

Encapsulación de compuestos bioactivos con alginatos para la industria de alimentos

Encapsulation of bioactive compounds with alginates for the food industry

López C. Alex .F.¹, Deladino L.^{1,2}, Navarro Alba S.^{1,3}, y Martino Miriam N^{*1,2}

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos (CIDCA), CONICET, 47 y 116, La Plata, Argentina.

²Facultad de Ciencias. Exactas, ³Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina

Recibido 20 de Septiembre 2011; aceptado 7 de noviembre de 2011

RESUMEN

Los compuestos bioactivos como vitaminas, antioxidantes, aceites esenciales, enzimas, microorganismos benéficos, etc. pueden ser preservados por distintas técnicas de encapsulación. Estas tienen como propósito mantener su actividad por aislamiento total o parcial del entorno hasta su liberación en tiempo y lugar adecuados. También la encapsulación es fuente de nuevos ingredientes con propiedades únicas, permite enmascarar o preservar aromas y sabores, reducir problemas de aglomeración y volatilidad de líquidos, mejorando la dosificación de aditivos y por lo tanto la relación costo-efectividad. Los métodos que involucran al alginato de Na o K como precursor de la matriz encapsulante son la coacervación y la gelación iónica. Combinando ambos mecanismos, en nuestro laboratorio se ha estudiado la encapsulación de extractos de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en matrices de alginato de Ca con y sin recubrimiento de quitosano, para preservar sus características antioxidantes. Se desarrollaron sistemas complejos con el agregado de carga (gránulos de almidón). Esto permitió aumentar la eficiencia del contenido del compuesto activo y la modulación de su liberación en un sistema gastro-intestinal simulado.

Palabras clave: alimentos funcionales, encapsulación, extractos antioxidantes, liberación, yerba mate.

*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. E-mail: mmartino2009@gmail.com

ABSTRACT

*The bioactive compounds such as vitamins, antioxidants, essential oils, enzymes, beneficial microorganisms, etc., can be preserved by various encapsulation techniques. These are intended to maintain their activity for total or partial environment isolation until their release in suitable time and place. Encapsulation is also the source of new ingredients with unique properties; it allows masking or preserving flavors and aromas, and reducing agglomeration problems and liquids volatility, enhancing the additive dosage and therefore the cost-effectiveness relationship. The methods involving the Na or K alginate as precursor of the encapsulating matrix are: the coacervation and ionic gelation. Combining both mechanisms in our laboratory it has been studied the encapsulation of extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in Ca alginate matrices with and without chitosan coating to preserve its antioxidant properties. Complex systems were developed with the aggregate loading (starch granules). This allowed increasing the content efficiency of the active compound and modulating its release in a simulated gastro-intestinal system.*

Keywords: functional foods, encapsulation, antioxidant extracts, release, yerba mate.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos bioactivos como vitaminas, antioxidantes, aceites esenciales, enzimas, microorganismos benéficos, etc. pueden ser preservados por distintas técnicas de encapsulación. Estas tienen como propósito mantener su actividad por aislamiento total o parcial del entorno hasta su liberación en tiempo y lugar adecuados (Borgogna *et al.*, 2010; Champagne & Fustier, 2007). También la encapsulación es fuente de nuevos ingredientes con propiedades únicas, permite enmascarar o preservar aromas y sabores, reducir problemas de aglomeración y volatilidad de líquidos, mejorando así la dosificación de aditivos y por lo tanto la relación costo-efectividad. Entre los vehículos

usados para la encapsulación se destacan los polímeros naturales (almidones, quitosanos, alginatos, sueros lácteos, etc.). Existen varios métodos para obtener sistemas encapsulados por secado y enfriado spray, formación de liposomas, coacervación, gelación iónica, inclusión molecular, cocrystalización, etc. La técnica más difundida y de aplicación a nivel industrial es el secado spray. Otros desