienda mecánica a diferentes tiempos se observó que el contenido de amilosa no mostró diferencias significativas a un valor de significancia ($\alpha=0.05$). Sin embargo, si se logra apreciar que la tendencia del contenido de amilosa es aumentar.

Dicha tendencia podría asociarse a un fenómeno de despolimerización de las cadenas de amilopectina, ya que los cambios en los gránulos de almidón incluyen daños de estos alterando propiedades como morfología, temperatura de gelatinización, contenido de dobles hélices, cristalinidad, perfección cristalina y birrefringencia.

Se ha observado la despolimerización, particularmente de la amilopectina, y es indudablemente un factor de reducción de la viscosidad en el análisis de formación de pasta. Entonces, en términos de daño de gránulos por efecto de la molienda pueden ocurrir pérdidas en el grado de cristalinidad, por lo que cuando se producen suficientes gránulos o fragmentos amorfos, las cadenas de amilopectina en el gránulo de almidón pasan a ser de menor peso molecular y menos complejas.

Por lo tanto, se podría inferir que en el análisis de amilosa aparente se están contabilizando las fracciones producidas a partir de cadenas de amilopectina a causa de una despolimerización.

Un comportamiento contrario se logró observar en el biopolímero de amilopectina, ya que al incrementar el tiempo de molienda el contenido de esta se vio disminuido, indicando así que las zonas cristalinas y amorfas fueron degradadas por efecto de la energía generada durante la molienda mecánica. Dicho comportamiento tiene relación con lo observado en el perfil de formación de pasta, donde se ve una disminución de la viscosidad máxima, así como la disminución de cristalinidad en el difractograma de los almidones modificados por este método. Además, varios autores han reportado que la viscosidad máxima y cristalinidad están influenciadas por las zonas cristalinas de la amilopectina (Rodríguez *et al.*, 2009).

Por lo tanto, esas cadenas o fragmentos de amilopectina liberadas durante la molienda podrían estarse manifestando como amilosa durante la determinación de amilosa aparente. Lo cual a nivel reológico se exhibió al presentar un comportamiento de carácter elástico, contemplando que las cadenas de amilopectina se encontraban dañadas.

En este sentido, la molienda mecánica al generar fracciones de amilopectina de cadena corta o fracciones amorfas, podría favorecer un proceso de encapsulación en tecnologías como el secado por aspersion, ya que al contar con cadenas menos complejas y daño estructural del granulo, permiten una mayor versatilidad de los polímeros al movilizar de forma más rápida las cadenas durante la atomización impactando directamente sobre la eficiencia de encapsulación, permitiendo así una formación de partículas de mejor calidad, asegurando la protección del agente activo.

8.4.2 Difracción de rayos X (DRX)

Este análisis se realizó con la finalidad de determinar las características estructurales (patrón de difracción de rayos X y cristalinidad) del almidón nativo y modificado. En la Figura 12 se muestra el patrón de difracción del almidón nativo, el cual mostro un patrón de difracción del tipo A que se conoce como típico de cereales por la presencia de picos de intensidad en los ángulos de 15, 17, 18 y 23°. Este resultado coincide con lo reportado por Meng *et al.* (2015) en almidón de taro con patrón de difracción de tipo A y un porcentaje de cristalinidad del 25%.

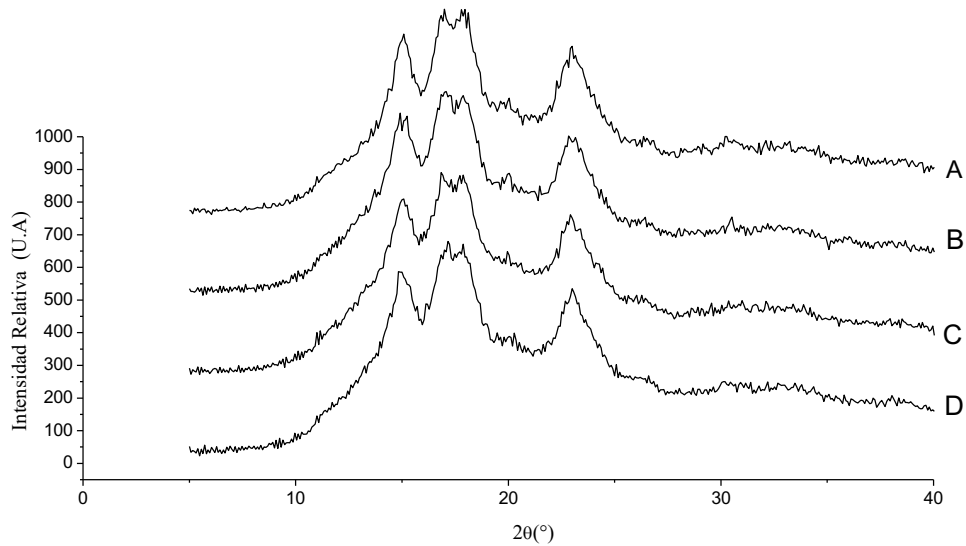


Figura 12.- Patrones de difracción de rayos X del almidón nativo (A) y modificados por molienda mecánica de 20 min. (B), 30 min. (C) y 40 min. (D).

Actualmente se ha aceptado que los almidones de cereales presentan un patrón de difracción del tipo A, los almidones de tubérculos del tipo B y los almidones de ciertas raíces y semillas presentan un patrón del tipo C. Bajo esos términos, considerando que la malanga es un tubérculo, debería presentar un patrón del tipo B. Sin embargo, al ser una fuente de almidón no convencional y al carecer de estudios de caracterización es posible que presente un patrón de difracción del tipo A.

Al mismo tiempo, se ha comprobado que los patrones de difracción además de la fuente botánica están determinados por el ordenamiento de las cadenas de amilopectina y a la cual se le atribuye la estructura cristalina del gránulo de almidón.

Así mismo, se han reportado diversos estudios analizando la estructura cristalina de los gránulos del almidón. Katz *et al.*, (1999) fueron los primeros en realizar estudios de difracción de rayos X en ángulo grande para poder determinar y distinguir los dos principales tipos de patrones de la estructura cristalina de los gránulos de almidón.

De igual forma Perez & Bertof., (2010) reportaron que a nivel molecular la parte lineal externa de las cadenas de amilopectina interactúan entre sí y las moléculas de agua disponibles para la formación de las dobles hélices para formación de la región cristalina. Además, estos cristales están dispuestos de dos maneras muy simples dando lugar a un polimorfismo del patrón de difracción del tipo A y B, mientras que el tipo C es una mezcla de ambos.

Cabe mencionar que la malanga es un tipo de tubérculo presenta dos variedades, la malanga blanca y la morada. De acuerdo con (Rodríguez *et al.*, 2016) existe una diferencia en la composición química encontrada en diferentes cultivos de malanga de la región de la cuenca del pacífico mexicano asociadas a las características medioambientales dónde se encuentra ubicada la zona de cultivo y además, el grado de madurez de este tubérculo lo que a su vez determinara el grado de cristalinidad.

De acuerdo con lo reportado por Rolland *et al.*, (2013) el aumento en el contenido de humedad del almidón puede conducir a la aparición de un patrón de difracción del tipo A y que además la variación en los valores del porcentaje de cristalinidad puede estar ligados a las diferencias en los métodos de cálculo. Mismos que se pueden observar en la tabla 5. Además de acuerdo con el análisis estadístico no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos con respecto al almidón nativo.

Tabla 5.- Porcentaje de cristalinidad del almidón nativo y a sus diferentes tiempos de molienda.

Muestra	Cristalinidad (%)
Almidón nativo	23.2 ± 0.6 ^a
Molienda 20 minutos	24.1 ± 1.3 ^a
Molienda 30 minutos	22.2 ± 1.8 ^a
Molienda 40 minutos	22.3 ± 0.1 ^a

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Por otro lado, la modificación por molienda mecánica usando bolas de nitruro de silicio, los picos de difracción del almidón a 20, 30 y 40 min empezaron a disminuir parcialmente. Se observó que los aumentos del tiempo de molienda indujeron una mayor pérdida de los picos de difracción y se puede asociar a la desorganización de las zonas cristalinas de la amilopectina. Este comportamiento es similar a los datos obtenidos por Lui *et al.* (2011) en el que estudiaron el efecto del tratamiento de molienda en la estructura y porosidad del gránulo de almidón de maíz empleando bolas de nitruro de zirconio. Los patrones de difracción de rayos X para los almidones de maíz mostraron el patrón característico de cereales, el cual corresponde al tipo A. Después del tratamiento de molienda a 1 h lograron disminuir parcialmente la intensidad de los picos. Sin embargo, para las moliendas a 2 y 3 h los picos de difracción casi desaparecieron por lo que asociaron que el tiempo de molienda inducían a una pérdida de la intensidad de los picos asociados a la cristalinidad de los almidones.

De igual forma se puede sugerir que el tratamiento de molienda mecánica indujo a un fenómeno de la disposición espacial de la amilopectina y a la amilosa, lo que provocó la degradación del área cristalina de forma paulatina y la promoción del área amorfa de los gránulos de almidón. Huang *et al.*, (2007) menciona que este fenómeno puede ser el resultado de la transición del estado policristalino a un estado amorfo de forma parcial, ya que los picos de intensidad no se perdieron de forma total.

8.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

Los resultados de calorimetría diferencial de barrido se muestran en la Tabla 6. El almidón nativo no mostró diferencias significativas en cuanto a su temperatura de inicio, pico y final, mismo comportamiento mostraron los tratamientos de 20, 30 y 40 min. Para el almidón nativo se obtuvo una T_o de 76.5°C , T_p de 79.9°C , T_f de 86°C y una entalpia de gelatinización de 12.5 J/g . Datos que son similares a los obtenidos por Wankhede & Sajjan. (1991) en una variedad de *Colocasia esculenta* tailandesa donde obtuvo valores de T_o de 73°C , T_p de 75.5°C y T_p de 80.5°C . Sin embargo, no determina la entalpia de gelatinización. Por otro lado, Agama *et al.*, (2011) para almidón de malanga reportó una T_o de 73.6°C , T_p de 80.6°C , T_f de 87.6 y una entalpia de gelatinización de 10.6 J/g , los cuales son similares a los que se reportan en este trabajo.

Tabla 6.- Calorimetría diferencial de barrido (CDB) del almidón nativo y modificado.

Muestra	Temperatura de inicio (T_o)	Temperatura pico (T_p)	Temperatura final (T_f)	Entalpia ΔH (J/g)
Nativo	76.53 ± 1.80^a	79.76 ± 2.02^a	86.02 ± 0.33^a	12.52 ± 0.09^b
M20	75.32 ± 0.37^a	79.92 ± 0.29^a	84.17 ± 0.80^a	6.034 ± 1.02^a
M30	74.39 ± 0.17^a	79.67 ± 0.07^a	84.12 ± 0.06^a	6.55 ± 0.38^a
M40	74.50 ± 0.02^a	79.60 ± 0.19^a	84.55 ± 0.39^a	7.56 ± 0.01^a

Media \pm error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

No obstante, se sabe que el contenido de amilopectina de las muestras se puede asociar a estas temperaturas altas, debido a un mayor requerimiento de energía para llevar a un punto de gelatinización. De igual forma una T_p elevada está relacionada con un alto grado de ordenamiento lo que le proporciona estabilidad a la estructura del gránulo y en consecuencia lo hace más resistente a este fenómeno.

En cuanto a la entalpia se encontró un valor alto en el almidón nativo (12.52 J/g) que de acuerdo con el análisis estadístico mostró diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en comparación con los tiempos de molienda. No obstante, entre los diferentes tiempos de molienda no presentaron diferencias significativas entre ellos con entalpias de 6.03 y 6.55 J/g presumiendo que las modificaciones fueron a nivel de la amilopectina, afectando el ordenamiento a consecuencia de la molienda mecánica. Por otro lado, en el caso de la molienda de 40 min la entalpia obtuvo un valor de 7.56 J/g, lo que podría sugerir a que por efectos de la molienda se están generando cadenas sencillas que requieren más energía y se ve reflejado en la entalpia de gelatinización.

De acuerdo con Defloor *et al.*, (1998) y Punched *et al.*, (2007) la entalpia de gelatinización también está asociada a una serie de factores como el porcentaje de cristalinidad, enlaces intermoleculares, velocidad de calentamiento de la suspensión del almidón y a la presencia de otros productos químicos. Mismos que coinciden con lo reportado por Asaoka *et al.*, (1991) donde concluye que la genética y los factores ambientales están relacionados estrechamente con la entalpia de gelatinización.

A pesar de que la modificación física mediante molienda mecánica de alta energía logró disminuir la viscosidad a diferentes tiempos y el tamaño de gránulo, por motivos de especificaciones técnicas del equipo de secado por aspersión, así como por futuros análisis de digestión *in vitro* se tomó la decisión de realizar una segunda modificación del tipo química (entrecruzamiento) seleccionado un tratamiento de molienda (30 min) al ser el tiempo intermedio, con la finalidad de conferir mayor resistencia al material de pared reforzando la estructura granular del almidón mediante la adición grupos fosfato y al mismo tiempo mejorar algunas características como la viscosidad, que permitirían la obtención de microcápsulas de buena calidad y características deseables.

8.5 Caracterización del almidón modificado dualmente

8.5.1 Nivel de entrecruzamiento del almidón

Las modificaciones químicas del almidón involucran el uso de reactivos aprobados por organizaciones como la FDA (Food and Drugs Administration) y OMS (Organización Mundial de la Salud). Estas, implican ciertos cambios a nivel estructural y por lo tanto en la funcionalidad. La química involucrada en la modificación es de un modo directo generando reacciones asociadas con los grupos hidroxilo del almidón. La derivación a través de la formación de grupos éster o éter, la oxidación de los grupos hidroxilo o carbonilo o grupos carboxílicos, y la hidrólisis de enlaces glucosídicos son algunos de los principales mecanismos de reacción de este tipo de métodos de modificación (You & This, 2008).

El grado de modificación química es generalmente expresado como nivel de entrecruzamiento o grado de sustitución, cuando el grupo sustituyente como por ejemplo acetato o fosfato reaccionan con los grupos hidroxilo de la unidad D-glucopiranosilo. Para el caso de muestras significativas de almidón, las modificaciones químicas se pueden realizar mediante reacciones de entrecruzamiento o sustitución por separado o en combinación (Hazarika & Sit, 2016).

En la Tabla 7 se muestran el nivel de entrecruzamiento, para la primera muestra de almidón entrecruzado se obtiene el mayor nivel de entrecruzamiento con un 98.5%, seguido del almidón tratado previamente con molienda mecánica a un tiempo de 30 min de igual modo la mezcla utilizada de trimetafosfato, tripolifosfato y fosfato de sodio resultó ser una mezcla entrecruzante altamente efectiva. De acuerdo con You & This, (2008) la técnica de entrecruzamiento empleando un reactivo químico como el trimetafosfato o la mezcla de algunos hace que estos sean capaces de reaccionar con dos o más grupos hidroxilos diferentes de la unidad glucosídica del almidón, generando así enlaces cruzados unidos de forma covalente y actuando como una especie de soldadura reforzando la estructura granular.

En el caso de los resultados obtenidos el almidón tratado con molienda mecánica de alta energía obtuvo una menor cantidad de almidón entrecruzado que podría estar asociado al daño estructural de las cadenas tanto de amilosa como de amilopectina, mientras que para el almidón nativo al no estar afectado por efecto del método físico pudiera estar con una mayor estabilidad de sus grupos hidroxilo y reacción química.

Tabla 7.- Nivel de entrecruzamiento (%) del almidón nativo y molienda de 30 minutos.

Muestra	Nivel de entrecruzamiento (%)
Almidón nativo entrecruzado	98.5
Molienda de 30 min entrecruzado.	96.5

El alto nivel de entrecruzamiento puede ser corroborado con los cambios obtenidos en las propiedades fisicoquímicas del almidón, específicamente con el perfil de viscosidad, donde se logró disminuirla significativamente en el almidón nativo y modificado por molienda en comparación con el almidón sin modificar.

Por otro lado, se sabe que las modificaciones como el entrecruzamiento pueden regular el hinchamiento del gránulo del almidón y, además, producir una mayor tolerancia a procesos térmicos altos, corte de cizallamiento y estabilidad a condiciones de pH ácido. De esta manera, de acuerdo con Chatakanonda *et al.*, (2000) quienes modificaron almidón de arroz mediante condiciones de pH, tiempo y mezcla de reacción similares a este estudio, obteniendo un nivel de entrecruzamiento del 29%, ellos concluyeron que no representaba un cambio significativo. Sin embargo, mostro una mayor tolerancia a la temperatura y menor viscosidad. Además, menciona que las concentraciones tanto de almidón como de los reactivos de la mezcla pueden estar relacionados en su eficiencia de entrecruzamiento en función del tiempo, temperatura y fuente del almidón empleados ya que se sabe que en el caso de las reacciones con fosfatos requieren un mayor tiempo de preparación por la naturaleza del reactivo.

En este sentido Aparicio *et al.*, (2008) mediante una mezcla reacción similar logra obtener un nivel de entrecruzamiento del 94% para el almidón de plátano con un tratamiento durante 3 h a 50°C en agitación constante, finalmente concluye que la introducción de grupos fosfato dentro de la estructura del gránulo de almidón lo hacen menos susceptible a hidrólisis por α -amilasa asociada a la reacción de entrecruzamiento y el cual coincide con el nivel de entrecruzamiento obtenido en esta investigación.

Entre los productos químicos aprobados y utilizados para el entrecruzamiento del almidón son el oxiclورو de fosforo, trimetafosfato de sodio y mezclas de anhídrido atípico o acético. Para la suspensión alcalina se usa un pH de entre 7.5 y 12 con una temperatura de reacción de entre 25- 50°C y los tiempos pueden variar de entre 30 min hasta 24 h y estará relacionado con el porcentaje de entrecruzamiento obtenido. Para las condiciones empleadas en nuestra modificación fue utilizada una mezcla de reactivos de trimetafosfato, tripolifosfato y sulfato de sodio a un pH de 11.5 con una duración de la reacción de 3 horas en agitación constate.

8.5.2 Perfil de formación de pasta

El perfil de formación de pasta del almidón entrecruzado se muestra en la Figura 13. La viscosidad se vio afectada significativamente tanto para el almidón nativo como para la molienda de 30 min. En el caso del almidón nativo disminuyó de 2.7 Pa. s a 0.04 Pa. s y el almidón de molienda a 30 min a 0.08 Pa. s, en donde además este tratamiento afectó tanto a la amilosa como a la amilopectina y que posiblemente el tratamiento previo de molienda pudiera ayudar a generar más grupos funcionales disponibles generados por la despolimerización de los componentes de almidón durante la molienda mecánica.

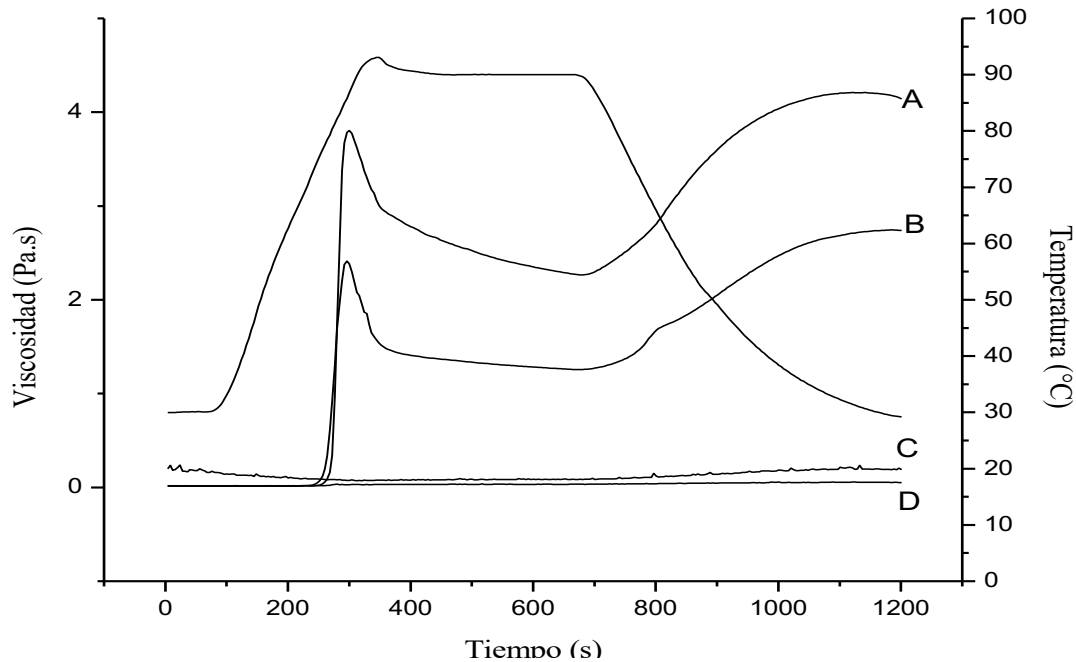


Figura 13.- Perfil de formación de pasta (5% p/v) del almidón nativo (A), molienda de 30 min (B), entrecruzado nativo (C) y modificación dual (D).

Este comportamiento de tendencia a disminuir la viscosidad es normal en almidones entrecruzados, inclusive es también denominado almidón inhibido, basado en que durante el proceso de cocción a 90°C la estructura granular se encuentra reforzada por la formación de enlaces cruzados entre grupos fosfato con los grupos hidroxilo disponibles en la amilosa y amilopectina del gránulo.

De esta manera se genera un almidón menos propenso a descomposición con tiempos de cocción prolongados, del mismo modo, mayor estabilidad a condiciones ácidas y de cizallamiento (Chen *et al.* 2018).

De acuerdo con Li *et al.*, (2017) una modificación dual, primeramente, con molino de bolas y un tratamiento posterior de tipo químico con anhídrido octenil succínico, observaron que en el caso del tratamiento con molino de bolas había un cambio en la estructura y morfología del almidón que por consecuencia había un cambio en las propiedades fisicoquímicas del almidón como la hinchazón, la actividad emulsificante.

Además, con el tratamiento químico de entrecruzamiento del almidón tratado previamente con molino de bolas, el almidón mostró nuevas características tales como viscosidad y rigidez reducida, pero con una mayor estabilidad de las pastas que aumenta durante el corte, calentamiento y enfriamiento en comparación con sus homólogos nativos. En este caso, ese comportamiento fue similar al obtenido para el almidón nativo y molienda de 30 min con sus respectivos entrecruzados. De igual forma es importante mencionar que el entrecruzamiento como tal puede tener un efecto significativo en el perfil de viscosidad y que normalmente un almidón tratado por este método muestra un perfil de viscosidad estable a lo largo del tiempo.

Por otro lado, los métodos físicos de modificación pueden regular simplemente modificando los tiempos de molienda y el material del tazón que se ocupa lo que podría beneficiar en un segundo tratamiento como en el caso de los métodos químicos.

En un estudio realizado por Lui *et al.*, (2017) observaron una disminución de la viscosidad muy similar a los resultados obtenidos en este trabajo, en su caso el almidón de arroz fue sometido a molienda mecánica de alta energía usando bolas de nitruro de zirconio y posteriormente un tratamiento con OSA, en donde concluyeron que el nivel de entrecruzamiento era alto debido a los fuertes enlaces que logró generar con las cadenas degradadas tanto de amilosa como de amilopectina y que se veía reflejada en las propiedades adquiridas como la buena resistencia térmica, solubilidad y la disminución de la retrogradación.

8.5.3 Determinación de amilosa aparente

El contenido de amilosa se muestra en la Tabla 8, el cual fue determinado para las muestras de almidón nativo y el de molienda de 30 min, así como sus respectivos entrecruzamientos. Para el almidón nativo se obtuvo un 14.54% en contenido de amilosa, mientras que para la molienda de 30 minutos se vio un incremento obteniendo un 15.30%. resultados que se pueden corroborar en la determinación de amilosa del almidón modificado por molienda mecánica.

De acuerdo con el análisis estadístico el almidón nativo y la molienda de 30 min no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos. Pero si entre sus homólogos entrecruzados tanto en por porcentaje de amilosa como de amilopectina.

Tabla 8.- Contenido de amilosa aparente (%) del almidón nativo, molienda 30 min y sus respectivas modificaciones químicas.

Muestra	Amilosa (%)	Amilopectina (%)
Almidón nativo.	14.54 ± 0.9 ^a	85.45 ± 0.9 ^a
Molienda 30 min.	15.30 ± 0.2 ^a	84.70 ± 0.2 ^a
Nativo/Entrecruzado.	11.53 ± 0.1 ^b	88.47 ± 0.1 ^b
M30/ Entrecruzado.	9.26 ± 0.1 ^c	90.73 ± 0.1 ^c

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

No obstante, para sus variedades entrecruzadas estos niveles en el contenido de amilosa se ven disminuido tanto para el almidón nativo entrecruzado llegando a un 11.53% así como para la molienda de 30 min con el porcentaje más bajo en contenido de amilosa del 9.26%. Este comportamiento es debido a que durante la modificación química los grupos hidroxilo del almidón están generando enlaces covalentes con los grupos fosfatos, los cuales impiden que la amilosa tome su conformación helicoidal, inhibiendo la formación del complejo entre la amilosa y el yodo. Por lo tanto, al estar generando enlaces covalentes con la amilosa, se puede suponer la misma formación de enlaces con la amilopectina y corroborando así el grado de entrecruzamiento al encontrarse reforzada la estructura granular mediante enlaces cruzados.

Cabe mencionar que la amilosa es considerada un constituyente del almidón que está involucrado en el cambio de temperaturas de gelatinización, así como en el cambio de la textura, viscosidad y color de los almidones de acuerdo con su contenido de amilosa. Para ello, Juliano, (1993) propone una clasificación por tipos de acuerdo con su contenido de amilosa, proponiendo el tipo normal con un contenido de amilosa del 15-35%, almidón ceroso o waxy mayor al 15% y alto en amilosa a aquellos con un contenido mayor al 35%. Por lo tanto, en el caso del almidón nativo, así como el entrecruzado, molienda de 30 min y su variedad entrecruzada basados con esta clasificación se podrían considerar bajos en amilosa.

8.5.4 Difracción de rayos X (DRX)

Se realizaron las medidas de difracción de rayos X con la finalidad de observar si la modificación química por entrecruzamiento tenía algún efecto sobre la cristalinidad del almidón nativo entrecruzado y el almidón de molienda de 30 min, comparándolos con los difractogramas previamente realizados. En la Figura 14 se muestra el patrón de difracción para las muestras de almidón nativo (A), molienda de 30 min (B), nativo entrecruzado (C) y modificación dual (D).

Para los 4 tipos se muestra un patrón de difracción del tipo A debido a sus picos de intensidad característicos en 15, 17 18 y 23° evidenciando la estructura parcialmente cristalina asociada al contenido de amilopectina.

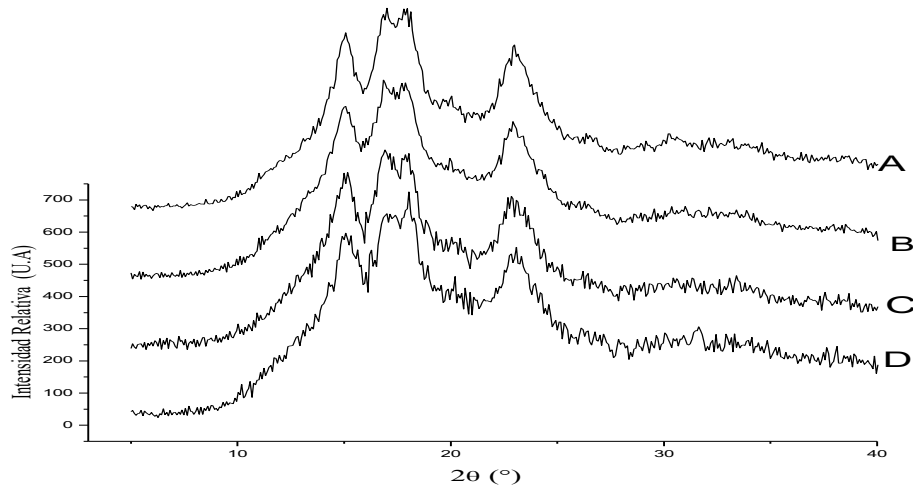


Figura 14.- Patrón de difracción del almidón nativo (A), molienda 30 min(B), nativo entrecruzado (C) y modificación dual (D).

En el almidón nativo (A) se observó el mismo patrón de difracción obtenido anteriormente con los picos máximos de intensidad relativa. Posteriormente para el patrón de difracción del almidón nativo entrecruzado (C) se obtiene un patrón muy similar tanto en la presencia de los mismos picos como en intensidad relativa. Esta similitud podría indicar que el tratamiento químico empleando trimetafosfato, tripolifosfato y sulfato de sodio no está afectado aparentemente las regiones cristalinas del gránulo de almidón, a excepción del pico de intensidad de 23° del almidón nativo entrecruzado que muestra una ligera disminución en la intensidad relativa y que podría indicar un menor grado de cristalinidad o bien, una menor calidad de los cristales, que posiblemente pudieron ser afectados por factores dependientes de la modificación química como la temperatura.

Por otro lado, la molienda mecánica de 30 min (B) se puede apreciar la disminución en los picos máximos de intensidad generados por el tratamiento físico con molino de bolas. Sugiriendo cambios estructurales en la amilopectina durante la colisión de las bolas en el proceso de molienda. Para la modificación dual (D) se observó una disminución significativa del pico de intensidad correspondiente a los 15° y un aumento en el que corresponde a los 17° en comparación con el almidón tratado solamente por molienda mecánica.

Independientemente del tratamiento con molienda mecánica, el almidón tratado solo por método químico (C) presentó una ligera supresión de los picos máximos de intensidad relativa en comparación con los que se encuentran presentes en el difractograma del almidón nativo (A). Sin embargo, a pesar de emplear una modificación dual, al seguir apreciando los picos de intensidad relativa del almidón nativo confirmaron la existencia de un equilibrio en estas modificaciones.

Un comportamiento similar fue observado por Li *et al.*, (2007) al realizar en primera instancia un tratamiento con molienda mecánica de alta energía con bolas de nitruro de zirconio y un segundo tratamiento adicionando anhídrido octenil succínico (OSA) como agente entrecruzante. Observó que a mayor tiempo de molienda mayor era la pérdida de los picos de intensidad que está relacionada con la degradación paulatina de morfología del gránulo y por ende en la reducción de la cristalinidad.

El conocimiento del patrón de difracción además de ser una herramienta clave para la clasificación de acuerdo con la fuente botánica y del grado de cristalinidad, es importante ya que proporciona información del grado de ordenamiento de las dobles hélices de la amilopectina (Yoo & Jane., 2002). El aumento o disminución en la cristalinidad de los almidones modificados por métodos químicos principalmente hidrólisis ácida puede estar asociada a tiempos más largos de reacción lo que podría llevar a perder en primera instancia las zonas amorfas y por consiguiente una afectación en la amilopectina (Xia *et al.*, 2012).

Para el caso del entrecruzamiento una de las soluciones que se empleó para la neutralización de la mezcla fue ácido clorhídrico 1.0 M y que a pesar de que el tiempo de exposición con el ácido es relativamente corto, este podría haber impactado en la disminución o aumento de la cristalinidad. Aunado a la influencia de otros factores relacionados con las condiciones de reacción. De acuerdo con Singh *et al.* (2016) los efectos de diferentes condiciones de reacción como la concentración del almidón tratado, temperatura, pH de los reactivos y la concentración de sal catalítica juegan un papel importante durante la preparación de almidón de doble modificación, lo que puede apoyar lo obtenido en este trabajo.

8.5.5 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

Se realizó el análisis de calorimetría diferencial de barrido (CDB) con la finalidad de observar si se presentaron cambios en las propiedades térmicas del almidón nativo, molienda de 30 min y sus homólogos modificados por entrecruzamiento. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9. De acuerdo con el análisis estadístico el almidón nativo, su homólogo entrecruzado y la molienda 30 min entrecruzada no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas, pero si en comparación con la molienda de 30 min obteniendo los menores valores en las temperaturas de transición de fase y entalpía.

Tabla 9.- Calorimetría diferencial de barrido (CDB) del almidón nativo y M30, así como sus correspondientes entrecruzados.

Muestra	Temperatura de inicio (T_0)	Temperatura pico (T_p)	Temperatura final (T_f)	Entalpía ΔH (J/G)
NATIVO	76.53 ± 1.8^a	79.76 ± 2.02^a	86.02 ± 0.33^a	12.52 ± 0.09^a
M30	74.39 ± 0.17^b	79.67 ± 0.07^b	84.12 ± 0.06^b	6.55 ± 0.38^b
NATIVO EC	77.35 ± 0.56^a	80.84 ± 0.01^a	85.21 ± 0.62^a	11.61 ± 0.31^a
M30 EC	75.98 ± 0.29^a	81.34 ± 0.02^a	86.55 ± 0.87^a	7.86 ± 0.29^a

Media \pm error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Como puede apreciarse el almidón nativo mostró diferencias significativas en comparación con el almidón entrecruzado y la modificación dual con respecto a la temperatura de inicio (T^0) y a la entalpía de gelatinización (ΔH). La presentación de este comportamiento está estrechamente relacionada con el grado de entrecruzamiento obtenido. Al encontrarse reforzada la estructura granular los requerimientos de calor y energía pueden verse aumentados para llevar a cabo la gelatinización (Chet *et al.* 2018).

En términos específicos, la molienda mecánica de 30 min se obtuvo la menor entalpia de gelatinización (ΔH) con 6.55 J/g, indicando una menor cantidad de energía para llevar a cabo la gelatinización y que podría estar asociada al daño generando durante la molienda mecánica.

Mismo comportamiento fue presentado para el almidón modificado dual con un valor de 7.86 J/g, este valor relacionado a posiblemente la amilopectina de estos almidones este perdiendo orden molecular que estaría coligado a una menor cantidad de dobles hélices en la cadena, así como menor calidad o cantidad de cristales requiriendo menor cantidad de energía para desorganizarse. Cooke & Gidley., (1992) reportaron que a una menor entalpia de gelatinización conlleva una menor cantidad en el contenido de dobles hélices de la amilopectina relacionado con la disociación de estas.

En cuanto a la temperatura pico (T_p) las variedades entrecruzadas fueron las que obtuvieron las temperaturas más altas, la molienda mecánica de 30 min entrecruzada con 81.55°C, seguida del almidón nativo entrecruzado con 80.84°C.

Es importante mencionar que uno de los datos que se toma en cuenta en el análisis por calorimetría diferencial de barrido es la temperatura pico (T_p). De acuerdo con Chen *et al.*, (2018) demostró que las modificaciones químicas como el entrecruzamiento afectan principalmente las temperaturas de transición térmica ($T^o - T_p$) y la entalpia de gelatinización. Por lo tanto, en este estudio el aumento en la temperatura pico y gelatinización (T_p) se vería asociada a la formación de nuevos enlaces covalentes que se encuentran reforzando la estructura granular y en consecuencia un mayor requerimiento de energía y calor para romperlos. Esto puede ser corroborado con los datos obtenidos en el perfil de formación de pasta en el cual se muestra para las variedades entrecruzadas una viscosidad baja al inhibir el hinchamiento de los gránulos al estar enlazados fuertemente las cadenas tanto de amilosa como de amilopectina con los grupos fosfato evitando el ingreso del agua al interior del gránulo de almidón.

Este mismo comportamiento fue observado por Li *et al.*, (2017) quienes reportaron en el que almidón de arroz modificado dualmente bajo condiciones de alta temperatura este mostró una mayor estabilidad, así como una disminución de la viscosidad y retrogradación. Por su parte Chatakanonda *et al.*, (2000) observaron que a mayor concentración del agente entrecruzante mayor era la temperatura pico (T_p) para almidón de arroz en el cual obtuvo una temperatura de 79.5°C a la mayor concentración y la cual es cercana a las obtenidas en este trabajo usando la misma mezcla de agentes entrecruzantes.

Existen reportes asociando alteraciones en las temperaturas de transición térmica a factores medioambientales en cultivos de *Colocasia esculenta* con variabilidad en genotipo, relación almidón-agua y grado de madurez. Perez *et al.*, (2007) reportó una temperatura de inicio de 77.2°C, temperatura pico (T_p) de 83.2°C, temperatura final (T_f) de 89.7°C y una entalpia de gelatinización de 16.7 J/g. Por su parte Jane *et al.*, (1992) reportó los valores más bajos con una temperatura de inicio (T_o) de 66.4°C, temperatura pico (T_p) de 72.4°C, temperatura final (T_f) de 82°C y entalpia de gelatinización de 12.1 J/g. Siendo similares a los obtenidos en este trabajo.

Finalmente, el fenómeno de la gelatinización se puede considerar que es controlada, en parte, por la estructura molecular de la amilopectina la cual a su manera representa la perfección, orden de los cristales, longitud de las cadenas, grado de ramificación y peso molecular. Además de considerar la composición del almidón, en el que influye la relación amilosa- amilopectina y por último la estructura interna del granulo de almidón en la que está involucrada a relación de región amorfa-región cristalina (Tester *et al.*, 1997).

8.6 Encapsulación del extracto de pulpa de café mediante secado por aspersión utilizando almidón modificado de malanga

Previo al proceso de secado por aspersión uno de los factores determinantes del producto obtenido es la selección del material de pared. Es importante debido al comportamiento que suelen tener en los diferentes procesos, en este caso, el secado por aspersión. Para dicho proceso los materiales de pared fueron evaluados 4 diferentes tipos de almidón; el almidón nativo de malanga (AN), almidón entrecruzado (AN/EC), almidón de molienda por 30 min (M30) y almidón de molienda por 30 min/ entrecruzado (M30/EC). Así como un testigo conocido por su capacidad filmógena en el secador por aspersión que fue maltodextrina (MD). La finalidad de utilizar 4 variedades de almidón fue para poder analizar el comportamiento de cada uno de ellos desde su forma nativa, así como con diferentes modificaciones tanto físicas como químicas y en su caso una modificación dual.

Este tipo de modificaciones de acuerdo con diversos autores pueden afectar la estructura de los gránulos de almidón y que a su vez modificar sus características funcionales impactando directamente sobre la calidad y ciertas características de los productos sometidos al secador por aspersión que pudieran ser benéficas o no al emplearse como material de pared.

Para el caso del almidón nativo (AN) ya existen reportes que mencionan cierta capacidad de la formación de aglomerados con posibles aplicaciones como agente encapsulante. No obstante, la decisión del uso de una modificación física como el molino de bolas fue basada en la obtención de un almidón modificado sin la necesidad de usar ácidos o enzimas, con la finalidad de obtener un proceso de bajo costo. Además, de alguna manera contribuir al desarrollo de materiales de pared a partir de fuentes no convencionales como la malanga aplicando tecnologías renovables o también llamadas tecnologías verdes.

Por otro lado, la realización de una segunda modificación surge por la necesidad de disminuir aún más la viscosidad del almidón, esto asociado a posibles efectos negativos durante la etapa de atomización de la muestra. Aunado a la necesidad de obtener un almidón con la capacidad de resistir a condiciones de digestión de un rumiante.

Finalmente, se empleó maltodextrina como testigo de material de pared bajo las mismas condiciones, se ha reportado con anterioridad el uso y el buen comportamiento que tiene como agente encapsulante.

8.6.1 Secado por aspersión y rendimiento del proceso

El término de secado por aspersión hace referencia a la eliminación de agua o humedad de un líquido, emulsión o suspensión. El secado por aspersión es una operación continua que produce polvos secos a partir de un líquido y es considerada una de las técnicas más utilizadas en la microencapsulación en diferentes industrias, donde se pueden utilizar numerosos materiales como agentes encapsulantes que a su vez determinan el rendimiento dependiendo su naturaleza, así como sus propiedades funcionales y su comportamiento asociado con el método de encapsulación.

El rendimiento de secado se puede reflejar como el porcentaje de microcápsulas obtenidas con respecto a la cantidad total de sólidos secos de la mezcla de alimentación (extracto + material de pared). En la Tabla 10 se muestra el rendimiento (%) de secado utilizando como materiales de pared maltodextrina (MD), almidón nativo (AN), almidón nativo entrecruzado (ANEC), molienda por 30 min (M30) y molienda 30 min/entrecruzada (M30/EC). Se puede observar de forma general que el rendimiento (%) osciló entre el 49 y 60 %. Sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los materiales de pared utilizados. De acuerdo con Ferrar *et al.*, (2012) un buen rendimiento está considerado a partir del 50% y a su vez considerado eficiente cuando el producto de salida es igual o cercano al producto de inicio determinado a partir de un balance de material sólido.

Tabla 10.- Rendimiento de secado de los materiales de pared utilizados.

Muestra	Rendimiento (%)
MD	61.4 ± 2.33 ^a
AN	56.1 ± 0.21 ^a
AN/EC	53.4 ± 3.18 ^a
M30	52.5 ± 1.20 ^a
M30/EC	49 ± 0.63 ^a

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Para el caso de MD, se obtuvo el mayor rendimiento con el 61% de producto recuperado. De igual forma se puede observar una tendencia de disminución para los almidones que fueron modificados en comparación con el almidón nativo. Posteriormente para su variedad modificada químicamente por entrecruzamiento se obtuvo el 53.3 %.

En el caso del almidón modificado físicamente con molino de bolas (M30) obtuvo el 52.5% de rendimiento y finalmente la modificación dual (M30EC) con 49% fue el material de pared con el menor rendimiento de secado. El rendimiento de secado en este último almidón puede estar relacionado con las características térmicas que posee al haberse sometido al entrecruzamiento. Dicho de otra forma, las moléculas al encontrarse reforzadas se ven limitadas con respecto al movimiento y flexibilidad. Además, durante la preparación de la mezcla se observó una tendencia a sedimentar, por lo que la atomización pudo verse restringida. En este sentido, Labuschagne *et al.* (2018) reportó que algunas características como temperatura de transición vítrea, termoplasticidad y presencia de otros compuestos puede generar un bajo rendimiento en el proceso de secado.

La maltodextrina especialmente al cumplir el papel de testigo el porcentaje de rendimiento fue aproximadamente lo esperado y reportado por diversos autores. Para el caso de los almidones como se menciona arriba, se pudo observar una reducción del rendimiento al emplear tanto una modificación ya sea física o química, así como para el caso de la modificación dual. No obstante, de acuerdo con el análisis estadístico no se observan diferencias significativas entre los tratamientos.

Es importante considerar los análisis que se presentaran más adelante, ya que de acuerdo con algunos investigadores mencionan que existen diversos factores que pueden afectar el rendimiento de los productos obtenidos mediante secado por aspersión, como pueden ser las condiciones de funcionamiento del equipo como la inevitable deposición a la pared de la cámara de secado y a la baja eficiencia de separación en el ciclón de recuperación (Ersus & Yurdagel, 2007), el tipo de material de soporte utilizado (Couto *et al.*, 2011) y la relación material de pared: núcleo (Frascareli *et al.*, 2012; Hogan *et al.*, 2001).

Otro de los factores asociadas a los bajos rendimientos en el secado por aspersión, son los asociados a las características del material de pared como peso molecular, temperatura de transición vítrea, higroscopicidad, contenido de agua y presencia de otros componentes con la etapa de atomización. La atomización por su parte es una de las etapas más importantes durante el proceso de secado ya que el material de pared debe cumplir ciertas características de tal forma que al llevarse a cabo una buena atomización se obtiene una mayor superficie de contacto de las gotas atomizadas facilitando la transferencia de calor del aire caliente a las partículas, seguida de la rápida evaporación del agua. De no ser así las propiedades de la mezcla de alimentación no serán las óptimas y puede afectar las condiciones operativas obteniendo así un bajo rendimiento del producto final.

8.7 Caracterización de las microcápsulas

8.7.1 Humedad (%) y actividad de agua (a_w)

En tecnologías como el secado por aspersión una de las técnicas de análisis más empleada es el análisis termodinámico, ya que durante el procesamiento y en periodos de almacén existen cambios físicos, químicos y morfológicos particularmente influenciados por la humedad, actividad de agua y la temperatura de almacenamiento (Martinelli *et al.*, 2007). Este análisis se ha empleado para así poder comprender el comportamiento y la estructura del agua en la superficie y en el interior del producto.

En la Tabla 11 se muestra el contenido de humedad (%) y actividad de agua (a_w) de los microencapsulados del extracto de pulpa de café. Los resultados muestran que el contenido de humedad más alto fue para los microencapsulados utilizando maltodextrina con el 1.025% de humedad, el almidón nativo (AN) 0.517%, almidón entrecruzado (AN/EC) 0.451%, molienda por 30 min (M30) 0.512% y molienda por 30 min/entrecruzado (M30/EC) 0.244%.

Tabla 11.- Contenido de humedad (%) y actividad de agua (a_w) de los microencapsulados de extracto hidroalcohólico de pulpa de café usando diferentes materiales de pared.

Muestra	Humedad (%)	a_w
MD	1.025 ± 0.4 ^a	0.243 ± 0.001 ^a
AN	0.517 ± 0.3 ^a	0.185 ± 0.006 ^b
AN/EC	0.451 ± 0.3 ^a	0.218 ± 0.002 ^{ab}
M30	0.512 ± 0.6 ^a	0.183 ± 0.008 ^b
M30/EC	0.224 ± 0.1 ^a	0.195 ± 0.029 ^{ab}

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Estos valores obtenidos con respecto a contenido de humedad y actividad de agua principalmente para MD podrían estar asociado a imperfecciones en la morfología, así como colapso de las cápsulas generadas, interfiriendo en la difusión del agua durante el secado. Sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante, su comportamiento asociado a la actividad de agua (a_w) es diferente para los productos obtenidos.

Para el caso de maltodextrina fue el material con el que se obtuvo una mayor actividad de agua (0.243) y que tiene relación con el contenido de humedad, el almidón nativo y la molienda por 30 min fueron los materiales con el menor contenido de actividad de agua con 0.185 y 0.183 respectivamente. Por otro lado, de acuerdo con el análisis estadístico las variedades de almidón entrecruzado tanto AN/EC y M30EC fueron similares al material testigo que fue maltodextrina con valores del 0.218 y 0.194 respectivamente. Cabe destacar que de acuerdo con los valores de actividad de agua (a_w) de M30 con respecto a MD muestran diferencia significativa ($p < 0.05$), esto generado por posibles defectos, así como una mala interacción durante la formación de la cápsula formada con MD dejando así moléculas de agua libre. No obstante, M30 podría haber utilizado las moléculas de agua libre ejerciendo un efecto plastificante sobre el almidón disminuyendo así el contenido de humedad y actividad de agua.

De acuerdo con Li *et al.* (2018) el agua tiene un conocido efecto plastificante sobre polímeros como el almidón durante procesos como el secado por aspersión impactando sobre los valores en contenido de humedad y actividad de agua.

Para el caso de los encapsulados obtenidos con maltodextrina los valores de humedad y actividad de agua se encuentran entre los valores permitidos para este material. Estos oligosacáridos son productos obtenidos a partir de la hidrólisis del almidón y su comportamiento estará asociado al grado de dextrosa equivalente (DE), variar entre esos grados de dextrosa pueden impactar en las características del producto obtenido, ya que cuanto mayor sea la DE, menor será la viscosidad y mayor será la concentración que pueda disolverse durante el secado.

También se tiene conocimiento de que los grados más altos de DE (Dextrosa Equivalente) tienden a ser más higroscópicos por esta razón presenta los valores más altos de humedad y actividad de agua del producto (MacCrae *et al.*, 2009) . Por lo tanto, de acuerdo con los datos obtenidos para la maltodextrina utilizada se puede verificar este comportamiento de la relación de humedad y actividad de agua considerando así que las microcápsulas de extracto de café con maltodextrina son más higroscópicas. Para las microcápsulas obtenidas con las variedades del almidón entrecruzado tanto AN/EC como M30/EC de acuerdo con los análisis estadísticos estos fueron iguales, por lo que se puede sugerir que tienen el mismo comportamiento de higroscopicidad.

Como se había mencionado anteriormente, uno de los factores que influye en las características del producto final son las características propias de cada uno de los materiales de pared, una de esas características es la humedad y la actividad de agua. Para estos tres materiales el comportamiento en el contenido de humedad y actividad de agua fue muy similar al obtenido ya en las microcápsulas, por ende, estas características del material de pared están influyendo notablemente en el producto manifestándose en su conducta higroscópica que corresponde al ser los materiales de pared con la humedad y actividad de agua más baja considerando que son los materiales de almidón entrecruzado.

Con referencia al fenómeno de baja humedad relativa corresponde a este método de modificación, ya que los gránulos de almidón al estar formando enlaces con los grupos fosfato evitan posibles interacciones de agua en la región de la monocapa, por lo tanto, es comprensible que contenido de humedad y actividad de agua se vean reducidos.

Finalmente, para las microcápsulas obtenidas utilizando AN y M30 fueron estadísticamente iguales. Estos valores de actividad de agua mostraron un comportamiento asociado a su contenido de humedad del material de pared, ya que fueron los materiales con mayor contenido de humedad, siendo así que al ser materiales más húmedos y después de ser procesados muestran un comportamiento menos higroscópico favoreciendo de alguna manera la estabilidad en el medio.

Es importante mencionar que a medida que la actividad de agua aumente existe una proporción cada vez mayor de que el agua libre propicie procesos que afecten los encapsulados. Estos favorecen la difusión de oxígeno (Moraes *et al.*, 2013; Pitalua *et al.*, 2010 y Hubinger *et al.*, 2010), hidrólisis de fitoquímicos (Laine *et al.*, 2008) o solubilización de compuestos deteriorantes (García *et al.*, 2011), todos los cuales puedan facilitar la degradación del núcleo. No obstante, los valores de actividad de agua menores a 0.6 se consideran microbiológicamente estables para productos secos, que a su vez los valores de actividad de agua impactaran en ciertas características y comportamiento del producto, por ejemplo, afectando propiedades como agrupación y aglutinación de productos en polvo o granulados (Gabas *et al.*, 2005).

De forma particular la actividad de agua ha sido ampliamente considerada como uno de los parámetros de calidad importantes en la industria, especialmente en términos de almacenamiento a tiempos prolongados. Por lo tanto, la determinación de estos debe considerarse fundamentales en productos de este tipo.

8.7.2 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

En la Figura 15 se muestran las micrográficas de los microencapsulados del extracto de pulpa de café empleando distintos materiales de pared mediante secado por aspersión para donde se realizó la evaluación morfológica , así como la integridad de las cápsulas. Para maltodextrina (A) que fue el testigo, se pudo observar la presencia de estructuras esféricas con bordes en la superficie dando un aspecto fundido e irregular, esto debido a la rápida evaporación del agua durante su residencia en la cámara de secado. También se pudo observar que existe una ligera variabilidad en tamaños. La formación de este tipo de estructuras es similar a las obtenidas de acuerdo con lo reportado por Castro *et al.*, (2015) donde las microcápsulas obtenidas presentaron una mayor superficie aparentemente colapsada en función del volumen asociado a lo perdido por la evaporación del agua. Esta característica peculiar de maltodextrina depende principalmente de las superficies secadas a baja velocidad, según lo determinan las bajas temperaturas de operación (Tonon *et al.*, 2008). Un aumento en la velocidad de la fuerza motriz permite la eliminación rápida de las moléculas de agua, lo que lleva a una reducción en el daño de la superficie de las microcápsulas (León *et al.*, 2010).

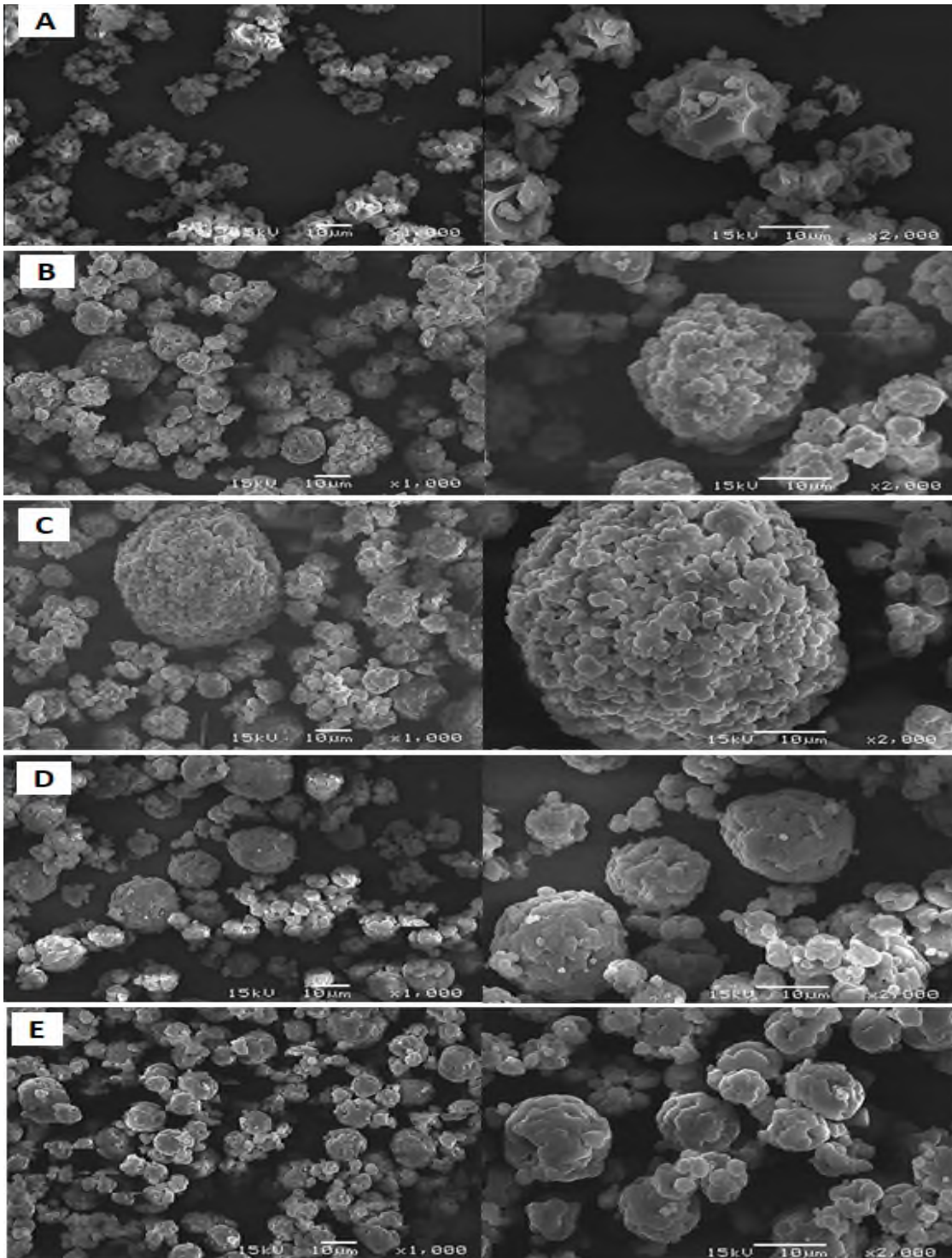


Figura 15.- Micrografías de microencapsulados (1000 y 2000X) obtenidos en secado por aspersión, usando maltodextrina (A), almidón nativo (B), nativo entrecruzado (NA/EC), molienda por 30 min (M30) y molienda por 30 min/ entrecruzado (M30/EC).

De la misma forma, la presencia de arrugas en la superficie de las microcápsulas son un comportamiento que Tonon *et al.*, (2008) reportaron anteriormente y describieron que cuando la temperatura de entrada era baja, la mayoría de las microcápsulas mostraban una superficie arrugada, mientras que al aumento de las temperaturas de secado daba como resultado un mayor número de partículas con una superficie lisa. De acuerdo con Alamilla *et al.*, (2005), las diferencias morfológicas entre los polvos obtenidos usando maltodextrina a diferentes temperaturas también pueden surgir de las características físicas de la corteza, que pueden ser flexibles y colapsadas cuando se usan temperaturas bajas o intermedias, pero también consiguen ser rígidas y porosas cuando se usan temperaturas altas.

En el caso del almidón nativo (B), nativo entrecruzado (C), molienda por 30 min (D) y molienda 30 min entrecruzado (E) coincidieron en presentar estructuras de forma esférica y variedad de tamaños. Sin embargo, difieren en algunas características morfológicas que pudieran no ser benéficas en el producto.

Para las microcápsulas preparadas con almidón nativo además de su forma esférica, presentó una superficie irregular adentrada donde al mismo tiempo se pueden apreciar los gránulos del almidón formando una especie de aglomerados. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gonzalez *et al.*, (2011) quienes obtuvieron agregados esféricos a partir de almidón de malanga y arroz. Para el caso del almidón nativo entrecruzado (C) mostró mantener esa tendencia a formar agregados esféricos con los gránulos y las características superficiales muy similares al del almidón nativo. No obstante, la presencia regiones porosas fue un poco más evidente en las microcápsulas preparadas con el almidón nativo entrecruzado. La formación de regiones porosas para este tipo de productos pudiera sugerir cierta inestabilidad del producto encapsulado al no estar protegido o cubierto totalmente, consiguiendo interactuar con el medio externo desencadenado su degradación.

Para las microcápsulas preparadas con los almidones modificados por molienda mecánica 30 min y su variedad entrecruzada también mostraron las estructuras esféricas típicas de los productos producidos en secado por aspersión. Tanto la molienda 30 min como molienda 30 min entrecruzado la superficie era mucha más lisa comparada con el almidón nativo y nativo entrecruzado, inclusive comparada con maltodextrina usada como testigo. Para ambos casos la característica de superficie lisa podría estar asociado a un comportamiento adecuado del material de pared por efecto de la modificación por molienda mecánica. De acuerdo con el análisis de temperatura de gelatinización a pesar de no mostrar diferencias significativas entre los tratamientos en la temperatura pico (T_p), si se pudo observar una disminución en la entalpia de gelatinización (ΔH), lo que quiere decir que se requiere menos energía para gelatinizar al almidón, este hecho asociado directamente al daño en regiones cristalinas de la amilopectina de los gránulos por efecto de la molienda y así mismo mejorando su capacidad como encapsulante al hacerlo más versátil durante la atomización en el secado por aspersión. Bajo ese criterio estarían ocurriendo interacciones específicas entre el polímero y otros componentes como el agua generando un tipo de sellado de las cápsulas y el cual podría verse reflejado en la eficiencia de encapsulación.

A pesar de que para ambos materiales tanta molienda 30 min y su variedad entrecruzada muestran este comportamiento de sellado de cavidades, los microencapsulados preparados con molienda 30 min entrecruzado mostró una menor población de cápsulas con estas características. Posiblemente los componentes de la mezcla de alimentación (extracto, material de pared y agua) no tuvieron un comportamiento sinérgico durante el secado asociado a cierta incompatibilidad de grupos funcionales, lo que puede generar que la movilidad de las cadenas se vea disminuidas y evitando una buena formación de la gota durante la atomización.

Como ya se había mencionado, existen ciertas características propias de cada material de pared y por ende afectan el comportamiento de estos durante el proceso de encapsulación impactando sobre las características del producto final. Por ello, es importante caracterizar y comprender el comportamiento de los materiales de pared. Uno de los análisis que ayuda a percibir este fenómeno son los estudios de reología. Bajo ese criterio, el análisis de viscoelasticidad pudo brindar información del posible comportamiento que estos materiales tendrían bajo condiciones de esfuerzo, temperatura y velocidad. De forma general este análisis clasifica a los materiales de acuerdo con el módulo predominante (G' o G''), es decir, si son elásticos o viscosos, aquellos considerados como elásticos son materiales con menor tendencia a la ruptura y más estables, sin embargo, si son considerados como viscosos estos tienen a ser materiales más rígidos y con mayor susceptibilidad a la ruptura reflejando menor estabilidad. Bajo ese criterio, tanto el almidón nativo (NA), así como su variedad entrecruzada (NAEC) fueron los materiales considerados como viscosos, este hecho, puede observarse al obtener microcápsulas con superficie irregular y la presencia de cavidades.

Escenario que fue totalmente diferente para los materiales con comportamiento más elástico (MD, M30 Y M30EC) al obtener microcápsulas con superficies más lisas, por lo que se sugiere una mejor interacción y comportamiento durante el secado. En este contexto estas interacciones ejercidas confieren cierta estabilidad que al mismo tiempo repercute en obtener un producto más homogéneo en ciertas características como la distribución de tamaño de partícula. De acuerdo con Nedovic *et al.*, (2011) la técnica de secado por aspersion a pesar de ser la más utilizada en las industrias. Tiene varias desventajas tales como: complejidad del equipo y condiciones no tan uniformes en la cámara de secado. Además, deben controlarse los fenómenos de transferencia de calor y masas, por lo que no siempre es fácil controlar el tamaño de partícula.

8.7.3 Distribución de tamaño de partícula (DTP)

El tamaño de partícula también está coligada con el método de encapsulación: de ahí que se tenga una separación con base en el tamaño, considerando entonces microcápsulas a aquellas que tengan un diámetro entre 1-1000 μm (Thies *et al.*, 2013). En la figura 16 se encuentran superpuestos los perfiles de distribución de tamaño de partícula para las microcápsulas preparadas con 5 tipos diferentes materiales de pared, donde en general el tamaño de partícula con mayor volumen se encuentra en el intervalo de 200-600 μm , con un promedio de 300 μm para los 5 materiales diferentes con variaciones entre ellos, observando, además, poblaciones menores a 10 μm .

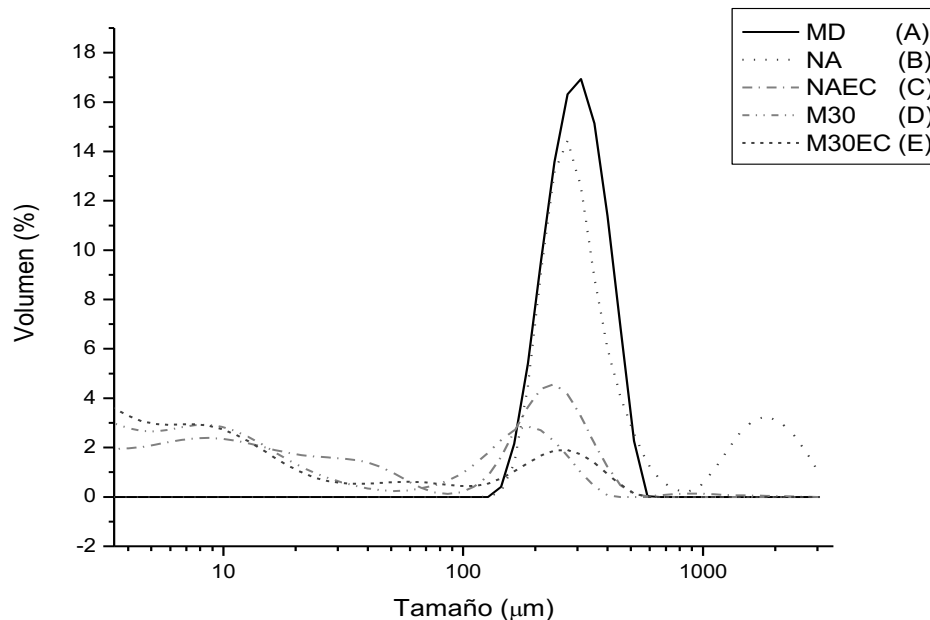


Figura 16.- Perfil de distribución de tamaño de partícula de las microcápsulas preparadas con maltodextrina (A), almidón nativo (B), nativo entrecruzado (C), molienda 30 min (D) y molienda 30 min entrecruzado (E).

Estos resultados permiten inferir que la naturaleza del material encapsulante está influyendo en el tamaño de las partículas y en parte las condiciones de operación del equipo. Como se puede observar, para maltodextrina (A) se observó un patrón de distribución monomodal con una población evidente en el intervalo de 200-500

μm y la cual predominó para los 4 materiales restantes. Sin embargo, para ellos fue menor su volumen. Para las cápsulas preparadas con almidón nativo (B), se presentó un patrón de tipo multimodal con 3 poblaciones distinguibles, la primera en el intervalo de 10-100 μm , seguida de la población de 100-400 μm , la cual fue la de mayor volumen y una última población $> 1000 \mu\text{m}$ con menor volumen, confirmando dichas estructuras en el análisis de microscopía.

En el caso de la variedad entrecruzada del almidón nativo (C) presentó un patrón de distribución del tipo bimodal, la primera población comprende el intervalo de 1-60 μm con evidente variabilidad en tamaños, los cuales se pueden confirmar de acuerdo con los resultados obtenidos en microscopía. Mismo caso para la población que abarca el intervalo de distribución de 100-300 μm .

Para las cápsulas preparadas con los almidones modificados por molienda y molienda entrecruzada fueron las microcápsulas que obtuvieron volúmenes menores a 100 μm y un poco más homogéneas en tamaño. Las cápsulas usando el almidón de molienda 30 min (D) presentó un patrón de distribución bimodal, mostrando poblaciones en el intervalo de 1-60 μm y otra de mayor volumen en el intervalo de 80-300 μm , siendo más homogéneo en tamaños la población del primer intervalo. Este comportamiento de estructuras más homogéneas igual se pudo confirmar en el estudio de microscopía, ya que dichos tamaños eran similares en diferentes campos observados.

Por otro lado, su variedad entrecruzada presentó el mismo patrón de distribución siendo el material con menor volumen de microcápsulas. Sus poblaciones comprenden dos intervalos, el primero que va de 1-30 μm , seguido del intervalo de 100-300 μm . Este comportamiento se podría deber a que la mezcla de alimentación no tuvo un buen comportamiento durante el proceso de encapsulación, por lo que la formación de microcápsulas no se llevó a cabo adecuadamente.

Cabe destacar que, de acuerdo con el análisis de microscopía, se encontraron más estructuras granulares propias del almidón que no interactuaron exitosamente durante el secado que microcápsulas, lo que podría explicar la población en el intervalo de 1-30 μm . De ahí que se infiera que el almidón de molienda entrecruzado no esté llevando a cabo una buena interacción de grupos funciones (OH y P) con los grupos funcionales del extracto, además del disolvente utilizado y la técnica o las condiciones de encapsulación, comparado con las cápsulas preparadas con los otros materiales.

De acuerdo con Lopera *et al.* (2009) la temperatura de entrada del aire $< 150^\circ$ tiene un efecto significativo en la morfología y tamaños de las microcápsulas, afectando las interacciones partícula-partícula, la flotabilidad y el contenido de humedad final, produciendo aglomeraciones y partículas de mayor tamaño según sea el caso. Igualmente, el tamaño de las partículas puede aumentar cuando no se controlan variables del proceso como la viscosidad y la velocidad de alimentación.

Esto podría explicar el comportamiento asociado a las estructuras obtenidas para el almidón nativo entrecruzado (C) y en por parte de la interacción la del almidón de molienda entrecruzado (E), ya que fueron los que tendían a sedimentar en la mezcla dificultando su atomización.

No obstante, de acuerdo con Leyva *et al.*, (2018) el cual generó agregados esféricos a partir de almidón de malanga empleando secado por aspersion, sugiere que la distribución de tamaño de partícula es una variable relevante que podría ser evaluado para la encapsulación de compuestos en estos agregados, ya que las diferencias en el diámetro podrían afectar la estabilidad de la microcápsula, el volumen potencial para la retención del material núcleo y su liberación controlada. De igual forma se infiere que las estructuras de mayor tamaño podrían estar conservando por más tiempo los compuestos o microorganismos encapsulados comparados con los agregados más pequeños.

Como ya se mencionó ciertas características fisicoquímicas del material de pared aunado el método de encapsulación, serán factores que impactarán en propiedades como el tamaño de partícula. El cual está relacionado también con el posible mecanismo de liberación del compuesto encapsulado.

Bajo este criterio, se puede decir que el grosor de la cubierta, la estructura y la composición son de gran importancia; en el caso de que la membrana de la microcápsula sea delgada se puede recurrir al uso de un agente encapsulante extra, o bien, si el grosor de la membrana es mayor este tiende a ser más estable bajo determinadas condiciones (Jafari *et al.*, 2008).

La formación de estructuras de diversos tamaños a su vez está determinada por características como la temperatura de transición vítrea (T_g) asociada al método de encapsulación. En el caso del secado por aspersion, durante la etapa de evaporación del agua, aumenta la viscosidad de la superficie en la partícula hasta un nivel crítico donde se inicia la pegajosidad de los polvos, por lo que debe de ser un parámetro considerado para el proceso.

8.7.4 Temperatura de transición vítrea (Tg)

En la Tabla 12 se presentan la temperatura de transición vítrea (Tg) de las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión utilizando diferentes materiales. Maltodextrina (MD), almidón nativo (AN), nativo entrecruzado (ANEC), molienda 30 min (M30) y molienda 30 min entrecruzado (M30EC). De manera general, la temperatura de transición vítrea se encontró en un promedio de 67.9 °C. Sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico, si se encontraron diferencias significativas entre ellas.

Tabla 12.- Temperatura de transición vítrea (Tg) de las microcápsulas del extracto de pulpa de café.

Muestra	Tg (°C)
MD	68.08 ± 0.18 ^{ab}
AN	68.02 ± 0.09 ^{ab}
ANEC	68.65 ± 0.05 ^a
M30	67.72 ± 0.32 ^b
M30EC	67.35 ± 0.23 ^b

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Se puede observar que, para MD, AN y ANEC, los valores de temperatura de transición vítrea fueron estadísticamente similares. Para MD se obtuvo una Tg de 68.08°C, seguida de AN con 68.02°C y ANEC con 68.65°C. Por otro lado, para el caso de las microcápsulas preparadas con el almidón modificado por molienda y molienda entrecruzada los valores fueron de 67.72 y 67.35°C respectivamente. De acuerdo con el análisis estadístico estas dos fueron diferentes únicamente con ANEC, pero similares a MD y AN.

Estas diferencias y similitudes podrían estar asociadas a las condiciones de modificación y a ciertas características de cada uno de los materiales como la humedad y actividad de agua, influenciando la facilidad con la que se mueven las cadenas.

Cuanto más fácil pueda moverse un polímero, menor será el calor requerido para salir del estado vítreo al gomoso, por lo que el agua ejerce un efecto plastificante sobre el almidón. Por lo tanto, la temperatura de transición vítrea puede disminuir cuando aumento el contenido de humedad o también valores de actividad de agua.

Este hecho puede estar relacionado entonces con las similitudes estadísticas de MD, NA, M30 Y M30EC cuyos valores de actividad de agua son similares y que podrían estarse manifestando como un agente plastificante durante el secado o en la permanencia en el vaso recolector. Además, este hecho se puede corroborar de acuerdo con el análisis de microscopía, donde se observó que, para estos microencapsulados, las superficies de las microcápsulas son más lisas que las de ANEC. No obstante, AN sigue manteniendo similitud con ANEC en ciertas características de la superficie.

Los resultados obtenidos para MD, AN y ANEC, se relacionan con lo reportado por Frascareli *et al.*, (2012), donde en valores $> 0.5 a_w$, la Tg tendió a alcanzar valores constantes de 70°C, lo que indica que a pesar de tener un alto contenido de moléculas de agua rodeando a las partículas, estas ya no pueden unirse y por lo tanto podrían estar provocando un aumento de la Tg. Se podría decir que entonces hay un proceso de saturación de grupos hidroxilo presentes en el material de pared que ya no pueden unirse a las moléculas de agua, relacionado así el grado de entrecruzamiento de ANEC (98%), el cual fue superior al de M30EC (96%).

Se ha teorizado, que la movilidad restringida de las cadenas de polímeros cuando se encuentran en estado en estado vítreo ($T^\circ < T_g$) limitaría severamente la difusión y la movilidad de los reactivos como el agua y el oxígeno, lo que conduce a una mayor estabilidad de los activos sensibles encapsulados (Slade & Levine., 1991).

Por lo tanto, también se asume que cuanto más lejos este la temperatura de almacenamiento por debajo de la Tg del material de pared, más lenta será la tasa de cambios físicos, químicos y enzimáticos en las microcápsulas.

Para ello uno de los análisis importantes para observar el comportamiento durante el almacenamiento es las isotermas de adsorción, las cuales permiten analizar la interacción de la humedad, actividad de agua y temperatura para estimar la vida útil, manipulación y control de calidad del producto.

8.7.5 Densidad

Una de las características propias de los productos obtenidos mediante secado por aspersión es la recuperación de polvos a partir de un líquido, el cual tendrá ciertas características influenciadas por las condiciones de operación. El tamaño y la distribución del tamaño de partícula son características que desempeñan un papel importante en la fluidez, el manejo del polvo, el procesamiento y otras propiedades, como la densidad, el ángulo de reposo y la compresibilidad de la masa (Fitzpatrick *et al.*, 2005).

En la Tabla 13 se muestran los valores de densidad aparente y compactada de los microencapsulados obtenidos. De igual modo, la propiedad de flujo determinada por los índices de Hausner y Carr.

Tabla 13.- Densidad y propiedad de flujo de los microencapsulados preparados con diferentes materiales de pared.

Muestra	Densidad aparente (g/mL)	Densidad compactada (g/mL)	Índice de Hausner	Índice de Carr	Propiedad de flujo
MD	3.32 ± 0.33 ^a	1.85 ± 0.002 ^a	1.7	79.4	Mala
AN	2.50 ± 0.09 ^b	1.75 ± 0.06 ^{ab}	1.4	42.8	Mala
ANEC	2.36 ± 0.06 ^b	1.53 ± 0.09 ^{bc}	1.5	54.4	Mala
M30	2.24 ± 0.17 ^b	1.36 ± 0.07 ^c	1.6	63.9	Mala
M30EC	2.37 ± 0.008 ^b	1.42 ± 0.005 ^c	1.6	66.6	Mala

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Para las microcápsulas preparadas con maltodextrina (MD) se obtuvo una densidad aparente de 3.32 g/mL y una densidad compactada de 1.85 g/mL. Por su parte, las microcápsulas preparadas con almidón nativo (AN) se obtuvo una densidad aparente de 2.50 g/mL y densidad compactada de 1.75 g/mL. Para su variedad entrecruzada 2.36 g/mL y 1.53 g/mL respectivamente. Al mismo tiempo las microcápsulas preparadas con el almidón modificado por molienda (M30) presentó una densidad aparente de 2.24 g/mL y densidad compactada de 1.36 g/mL. Finalmente, para las microcápsulas preparadas con el almidón de modificación dual (M30EC) se obtuvo una densidad aparente de 2.37 g/mL y densidad compactada de 1.42 g/mL.

En el caso de la densidad aparente y compactada, las microcápsulas preparadas con maltodextrina (MD) fueron las que obtuvieron los valores más altos seguidos de las microcápsulas de almidón nativo (AN). Este hecho, puede ser estar asociado a los resultados obtenidos en el análisis de microscopia electrónica de barrido, donde se observaron estructuras de mayor tamaño, mismos que fueron corroborados en distribución de tamaño de partícula, al obtener para maltodextrina una población mayor a 100 μm , el cual fue similar para los microencapsulados de almidón nativo, pero en menor volumen.

Al mismo tiempo en los microencapsulados de almidón entrecruzado (ANEC) mostró un patrón similar a los obtenidos en maltodextrina y almidón nativo, influenciado por la morfología observada en las micrografías y a los valores obtenidos en distribución de tamaño de partícula.

Algo semejante ocurre con los microencapsulados preparados con el almidón modificado por molienda (M30) y la modificación dual (M30EC), donde los valores de densidad tanto aparente como compactada fueron los más bajos respectivamente. Este manifiesto, al igual que los otros tratamientos, está determinado por la morfología y el tamaño de los microencapsulados.

No obstante, esta disminución en los valores de densidad tanto aparente como compactada se pueden relacionar con las superficies más lisas para estos tratamientos que las obtenidas en los microencapsulados de MD, AN Y ANEC, las cuales presentaron superficies más irregulares y con presencia de poros observadas en el análisis de microscopía.

Además de acuerdo con el análisis de distribución de tamaño de partícula tanto M30 como M30EC fueron los tratamientos con menor volumen en la población $> 100 \mu\text{m}$ y mayor prevalencia en tamaños $< 100 \mu\text{m}$, dando paso a un mejor proceso de compactación. Por lo tanto, en lo que respecta a densidad compactada es entendible esa disminución comparada con los otros tratamientos con estructuras de mayor tamaño, lo que evita que estas se puedan compactar.

Dado que las interacciones entre las partículas que afectan las propiedades que determinan la densidad aparente de un polvo también afectan el flujo de este, una comparación entre la densidad aparente y la densidad compactada puede proporcionar una medida de la importancia relativa de estas interacciones en un polvo determinado. Es por ello, que se realizó la determinación del índice de Hauser y Carr, para tener un mejor conocimiento de la fluidez de cada uno de los microencapsulados preparados con los diferentes materiales de pared.

Por un lado, de acuerdo con el índice de Hauser, a partir de valores > 1.60 y > 38 para el índice de Carr, se dice que el polvo tiene propiedades de fluidez extremadamente malas, es decir, que estos polvos tienden a ser cohesivos y dificulta el proceso de disgregación.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los valores obtenidos es que se determina que los microencapsulados tienen una extremadamente mala propiedad de fluidez. Sin embargo, no es un factor determinante que pudiera afectar la estabilidad. Estos resultados son similares a los reportados por Lay et al., (2012) en microencapsulados de jugo de pitaya, donde reportan valores de densidad aparente y compactada cercanos a los obtenidos en esta investigación.

Además, con respecto a los índices de Hausner y Carr, reportan que los polvos de jugo de pitaya se consideran como polvos con mala fluidez, mismos que se presentan en los microencapsulados antes mencionados.

Este comportamiento de baja fluidez está influenciado por las interacciones de fuerzas de van der Waals y fuerzas electrostáticas. Las fuerzas de van der Waals se ven fortalecidas por la humedad absorbida a medida que la distancia entre partículas disminuye con el espesor agregado de la capa de humedad. Al mismo tiempo se ha demostrado que los efectos de la temperatura en la densidad influyen fuertemente en las características del producto seco. A medida que aumenta la temperatura del aire de secado, el producto final se vuelve menos denso (Lopez *et al.*, 2012).

En efecto, este tipo de características de las microcápsulas en conjunto, representan de alguna forma la calidad de las capsulas obtenidas por este método de encapsulación. Por lo que, al mismo tiempo, la determinación asociada a la calidad nos permite lograr un panorama sobre características unitarias del encapsulado. Una de ellas es la eficiencia de encapsulación, la cual establece que tan adecuados y versátiles fueron los materiales de pared para cumplir con la función de proteger a los compuestos de interés para una posterior liberación bajo condiciones específicas.

8.7.6 Determinación de color

En la Tabla 14 se muestran los valores para HUI ($^{\circ}$), L y Croma (C^*) de los microencapsulados preparados con MD, AN, ANEC, M30 y M30EC.

Tabla 14.- Color de los microencapsulados del extracto de pulpa de café.

Muestra	$^{\circ}H$	L	Croma (C^*)
MD	71.93 ± 6.08^a	59.67 ± 0.14^a	22.12 ± 0.10^a
AN	66.67 ± 0.04^a	54.62 ± 1.62^a	19.96 ± 0.04^a
ANEC	68.67 ± 7.89^a	55.74 ± 1.28^a	20.46 ± 0.13^a
M30	63.46 ± 2.32^a	54.13 ± 0.37^a	20.35 ± 0.04^a
M30EC	69.09 ± 1.47^a	52.49 ± 1.45^a	21.78 ± 0.02^a

Media \pm error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

A manera general, de acuerdo con el análisis estadístico, no se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los microencapsulados usando diferentes materiales. No obstante, los valores obtenidos fueron similares, por lo que se podría inferir que están ejerciendo de una manera análoga su capacidad encapsulante, logrando enmascarar el color del extracto de pulpa de café.

Para los 5 tipos diferentes de microencapsulados H° se presentaron en el intervalo de 63.46 a 71.93. la luminosidad (L) se mantuvo en el intervalo de 52 a 59 y finalmente, croma (C^*) se presentó en el intervalo de 19 a 22.

Bajo esos términos H° representa la intensidad de color, L la luminosidad (0-100) y croma (C^*) la saturación. por lo tanto, basado en lo antes mencionado se obtuvieron microcápsulas de color con tendencia a amarillo-ámbar, con buena luminosidad asociada a que los materiales tenían un tono blanco inicialmente, por otro lado, la saturación se mostró una tendencia similar para los 5 tipos de microencapsulados asociada a la tonalidad café de la pulpa.

De acuerdo con los valores de luminosidad estos fueron similares a los reportados por Arrazola et al., (2014) microencapsulado antocianinas presentes en la berenjena mediante secado por aspersión, obteniendo valores de 60 en L cuando agregaba maltodextrina. Así mismo a los reportados por autores como Caí & Corke, (2000) quienes reportaron valores de L de 67 para microencapsulados de betacianinas.

En cuanto a los valores de croma (C*) mostraron ser similares a los obtenidos por Silva *et al.*, (2010) en extractos de jaborcabe microencapsulado con 30% de maltodextrina con valores de °H de 22.

Más allá de considerar a los parámetros de color como una forma de clasificar su calidad y al mismo tiempo la aceptación del mercado para este tipo de productos debe de tomarse en cuenta que puede sugerir en primera instancia de forma visual si el material de pared cumple con el requerimiento o no de tener la capacidad de enmascarar los colores, ya que puede estar relacionado con obtener buena cuantificación de los compuestos.

8.7.7 Eficiencia de encapsulación y determinación de fenoles totales recuperados

Como se menciona anteriormente, la eficiencia de encapsulación es un parámetro unitario que determina la capacidad del material de pared para cumplir o no, con la función de proteger a los compuestos de agentes oxidantes o degradantes que afecten su integridad y, por ende, pérdida de su funcionalidad.

En la Tabla 15 se presentan las concentraciones recuperadas de fenoles totales (CFT) representadas en g EAG/100 g ss y la eficiencia de encapsulación respectivamente para los diferentes microencapsulados. Para el contenido de fenoles totales (CFT) se encontró un valor máximo de 8.93 g EAG/ 100 g ss usando almidón nativo (AN) seguida de maltodextrina (MD), y la variedad nativa entrecruzado (ANEC) con 8.31 y 8.09 g EAG/ 100 g ss respectivamente. En cambio, los valores más bajos en CFT fueron para los microencapsulados preparados con almidón de molienda (M30) con 6.86 g EAG/ 100 g ss y 7.46 g EAG/ 100 g ss usando el almidón modificado dual (M30EC).

Tabla 15.- Eficiencia de encapsulación (%) y cuantificación de fenoles totales (CFT) de los microencapsulados preparadas con diferentes materiales de pared.

Muestra	Concentración recuperada (g EAG/ 100 g SS)	Eficiencia (%)
MD	8.31 ± 0.38 ^{ab}	62.79 ± 0.02 ^{ab}
AN	8.93 ± 0.20 ^a	67.46 ± 0.01 ^a
ANEC	8.09 ± 0.22 ^{bc}	61.16 ± 0.01 ^{bc}
M30	6.86 ± 0.40 ^d	51.82 ± 0.03 ^d
M30EC	7.46 ± 0.04 ^{cd}	56.37 ± 0.00 ^{cd}

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

La eficiencia de encapsulación presentó un comportamiento relacionado con el contenido de fenoles totales obtenido para cada uno de los materiales. Se encontró que la eficiencia más alta fue para las microcápsulas preparadas con almidón nativo (AN) con el 67.46 % de eficiencia, seguida de maltodextrina (MD) y almidón nativo entrecruzado (ANEC) con 62.79 y 61.16% respectivamente.

En contraste, la eficiencia más baja la presentó el microencapsulado preparado con almidón de molienda (M30) con 51.82% seguida del microencapsulado preparado con el almidón de modificación dual, el cual presentó el 56.37%.

El contenido de fenoles totales como la eficiencia de encapsulación de las microcápsulas preparadas con almidones que llevaron la modificación química por entrecruzamiento presentaron los valores más altos en comparación con los microencapsulados preparados con el almidón modificado físicamente. Infiriéndose que la implementación de una modificación química como el entrecruzamiento puede beneficiar en el proceso de encapsulación al interactuar por medio de grupos funcionales mejorando la eficiencia de encapsulación.

Sin embargo, de acuerdo con el análisis de microscopia los microencapsulados preparados con almidón nativo entrecruzado (ANEC) fue uno en los cuales se observaron estructuras $> 100 \mu\text{m}$ por lo que la captación de fenoles en los agregados generados podría estar influenciando el contenido de estos al momento de la cuantificación. Situación parecida suscitada en los microencapsulados preparados con almidón nativo (AN) y maltodextrina (MD), cuyos valores de CFT y eficiencia sugieren estar influenciados por las estructuras de mayor tamaño.

De acuerdo con Hategekimona *et al.*, (2015) la producción de partículas de mayor tamaño mediante secado por aspersion, podrían proporcionar mayor estabilidad al producto, pero al mismo tiempo se vería disminuida la eficiencia de atomización del proceso y, además, impactando en la superficie de las microcápsulas obtenidas. Desde ese punto de vista la presencia de cavidades en las micropartículas presta un camino para facilitar la difusión de oxígeno y un área de contacto mayor para las moléculas de oxígeno que a su vez disminuye la estabilidad oxidativa.

De acuerdo con el análisis de microscopia, los microencapsulados que presentaron alteraciones porosas fueron los preparados con almidón nativo y nativo entrecruzado, generando agregados esféricos, los cuales coinciden con los descrito por Gonzalez *et al.*, (2011). Así mismo, de acuerdo con Desobry *et al.*, (1997) se ha demostrado que la presencia de poros contribuye a una cinética de degradación acelerada durante el periodo inicial de almacenamiento, seguida por una tasa de degradación más lenta.

Además de las alteraciones dentadas, la morfología de la superficie sigue siendo un factor determinante, ya que también se ha demostrado tiene un impacto en la estabilidad, en donde se prefieren microcápsulas con superficies más lisas sobre las superficies dentadas y/o arrugadas. Tal fue el caso de maltodextrina (MD), que, a pesar de obtener buenos valores de eficiencia de encapsulación, la morfología que presenta de acuerdo con el análisis de microscopia pudiera impactar en su estabilidad en condiciones de almacenamiento (Chen *et al.*, 2016).

Botrel *et al.*, (2014) sugieren que la eficiencia de encapsulación también está relacionada con propiedades viscoelásticas, ya que, a mayor flexibilidad de las cadenas para movilizarse, menor tiempo tardara para formar una membrana alrededor del compuesto activo. De igual forma, si estos materiales de pared presentan un comportamiento más elástico, durante el procesamiento de secado por aspersión permitirá la formación de partículas con aspecto más suave, liso y uniforme.

Además, estas características influyen en la disminución de adsorción de agua dando una mayor estabilidad para los activos encapsulados. Lo cual se relaciona con las características morfológicas, y de actividad de agua de los microencapsulados preparados con almidón de molienda (M30) y almidón de modificación dual (M30EC), donde se observaron micropartículas con aspecto más liso en la superficie y los valores de actividad de agua fueron los más bajo.

Este acto puede asociarse a que de acuerdo con el análisis de viscoelasticidad de los materiales de pared tanto la modificación de molienda como la modificación dual se presentó un mayor dominio del módulo elástico, comparado con almidón nativo (AN) y nativo entrecruzado (ANEC) los cuales tuvieron un comportamiento más viscoso y por lo tanto con mayor tendencia a la ruptura. Esto, hace referencia a que la mayoría de los carbohidratos como el almidón en su forma nativa no tienen buena propiedad tensoactiva y, por lo tanto, tiene una capacidad emulsionante muy baja afectando la formación de micropartículas la ser estructuras de carácter más rígido (Barros *et al.*, 2014).

Si bien la eficiencia de encapsulación está relacionada con las características del material de pared, así como con el proceso de encapsulación brindándole protección del medio externo a uno o varios compuestos activos con potencial biológico.

Al mismo tiempo debe ser una técnica lo menos agresiva posible para evitar la degradación o desnaturalización del agente activo. Ofreciendo al final la posibilidad de poder ser liberado bajo condiciones específicas para ejercer el efecto correspondiente (Parra *et al.*, 2010).

El secado por aspersión en este caso de acuerdo con los resultados de eficiencia se infiere que el proceso pudo no haber afectado el efecto biológico del extracto encapsulado. Para ello, los microencapsulados fueron sometidos a la evaluación biológica que fue realizada previamente al extracto puro de forma *in vitro*.

8.8 Evaluación biológica *in vitro* de los encapsulados

8.8.1 Inhibición de la eclosión de huevo (%IEH)

En la Tabla 16 se muestra el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevo (%IEH) para las microcápsulas preparadas con diferentes materiales de pared. Observándose una tendencia de disminución con respecto a la concentración para los 5 microencapsulados preparados con diferentes materiales de pared. A menor concentración de microcápsulas, menor %IEH. Cabe destacar que para los 5 tipos de microencapsulados se utilizó las mismas concentraciones que van de 200 a 12.5 mg /mL. Las microcápsulas que presentaron los valores más altos comparados con ivermectina fueron los microencapsulados preparados con almidón de molienda (M30), almidón con modificación dual (M30EC) y maltodextrina (MD) en las concentraciones de 200, 100 y 50 mg/mL con valores cercanos al 100% de IEH.

Tabla 16.- Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevo de *Haemonchus contortus* (%) con el uso de microencapsulados de extracto hidroalcohólico de pulpa de café.

Producto	Concentración (mg/mL)						
	200	100	50	25	12.5	5	0
MD	98 ± 0.75 ^a	85 ± 4.53 ^a	83 ± 1.33 ^a	34 ± 1.75 ^{bcd}	12 ± 4.50 ^d	NA	NA
AN	85 ± 0.49 ^a	81 ± 9.21 ^a	31 ± 0.21 ^{bcd}	29 ± 2.31 ^{cd}	28 ± 3.48 ^d	NA	NA
ANEC	97 ± 2.20 ^a	34 ± 0.70 ^{bcd}	25 ± 6.10 ^d	19 ± 7.02 ^d	4 ± 0.16 ^d	NA	NA
M30	100 ± 0 ^a	98 ± 0.66 ^a	95 ± 1.75 ^a	88 ± 8.06 ^a	72 ± 0.26 ^{ab}	NA	NA
M30EC	100 ± 0 ^a	90 ± 1.90 ^a	70 ± 0.90 ^{abc}	35 ± 1.83 ^{bcd}	34 ± 2.68 ^{bcd}	NA	NA
Ivermectina						100 ^a	
Agua							1.81 ± 0 ^d

NA: No Aplica. Valores. Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Por otro lado, para los microencapsulados con almidón nativo (AN) de acuerdo con el análisis estadístico, no presento diferencias significativas ($p < 0.05$) con ivermectina en las concentraciones de 200 y 100 mg/mL, perdiendo el efecto de forma gradual a partir de la concentración de 50 mg/mL. De igual modo, los microencapsulados con almidón nativo entrecruzado (ANEC) solo obtuvo a 200 mg/mL un 97% de IEH y a 100 mg/mL se presentó un descenso evidente a 34% IEH.

A pesar de que los materiales que presentaron un mayor contenido de fenoles y mayor eficiencia de encapsulación fueron MD, AN y ANEC, se observó que los microencapsulados a preparados con ANEC perdieron el efecto sobre huevo a menores concentraciones a partir de 100 mg/mL, comparado con M30 y M30EC que mostraron mantener su efecto a pesar de haber obtenido valores más bajos de acuerdo con la determinación de fenoles totales y eficiencia.

Particularmente los microencapsulados de M30 fueron los que mostraron un mayor efecto a pesar de la disminución de la concentración, ya que obtuvo un 72% de IEH a 12.5 mg/mL. Por el contrario, los microencapsulados con M30EC quien presentó el 70% de IEH hasta 50 mg/mL. Este mismo comportamiento lo presentó el microencapsulado con MD, el cual mantuvo su efecto sobre el huevo hasta 50 mg/mL con el 83% de IEH.

Estos resultados son similares a los obtenidos previamente en la evaluación del extracto sobre la viabilidad del huevo. Sin embargo, para el caso particular del extracto el % IEH se mantuvo a pesar de la disminución de la concentración. En donde se obtuvo un 99% para las concentraciones de 200 y 100 mg/mL y 90% para las concentraciones de 50, 25 y 12.5 mg/mL.

Por lo tanto, para fines de esta evaluación de IEH se puede inferir que hubo una ligera disminución del efecto durante el proceso de encapsulación, o bien, que las microcápsulas no lograron brindar efecto protector adecuado asociado a la estructura y morfología del encapsulado.

De forma específica, las que fueron preparadas con MD, AN y ANEC, cuyas estructuras presentaron superficies dentadas e irregulares de acuerdo con el análisis de microscopia, por lo que podrían haber afectado al grupo de compuestos presentes en el extracto al quedar expuestos en medio externo interactuando con moléculas de agua y oxígeno (Botrel *et al.* 2014).

8.8.2 Mortalidad larvaria (%ML)

En lo que respecta al efecto sobre la mortalidad larvaria (%) al igual que la evaluación anterior en el extracto, fueron utilizadas las mismas concentraciones.

En la Tabla 17 se muestra el porcentaje de mortalidad larvaria (%ML) para las microcápsulas preparadas con los diferentes materiales de pared. En contraste con la evaluación de IEH se presentó una diferencia notable en los valores obtenidos, relacionados con los datos obtenidos en la evaluación de mortalidad larvaria del extracto hidroalcohólico de pulpa de café, donde se observó una mayor sobrevivencia por parte de las larvas.

En general, los %ML fueron bajos para casi todos los microencapsulados a excepción de los microencapsulados preparados con M30 y M30 EC, presentando los valores más altos de mortalidad a una concentración de 200 mg/mL y de acuerdo con el análisis estadístico se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en comparación con ivermectina para los diferentes microencapsulados con diferentes concentraciones.

Tabla 17.- Porcentaje de mortalidad larvaria (%ML) de *Haemonchus contortus* con el uso de microcápsulas del extracto hidroalcohólico de pulpa de café.

Tratamiento	Concentración (mg/mL)						
	200	100	50	25	12.5	5	0
MD	8 ± 0.03 ^{ghi}	7 ± 0.06 ^{ij}	5 ± 1.10 ^{ijkl}	4 ± 0.52 ^{klm}	0 ⁿ	NA	NA
AN	7 ± 0.62 ^{ij}	2 ± 3.46 ^{mn}	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	NA	NA
ANEC	11 ± 1.20 ^{gh}	8 ± 0.58 ^{hi}	3 ± 0.48 ^{klm}	2 ± 0.24 ^{lmn}	1 ± 0.51 ^{mn}	NA	NA
M30	77 ± 2.82 ^b	40 ± 0.25 ^e	31 ± 1.66 ^f	12 ± 0.07 ^g	6 ± 0.36 ^{ijk}	NA	NA
M30EC	73 ± 0.63 ^c	47 ± 2.49 ^d	5 ± 0.76 ^{ijkl}	3 ± 0.30 ^{klmn}	1 ± 0.53 ^{mn}	NA	NA
Iver						100 ^a	
Agua							0 ⁿ

NA: No Aplica. Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

En términos más específicos, MD presentó el %ML más alto a 200 mg/mL con el 8% y con tendencia a disminuir con respecto a la concentración, perdiendo el efecto sobre larvas a partir de la concentración de 25 mg/mL. Mismo caso para los microencapsulados preparados con AN y ANEC. No obstante, para el caso particular de AN, se presentó la pérdida del efecto sobre larva a partir de la concentración de 100 mg/mL. Por otro lado, ANEC mostró la misma tendencia de MD, con la diferencia de que ANEC presentó la pérdida del efecto sobre larva a partir de la concentración de 50 mg/mL.

Por el contrario, como se mencionó al inicio, las microcápsulas preparadas con M30 y M30EC, presentaron los valores más altos en cuanto a mortalidad. De manera puntual, los que fueron preparados con M30, ya que obtuvo el 77% de mL a una concentración de 200 mg/mL, seguida del 40% a 100 mg/mL y 31% a 50 mg/mL. Al mismo tiempo en la concentración de 25 mg/mL se presentó una pérdida representativa del efecto sobre larva, donde se obtuvo el 12% y 6% para 12.5 mg/mL.

Esta misma tendencia se mostró para M30EC, el cual obtuvo 73% de ML a una concentración de 200 mg/mL y 47 % a 100 mg/mL. Por el contrario de M30, presentó pérdida del efecto sobre larva a partir de la concentración de 50 mg/mL de forma evidente.

Después de la evaluación es importante recalcar que la efectividad del encapsulado no tuvo una relación directa con el efecto sobre el parásito en fase huevo y larva. No obstante, mostró mantener el efecto a pesar haber sido expuesto al proceso de secado como método de encapsulación. La tendencia de mantenimiento del efecto biológico está relacionada con lo descrito por Shi *et al.*, (2015) al evaluar la actividad antitumoral comparando los valores obtenidos del compuesto puro contra el compuesto microencapsulado, reportando una mayor eficiencia por parte del microencapsulado en comparación con el compuesto puro.

La relación de la eficiencia y morfología de las microcápsulas sobre el efecto en las fases del parásito podrían estar estrechamente relacionadas al considerar que las microcápsulas que mostraron menor efecto presentaron superficies irregulares y regiones dentadas, dejando una vía para reacciones de degradación de los compuestos. En específico y de acuerdo con Desobry *et al.*, (1997) se ha demostrado que la presencia de cavidades en la superficie de microencapsulados repercute en la estabilidad del compuesto al presentar mayores tasas de degradación. Este hecho, puede observarse al obtener menor efecto tanto en la inhibición como mortalidad, comparado con las microcápsulas que obtuvieron superficies lisas, donde se infiere que al quedar recubiertas se están protegiendo los compuestos que generaron mayores efectos de inhibición y mortalidad.

Es importante mencionar que se ha sugerido que los metabolitos secundarios de las plantas de forma natural ejercen sus efectos sobre patógenos de forma sinérgica. No obstante, la naturaleza de estos, así como su estructura podrían influenciar la efectividad de estos, resultando un mayor o menor efecto sobre el patógeno.

Si bien se observaron efectos diferentes en la evaluación sobre huevo y larva, estos resultados tuvieron la misma tendencia para el extracto puro, ya que, los mayores valores se obtuvieron sobre %IEH observándose una tendencia a disminuir al evaluar el efecto del extracto sobre el porcentaje de mortalidad larvaria (%ML).

Se propone que estos efectos en el %IEH se asocian a la mayor sensibilidad por parte del parásito en fase de huevo afectando la viabilidad, ejerciendo un efecto prooxidante por parte de los compuestos presentes en el extracto en la integridad de la membrana del huevo aunado a la concentración. En contraste, se conoce que los helmintos de este tipo son altamente resistentes a condiciones adversas específicamente en fase L3, que es la fase conocida como fase infectante. En este estadio las larvas tienen la capacidad de adaptarse al medio por medio de la expresión de genes sufriendo cambios funcionales y estructurales cuando es amenazado por el huésped o el medio ambiente (Guo *et al.*, 2016).

Bajo ese esquema, los resultados obtenidos en el %ML se asocian a la resistencia de forma natural de las larvas bajo condiciones adversas. No obstante, cabe destacar que, de acuerdo con estos resultados, el compuesto o grupo de compuestos responsables de este efecto sobre larva se encuentra bajo protección en los microencapsulados de M30 y M30EC, en comparación con MD, AN y ANEC. Ya sea por medio de enlaces que interactuaron de forma más eficiente que con los otros materiales o asociada a la morfología y superficie logradas.

Aunque desde otro punto de vista, bajo las condiciones de las interacciones, para el microencapsulado con ANEC, se puede sugerir la formación de enlaces más fuertes entre los compuestos y el material de pared, lo que impide su liberación y por ende el efecto sobre el parásito. Sin embargo, está pérdida del efecto coincide con la presencia de regiones porosas presentadas por efecto de las propiedades viscoelásticas del material, relacionado con lo descrito por Botrel *et al.*, (2014) disminuyendo su capacidad de retención o viabilidad.

Para el caso de AN al igual que ANEC, al presentar regiones porosas los compuestos quedaron más expuestos a reaccionar. Destacando que para AN la formación de estas estructuras ya había sido reportada por Gonzales *et al.*, (2011) así como la estabilidad de vitamina C por Hoyos *et al.*, (2018) y los cuales coincidieron en la poca viabilidad de uso en forma nativa como agente encapsulante.

Además, de acuerdo con Barros *et al.*, (2014) la mayoría de los carbohidratos no tiene buenas propiedades tensoactivas, llevando a la formación de dichas estructuras, aunado a la rigidez de las cadenas de amilopectina dentro del gránulo de almidón durante el proceso de secado.

Simultaneo al proceso de conservación en la viabilidad del compuesto, los sistemas de entrega de fármacos o compuestos de interés se enfrentan a un proceso de digestión cuando estos son administrados por vía oral, o bien, cuando el sitio de acción u órgano blanco requieren un contacto directo. Dado que el parásito en cuestión es del tipo de gastrointestinal y conocer que su órgano blanco es el abomaso, resulta conveniente la valoración de la resistencia del producto ante condiciones de digestión (Araiza-Rosales *et al.* 2013).

En particular, el abomaso, resulta ser el sitio de albergue para parásitos clasificados en general como helmintos, algunos de tipo hematófago como *Haemonchus contortus*. Sin embargo, para la administración de productos vía oral con actividad sobre ellos deben a travesar todo un proceso de digestión ruminal para ejercer su actividad biológica y donde la mayoría los productos son expuestos a degradación por diversos factores.

Al conocer que los microencapsulados conservaron el efecto sobre el parásito encontrado para el extracto fue necesario conocer el comportamiento de los productos en condiciones de digestión de rumiantes simuladas asociada con el ciclo biológico del parásito.

8.8.3 Prueba de degradabilidad

La degradabilidad en el ámbito de digestión en rumiantes hace referencia a la cantidad perdida por descomposición de un material durante su paso a través del tracto digestivo o en un procedimiento de laboratorio (*in vitro*) asociado a la solubilización o ataque por las condiciones involucradas en la fermentación ruminal (pH, temperatura, enzimas y microorganismos) (Giraldo *et al.*, 2006).

En la Tabla 18 se muestran los porcentajes de degradabilidad para las microcápsulas preparadas con diferentes materiales de pared. De forma general, se encontró un promedio 3.1 % de degradabilidad para los 5 tipos de microcápsulas, los cuales no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los microencapsulados en comparación con maltodextrina (MD).

Tabla 18.- Degradabilidad (%) de los microencapsulados del extracto hidroalcohólico de pulpa de café *in vitro*.

Muestra	Degradabilidad (%)
MD	3.1 ± 0.04 ^a
AN	3.2 ± 0.10 ^a
ANEC	3.2 ± 0.03 ^a
M30	3.1 ± 0.03 ^a
M30EC	3.2 ± 0.01 ^a

Media ± error estándar y un valor de ($p \leq 0.05$). diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

En el rumen de forma fisiológica ocurre un proceso de fermentación. Los rumiantes en particular han adaptado su tracto digestivo para la degradación de polímeros como la celulosa y almidón proveniente de los cereales de la dieta en simbiosis con poblaciones microbianas, así como enzimas y así, aprovechar al máximo los productos fermentados (Soest *et al.* 1982).

La intensidad de este proceso degradativo es variable y dependiente de la magnitud de la fracción potencialmente degradable, tamaño de partícula y tiempo de retención en el rumen. Bajo ese criterio, los porcentajes de degradación sugieren una mayor resistencia al proceso de degradación ruminal *in vitro*, al mismo tiempo con relación a los tamaños de partícula obtenidas para los 5 tipos de microencapsulado. Por lo tanto, al obtener microcápsulas de mayor tamaño podría estar influenciando la velocidad de degradación (Araiza-Rosales *et al.* 2013).

Además, otro factor importante es la población microbiana presente en el líquido ruminal, la cual estará determinada por el tipo de dieta al que está condicionado el animal. Los microorganismos del rumen de forma general permiten a los rumiantes

obtener energía de los carbohidratos, con preferencia a los del tipo fibroso como la celulosa y hemicelulosa ya que fermenta de forma más lenta. Esto aumenta su tiempo de retención en el rumen por lo que la velocidad de degradación es más lenta (Rotger-Cerdà., 2004).

En contraste, el almidón, es un carbohidrato simple con mayor facilidad y rapidez de fermentación durante su paso por el rumen. Este, es fermentado de forma más rápida a forma de ácidos grasos volátiles (AGV´) siendo la última fuente de nitrógeno para la síntesis microbiana Giraldo *et al.*, (2006). Dado que los materiales de pared como AN, ANEC y M30EC presentaron el 3.2% de degradación podemos asociar dos posibles mecanismos por los cuales sufrieron una menor tasa de degradación.

Por un lado, cabe destacar que ANEC y M30EC son materiales a los cuales se les realizó un proceso de modificación química adicionando grupos fosfato en los grupos hidroxilo disponibles de las cadenas del granulo de almidón, con la finalidad de aumentar la resistencia a condiciones de digestión al no ser reconocido el sitio de acción por enzimas.

De igual forma, resulta importante mencionar que AN como material de pared se sabe que cuenta con un 80% de amilopectina, la cual es un polisacárido de carácter ramificado y es la fracción cristalina de los gránulos de almidón (Martínez *et al.* 2009). Por lo tanto, lo hace más resistente a procesos de degradación por diversos factores. De ahí que las tasas de degradación para las microcápsulas no se vieron afectado significativamente.

Por otro lado, un mecanismo de protección por parte de las bacterias del rumen se ha propuesto para los materiales ricos en amilosa o fracciones altamente solubles. Lo que propone este mecanismo, es un proceso de adherencia al material con la intención de degradarlo para el proceso de fermentación, que a su vez resulta ser un proceso de protección contra los factores como la temperatura, pH y enzimas (Araiza-Rosales *et al.* 2013).

En este sentido, recordemos que MD es un producto obtenido a partir de la hidrólisis del almidón, el cual ya se encuentra más propenso a ser degradado por bacterias. Mismo caso para M30, con la diferencia de que este, como material de pared fue obtenido a partir de la modificación por molienda mecánica y al ser dañado el gránulo de almidón deja fracciones o sitios de acceso para la agregación bacteriana.

Además, en términos generales los bajos valores en las tasas de degradación se pueden justificar con el análisis de difracción de rayos X de los materiales de pared. En donde a pesar de las modificaciones mantuvieron el grado de cristalinidad del almidón nativo, así como el patrón de difracción del tipo A. Este tipo de patrón a pesar de ser característico de los cereales también está relacionado con el empaquetamiento de las cadenas el cual es de carácter más estrecho dejando menos espacios entre ellas y por ende menor posibilidad de ingreso de agua u otros agentes (Perez *et al.*, 2013).

A manera más específica, de acuerdo con las modificaciones que se realizó en los materiales de pared, se pueden inferir posibles mecanismos de protección ante la degradación:

- Efecto protector de la amilosa y por ende mayor afinidad al ser de carácter más soluble
- Resistencia de la amilopectina de forma normal y de acuerdo con el grado de cristalinidad por parte del almidón nativo.
- Nivel de entrecruzamiento asociado a la modificación química haciendo un efecto difícil de reconocer para las enzimas y algunas bacterias. Además de características de resistencia térmica, fuerzas de cizalla e hinchamiento estabilizadas por la adición de grupos fosfato.
- Polimorfismo de la fracción cristalina por efectos de la modificación física con molino de bolas de alta energía mejorando su perfil de digestión.

9.- CONCLUSIONES

El extracto hidroalcohólico de pulpa de café, actúa inhibiendo la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* y afectando la viabilidad de las larvas infectantes L3. Además, de acuerdo con el análisis de actividad hemolítica por método indirecto no presentó lisis eritrocitaria. Por lo tanto, el extracto evaluado puede ser una alternativa de control no convencional para prevención y control de *Haemonchus contortus*.

La modificación física del almidón de malanga mediante molienda mecánica de alta energía usando bolas de nitruro de silicio por un tiempo de 30 min generó productos con mejores características fisicoquímicas, morfológicas, térmicas y reológicas, por lo que él fue tiempo seleccionado para realizar una segunda modificación por él método químico de entrecruzamiento y el cual presentó mejores características como estabilidad térmica de acuerdo con las temperaturas de transición obtenidas y a fuerzas de cizalla por posibles interacciones de los grupos hidroxilo de la amilosa o amilopectina degradada por efectos de la molienda mecánica para con los grupos fosfato mediante enlaces cruzados, permitiendo así la producción de un almidón resistente tipo 4.

De los materiales de pared utilizados para la encapsulación del extracto hidroalcohólico de pulpa de café mediante secado por aspersion que fueron maltodextrina (MD), almidón nativo (AN), almidón nativo entrecruzado (ANEC), molienda de 30 min (M30) y su homólogo entrecruzado (M30EC) no mostraron diferencias significativas en comparación con maltodextrina en el rendimiento del proceso.

El almidón de molienda de 30 min presentó mejores características fisicoquímicas y morfológicas que permitieron mantener la viabilidad de los compuestos encapsulados presentes en el extracto hidroalcohólico de pulpa de café. Lo cual, fue corroborado en los bioensayos de actividad antihelmíntica al presentar los mejores resultados sobre el porcentaje de inhibición de la eclosión y porcentaje de mortalidad larvaria de *Haemonchus contortus* con respuesta dosis dependiente.

Finalmente, de acuerdo con el ensayo del porcentaje de degradabilidad *in vitro* las microcápsulas preparadas con los diferentes materiales de pared no mostraron diferencias estadísticas significativas comparadas con el testigo (maltodextrina), por lo tanto se puede sugerir que los materiales obtenidos mediante molienda mecánica de alta energía usando bolas de nitruro de silicio puede competir contra otros agentes encapsulantes empelados en técnicas de encapsulación como el secado por aspersión siendo materiales obtenidos con técnicas de menor costo y de bajo impacto ambiental. Además, los microencapsulados del extracto hidroalcohólico de pulpa de café puede ser considerara como alternativa de prevención y control de *Haemonchus contortus* al interrumpir el ciclo bilógico del parasito.

10.- PERSPECTIVAS

Optimización del proceso de extracción del extracto hidroalcohólico de pulpa de café con respecto a la relación de los solventes utilizados, así como asistencia por microondas o ultrasonido, con la finalidad de mejorar el rendimiento del proceso.

Caracterización fitoquímica completa del extracto hidroalcohólico de pulpa de café con la finalidad de hallar los metabolitos secundarios de mayor presencia y relacionarlo con la actividad biológica que presenta.

Optimización del método de modificación física del almidón de malanga con respecto a material de tazón y bolas empleadas, tiempos de molienda, control de temperatura y velocidad.

Optimización del proceso de encapsulación mediante secado por aspersion en variables como la relación material pared-núcleo, temperatura de entrada y de salida, así como porcentaje de sólidos en mezcla de alimentación.

Caracterización termodinámica de las cápsulas con la finalidad de estudiar la estabilidad de las microcápsulas con respecto al tiempo y condiciones de almacenamiento.

Aplicación de las microcápsulas obtenidas en un modelo *in vivo* para verificar los resultados obtenidos en los bioensayos *in vitro*.

11.- BIBLIOGRAFÍA

1. Aboubakar, Y. N. (2008). Physicochemical, thermal properties and microstructure of six varieties of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) flours and starches. *Journal of Food Engineering*, 86(2), 294-305.
2. Acevedo, E. G. (2013). Characteristics of maize starch and relationship with its biosynthesis enzymes. *Agrociencia*, 1405-3195.
3. Agama-Acevedo, E., Garcia-Suarez, F. J., Gutierrez-Meraz, F., Sanchez-Rivera, M. M., San Martin, E., & Bello-Pérez, L. A. (2011). Isolation and partial characterization of Mexican taro (*Colocasia esculenta* L.) starch. *Starch/Staerke*, 63(3), 139–146. <https://doi.org/10.1002/star.201000113>
4. Aguilar, P. V. (2013). Harinas y almidones de yuca, ñame, camote y ñampi; propiedades funcionales y posibles aplicaciones. *Tecnología en Marcha*, 26(1), 37-45.
5. AMECAFE. (2017). *Análisis del Mercado de Consumo de Café en México*. México: Euromonitor Consulting.
6. Anderson, N. D. (2005). Epidemiology and control of nematode infections. *The Epidemiology and Control of Gastrointestinal Parasites of Sheep in Australia*, 23-51.
7. Antonio-Estrada, C., Bello-Pérez, L. A., Martínez-Sánchez, C. E., Montañez-Soto, J. L., Jiménez-Hernández, J., & Vivar-Vera, M. A. (2009). Producción enzimática de maltodextrinas a partir de almidón de malanga (*Colocasia esculenta*) Enzymatic production of maltodextrins from taro (*Colocasia esculenta*) starch. *CYTA - Journal of Food*, 7(3), 233–241. <https://doi.org/10.1080/19476330903091300>
8. AOAC. (2000). Official Methods of Analysis. 13 th Association of Official Analytical Chemists. Washington, USA.
9. Araiza-Rosales, S., A. Murillo-Ortiz, M. & Haubi-Segura, Y. (2013). Solís. *Avances En Investigación Agropecuaria*, 17(2), 79–96. Retrieved from <http://www.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2013/mayo/7.pdf>.
10. Aristizábal, J. S. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de malanga . *Organización de las Naciones*.
11. Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Anthocyanins Microencapsulation of Eggplant (*Solanum melongena* L.) and Evaluation of . *Información Tecnológica*, 25(3), 31–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300006>
12. Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, 237, 623–631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.142>

13. Bautista, H. R. (2017). Characteristics Determining The Ovine Production System In The State Of Oaxaca, Mexico. *Revista Mexicana de Agrosistemas*, 4(1), 38-47.
14. Bautista, J., Salinas-Rios, T., Rodríguez-Magadán, H. M., Aquino Cleto, M., Mariscal Méndez, A., & Ortiz Muñoz, I. Y. (2017). Características que determinan el sistema de producción ovina en el estado de Oaxaca, México, 4(1), 38–47.
15. Becerril, M. C. (2015). Obtaining and structural characterization and functional of acetylated starch of taro (*Colocasia esculenta*). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*.
16. Beirão-Da-Costa, S., Duarte, C., Moldão-Martins, M., & Beirão-Da-Costa, M. L. (2011). Physical characterization of rice starch spherical aggregates produced by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 104(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.11.024>
17. Bello, L. G. (2006). Extrusión de almidones de fuentes no convencionales para la producción de almidón resistente. *Agrociencia*, 40(4), 441-448.
18. Borelli, R. E. (2004). Characterization of a new potential functional ingredient: *coffee silverskin*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1338-1342.
19. Botrel, B. P., & Badole, S. L. (2013). Polyphenols: A Remedy for Skin Wrinkles. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, 861–869. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00067-0>
20. BÜCHI Labortechnik AG. (2017). Nano Secador por aspersion B-90 HP Manual de instrucciones, 99. Retrieved from https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/093265_B-90_OM_es_B_LR_0.pdf?a7910b0f24b407c7b2e85f05926669f7ca5aaf80
21. Castillo Corella, E., Acosta, Y., Betancourt, N. N., Castellanos, E., Matos, M., Cobos, V., & Jover, M. (2002). Utilización de la pulpa de café en la alimentacion de alevines de tilapia roja Eduardo. *Revista AquaTIC*, 16, 1–7.
22. Castro-Muñoz, R., Barragán-Huerta, B. E., & Yáñez-Fernández, J. (2015). Use of gelatin-maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (*Opuntia stricta*). *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.042>
23. Chang, M. C., Chang, B. E., Pan, Y. H., Lin, B. R., Lian, Y. C., Lee, M. S., ... Jeng, J. H. (2019). Antiplatelet, antioxidative, and anti-inflammatory effects of hydroquinone. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 18123–18130. <https://doi.org/10.1002/jcp.28444>
24. Chatakanonda, P., Varavinit, S., & Chinachoti, P. (2000). Relationship of gelatinization and recrystallization of cross-linked rice to glass transition temperature. *Cereal Chemistry*, 77(3), 315–319. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2000.77.3.315>

25. Chen, P., & Xie, B. J. (2012). Properties of maize starch modified by ball milling in ethanol medium and low field NMR determination of the water molecular mobility in their gels. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.03.002>
26. Cordero Camacho, C., & Aristizábal Gutiérrez, F. (2002). Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(1), 100–106.
27. Eliasson, A.-C. (2004). *Starch in food*. *Starch in food*. <https://doi.org/10.1533/9781855739093>
28. Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>
29. Faridi Esfanjani, A., & Jafari, S. M. (2016). Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 532–543. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.053>
30. Fathi, M. &. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 23, 13-27. [doi:10.1016/j.tifs.2011.08.003](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003)
31. Fernández, M. (2001). Manejo de la reproducción en el ganado ovino. *MG Mundo Ganadero*, 2(133), 38–42. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2599996>
32. Figueroa, Y., Guevara, M., Pérez, A., Cova, A., Sandoval, A. J., & Müller, A. J. (2016). Effect of sugar addition on glass transition temperatures of cassava starch with low to intermediate moisture contents. *Carbohydrate Polymers*, 146, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.054>
33. Fitzpatrick, J. J., & Ahrné, L. (2005). Food powder handling and processing: Industry problems, knowledge barriers and research opportunities. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 44(2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2004.03.014>
34. Garzón, M. A. G., Tamayo, L. M. A., Sánchez-Camargo, A. D. P., & Cardona, L. D. J. M. (2011). Secado por aspersion: Una alternativa para la conservación de los compuestos bioactivos y aromáticos del extracto de ajo (*Allium sativum L.*). *Revista Lasallista de Investigacion*, 8(2), 40–52.
35. Gonzalez, R. A., de la Vega, B., García-Suarez, F. J., Agama-Acevedo, E., & Bello-Pérez, L. A. (2011). Preparation of spherical aggregates of taro starch granules. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2064–2069. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.06.018>

36. Harsha, S. (2012). Dual drug delivery system for targeting *H. pylori* in the stomach: Preparation and in vitro characterization of amoxicillin-loaded Carbopol® nanospheres. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4787–4796. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34312>
37. Hazarika, B. J., & Sit, N. (2016). Effect of dual modification with hydroxypropylation and cross-linking on physicochemical properties of taro starch. *Carbohydrate Polymers*, 140, 269–278. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.12.055>
38. Heeger, A., Kosińska-Cagnazzo, A., Cantergiani, E., & Andlauer, W. (2017). Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of Cascara beverage. *Food Chemistry*, 221, 969–975. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.067>
39. Heng, D., Lee, S. H., Ng, W. K., & Tan, R. B. (2011). The nano spray dryer B-90. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(7), 965–972. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.588206>
40. Hernández, A. C., & Hermosilla Carazo, V. J. (2014). Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala, 73. Retrieved from http://www.repositorio.usac.edu.gt/2065/1/06_3661.pdf
41. Hoste, H., Martínez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., ... Sandoval-Castro, C. A. (2012). Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*, 186(1–2), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.042>
42. Hoyos, J., Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., & Alvarez-Ramirez, J. (2018). Potential of taro starch spherical aggregates as wall material for spray drying microencapsulation: Functional, physical and thermal properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.093>
43. Hoyos-Leyva, J. D., Bello-Pérez, L. A., & Alvarez-Ramirez, J. (2018). Thermodynamic criteria analysis for the use of taro starch spherical aggregates as microencapsulant matrix. *Food Chemistry*, 259(December 2017), 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.130>
44. Huang, Z. Q., Xie, X. ling, Chen, Y., Lu, J. ping, & Tong, Z. F. (2008). Ball-milling treatment effect on physicochemical properties and features for cassava and maize starches. *Comptes Rendus Chimie*, 11(1–2), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2007.04.008>

45. Jiménez, A. D., P. Sosa, R. Texcoco, A., Sepúlveda-Jiménez, G., & Porta-Ducoing Mario Rocha-Sosa, H. (2003). Revista Mexicana de Fitopatología La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Redalyc.Org*, 21(3), 355–363.
46. Labuschagne, P. (2018). Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: A review. *Food Research International*, 107(January 2018), 227–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.026>
47. Le Corre, D., Bras, J., & Dufresne, A. (2010). Starch nanoparticles: A review. *Biomacromolecules*, 11(5), 1139–1153. <https://doi.org/10.1021/bm901428y>
48. Li, E., Dhital, S., & Hasjim, J. (2014). Effects of grain milling on starch structures and flour/starch properties. *Starch/Staerke*, 66(1–2), 15–27. <https://doi.org/10.1002/star.201200224>
49. Li, N., Niu, M., Zhang, B., Zhao, S., Xiong, S., & Xie, F. (2017). Effects of concurrent ball milling and octenyl succinylation on structure and physicochemical properties of starch. *Carbohydrate Polymers*, 155, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.063>
50. Li, X., Anton, N., Arpagaus, C., Belleteix, F., & Vandamme, T. F. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*, 147(2), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.113>
51. Liebano, H. E. (2011). Ecología de larvas de nematodos gastrointestinales de bovinos, ovinos y caprinos . En R. Quiroz, *Epidemiología de las enfermedades parasitarias de los animales domésticos* (págs. 266-288). Mexico
52. Lin, H., Qin, L., Hong, H., & Li, Q. (2016). Preparation of starch nanoparticles via high-energy ball milling. *Journal of Nano Research*, 40, 174–179. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JNanoR.40.174>
53. Liu, P., Yu, L., Liu, H., Chen, L., & Li, L. (2009). Glass transition temperature of starch studied by a high-speed DSC. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 250–253. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.027>
54. Liu, P., Yu, L., Wang, X., Li, D., Chen, L., & Li, X. (2010). Glass transition temperature of starches with different amylose/amylopectin ratios. *Journal of Cereal Science*, 51(3), 388–391. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.02.007>
55. Liu, P., Yu, L., Wang, X., Li, D., Chen, L., & Li, X. (2010). Glass transition temperature of starches with different amylose/amylopectin ratios. *Journal of Cereal Science*, 51(3), 388–391. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.02.007>
56. Lopera, S. M. C., Guzmán, C. O., Cataño, C. R., & Gallardo, C. C. (2009). Desarrollo y caracterización de micropartículas de ácido fólico formadas por secado por aspersión, utilizando goma arábica y maltodextrina como materiales de pared. *Vitae*, 16(1), 55–65.

57. Martínez, J. M., Rodríguez, D. A., Lorenzo, Y. C., Lizama, R. S., & Gaitén, Y. G. (2011). Actividad antimalárica y citotoxicidad de extractos hidroalcohólicos de seis especies de plantas usadas en la medicina tradicional Cubana. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 63(1), 52–57.
58. Martínez, M., Mancuello, C., Pereira, C., González, F., Prieto, R., Álvarez, S., & Benítez, B. (2013). Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del extracto crudo de *Phoradendron bathyoryctum eichler* sobre eritrocitos humanos. *Steviana*, 5(12), 114–121.
59. McCrae, C., Debon, S., Guthrie, B., Heigis, J., Mondro, G., & Shieh, W. (2009). Materials for encapsulation of food ingredients: Understanding the properties to find practical solutions. *ACS Symposium Series*, 1007, 213–232. <https://doi.org/10.1021/bk-2009-1007.ch014>
60. Mena, L., Tamargo, B., Salas, E., Plaza, Enrique, I. L., Blanco, Y., Otero, A., & Sierra, G. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 106–116. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000100010
61. Miranda, E., Murillo-Sánchez, M. H., & Cossío-Bayúgar, R. (2008). Expression of a *Haemonchus contortus* cysteine protease in the baculovirus system. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(2). <https://doi.org/10.2225/vol11-issue2-fulltext-2>
62. Mitre, G. F., Olmedo-Juárez, A., Rojo-Rubio, R., González-Cortázar, M., Mendoza-de Gives, P., Hernández-Beteta, E. E., ... Zamilpa, A. (2017). Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 204(April), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.010>
63. Moraes, J., Alves, F. S., & Franco, C. M. L. (2013). Effect of ball milling on structural and physicochemical characteristics of cassava and Peruvian carrot starches. *Starch/Staerke*, 65(3–4), 200–209. <https://doi.org/10.1002/star.201200059>
64. Morrison, W. R., Tester, R. F., & Gidley, M. J. (1994). Properties of damaged starch granules. II. Crystallinity, molecular order and gelatinisation of ball-milled starches. *Journal of Cereal Science*. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1994.1028>
65. Mosquera, L., Arias, S., Jimenez, D., Lopez, D., & Osorio, A. (2015). Transición vítrea en alimentos: sistemas binarios agua-carbohidratos. *Revista Vector*, 9(2014), 24. Retrieved from http://vector.ucaldas.edu.co/downloads/Vector9_4.pdf
66. Neira-Carrillo, A., Yáñez Muñoz, D., Aguirre Zazzali, P., Amar Marini, Y., Vidal Vilches, S., & Egaña Palma, R. (2014). Encapsulación de biomoléculas usando polímeros naturales: “un nuevo enfoque en la entrega de fármacos en medicina.” *Avances En Ciencias Veterinarias*, 28(2). <https://doi.org/10.5354/0716-260x.2013.30204>

67. Newman, D. C. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629-661.
68. NRCS. (2017, Enero 31). *Centro Nacional de Datos de Plantas del USDA NRCS*. Obtenido de EOL: <http://eol.org/pages/1091931/overview>
69. Nurhadi, B., Roos, Y. H., & Maidannyk, V. (2016). Physical properties of maltodextrin de 10: Water sorption, water plasticization and enthalpy relaxation. *Journal of Food Engineering*, 174, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.11.018>
70. Ortiz-Ocampo, G. I., Pérez, J. I. C., Covarrubias-Cárdenas, A. G., Santos-Ricalde, R. H., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., ... Torres-Acosta, J. F. J. (2016). Efecto antihelmíntico *in vitro* e *in vivo* de residuos de *coffea arabica* sobre un aislado de *Haemonchus contortus* con baja susceptibilidad a taninos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 19(1), 41–50.
71. Pacheco, A., Moran, J., Breff, D., & Saborit, E. (2013). Caracterización física , fisicoquímica y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L con acción antimicrobiana Physical , physical-chemical and chemical characterization of total extracts of fresh. *Revista Mexicana De Ciencias*, 44, 52–59.
72. Pachuau, L., Dutta, R. S., Devi, T. B., Deka, D., & Hauzel, L. (2018). Taro starch (*Colocasia esculenta*) and citric acid modified taro starch as tablet disintegrating agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 397–405. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.06.086>
73. Paddock, R. M. (2010). *Purdue University*. Obtenido de Purdue University: <https://www.addl.purdue.edu/Newsletters/2011/Fall/Haemonchus.aspx>
74. Palma, H. (2012). Caracterización de almidones de diferentes fuentes tratados con ácido para la encapsulación de vitamina C, 124.
75. Pandey, A. S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 6(2), 153-162.
76. Partida De La Peña, J. A., Braña, V. D., Jiménez, S. H., Ríos, R. F. G., & Buendía, R. G. (2013). *Producción de Carne Ovina*. Retrieved from http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Documents/MANUALES_INIFAP/Manual_Producción_de_Carne_Ovina.pdf
77. Pérez-Hernández, L. M., Chávez-Quiroz, K., Medina-Juárez, L. Á., & Gámez Meza, N. (2013). Compuestos Fenólicos, Melanoidinas Y Actividad Antioxidante De Cafe Verde Y Procesado De Las Especies *Coffea arabica* Y *Coffea canephora*. *BIOtecnica*, 15(1), 51. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i1.136>
78. Pérez-Masiá, R., López-Nicolás, R., Periago, M. J., Ros, G., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2015). Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, 168, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.051>

79. Ramakrishnan, Y., Adzahan, N. M., Yusof, Y. A., & Muhammad, K. (2018). Effect of wall materials on the spray drying efficiency, powder properties and stability of bioactive compounds in tamarillo juice microencapsulation. *Powder Technology*, 328, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.12.018>
80. Ramirez-Martinez, J. R. (1988). Phenolic compounds in coffee pulp: Quantitative determination by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 43(2), 135–144. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740430204>
81. Rapelo, A. T., Castillo, P. M., & Lengua, M. D. (2013). Propiedades fisicoquímicas, morfológicas y funcionales del almidón de malanga (*Colocasia esculenta*). *Revista Lasallista de Investigacion*, 10(2), 52–61.
82. Ribeiro, L. V. (2017). The use of *Eucalyptus staigeriana* nanoemulsion for control of sheep haemonchosis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(3), 221-226. doi:10.1590/s0100-736x2017000300004
83. Rodríguez, Martínez, & González, de la C. (2001). Calorimetría diferencial de barrido y rayos-x del almidón obtenido por nixtamalización fraccionada. *Superficies y Vacío*, 13, 61–65.
84. Rodríguez-miranda, J., Rivadeneyra-rodríguez, J. M., De, E., Ramírez-rivera, J., Juárez-barrientos, J. M., Herrera-torres, E., ... Hernández-santos, B. (2016). J0430104, (16), 430104.
85. Roos, Y. H. (1993). Water Activity And Physical State Effects On Amorphous Food Stability. *Journal of Food Processing and Preservation*, 16(6), 433–447. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1993.tb00221.x>
86. Rotger Cerdà, A. (2004). Fermentación ruminal, degradación proteica y sincronización energía-proteína en terneras en cebo intensivo., 196. Retrieved from <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/5667/arc1de1.pdf?sequence=1>
87. Rufián-Henares, J. A., & Pastoriza, S. (2014). *Biological Effects of Coffee Melanoidins. Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00094-2>
88. Salazar, A. N., Acuña, R. S., & de Salcedo, M. G. (2008). Utilización de la pulpa de café en la alimentación animal. *Zootecnia Tropical*, 26(4), 411–419.
89. Salem, A. Z. M., Olivares, M., Lopez, S., Gonzalez-Ronquillo, M., Rojo, R., Camacho, L. M., ... Mejia, H. P. (2011). Effect of natural extracts of *Salix babylonica* and *Leucaena leucocephala* on nutrient digestibility and growth performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 170(1–2), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.08.002>
90. Samanta, K. K., Stephens, D., & Robertson, I. D. (2007). Design and performance of a 60-GHz multi-chip module receiver employing substrate integrated waveguides. *IET Microwaves, Antennas and Propagation*, 1(5), 961–967. <https://doi.org/10.1049/iet-map:20060301>

91. Sandoval-Peraza, V. M., Cu-Cañetas, T., Peraza-Mercado, G., & Acereto-Escoffí, P. O. M. (2017). Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceuticas. *Propiedades Funcionales de Hoy*, (2016), 181–218. <https://doi.org/10.3926/oms358>
92. Sefa-Dehen, S. S. (2002). Starch structure and some properties of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* and *Colocasia esculenta*) starch and raphides. *Food Chemistry*, 79(4), 435-444.
93. Shi, F., Zhang, Y., Yang, G., Guo, T., & Feng, N. (2015). Preparation of a micro/nanotechnology based multi-unit drug delivery system for a Chinese medicine Niu Huang Xing Xiao Wan and assessment of its antitumor efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*, 492(1–2), 244–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.023>
94. Shi, L., Cheng, F., Zhu, P. X., & Lin, Y. (2015). Physicochemical changes of maize starch treated by ball milling with limited water content. *Starch/Staerke*, 67(9–10), 772–779. <https://doi.org/10.1002/star.201500026>
95. Shi, X., Yuan, C., Ai, M., Ge, C., Hu, M., ... Yang, X. (2017). Genome-wide SNP analysis using 2b-RAD sequencing identifies the candidate genes putatively associated with resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1959-6>
96. Silva, M. N. (2011). Production, Composition, and Application of Coffee. *Food Bioprocess Technol*, 4(13), 661-672.
97. Tester, R. F. (1997). Properties of damaged starch granules: Composition and swelling properties of maize, rice, pea and potato starch fractions in water at various temperatures. *Food Hydrocolloids*, 11(3), 293–301. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(97\)80059-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(97)80059-8)
98. Torres, A., Durán, M., & Montero, P. (2013). Evaluación de las propiedades funcionales del almidón obtenido a partir de malanga (*Colocasia esculenta*) El almidón constituye una excelente materia prima para modificar la textura y consistencia de los alimentos . Su funcionalidad depende del peso mole. *Ciencias e Ingeniería Al Día*, 8(2), 29–38.
99. Tze, N. L., Han, C. P., Yusof, Y. A., Ling, C. N., Talib, R. A., Taip, F. S., & Aziz, M. G. (2012). Physicochemical and nutritional properties of spray-dried pitaya fruit powder as natural colorant. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 675–682. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0088-z>
100. Utsunomiya, H., Ichinose, M., Uozaki, M., Tsujimoto, K., Yamasaki, H., & Koyama, A. H. (2008). Antiviral activities of coffee extracts in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 46(6), 1919–1924. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.031>
101. Varan, G., Benito, J. M., Mellet, C. O., & Bilensoy, E. (2017). Development of polycationic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for anticancer drug delivery. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 8(1), 1457–1468. <https://doi.org/10.3762/bjnano.8.145>

102. Vargas-Magaña, J. J., Torres-Acosta, J. F. J., Aguilar-Caballero, A. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., & Chan-Pérez, J. I. (2014). Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology*, 206(3–4), 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.008>
103. Vazquez, A., Alvarez, E., López, J., Wall, A., & Rosa, L. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua*, 6(2), 84–93. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7699>
104. Von Son-De Fernex E, Alonso-Díaz MT, Mendoza-de Gives P, Valles-de la Mora B, González-Cortazar M, Zamilpa A, Castillo-Gallegos E. 2015. Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Veterinary Parasitology* . 214:89-95. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.10.005.
105. Wang, S., & Copeland, L. (2015). Effect of Acid Hydrolysis on Starch Structure and Functionality: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(8), 1079–1095. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.684551>
106. Wang, Y., & Zhou, W. (2016). Chapter 3 - Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Bakery Foods. *Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Foods*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100309-1/00022-5>
107. Yang, Y., Guo, X., Zhang, H., Huang, Y., Chen, X., & Du, A. (2017). Characterization of the development of *Haemonchus contortus* ZJ strain from gerbils. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2465-1>
108. Yoshihara, E., Minho, A. P., Tabacow, V. B. D., Cardim, S. T., & Yamamura, M. H. (2015). Ultrastructural changes in the *Haemonchus contortus* cuticle exposed to *Acacia mearnsii* extract. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(6), 3763–3768. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6p3763>
109. You I. & This, I. N. (2008). in This Chapter, 529–552.
110. Zhang, W., Ding, W., Ndeurumi, K. H., Wang, Z., & Feng, Y. (2015). Effect of wet ball milling on physicochemical properties and crosslinking reaction performance of corn starch. *Starch/Staerke*, 67(11–12), 958–963. <https://doi.org/10.1002/star.201400251>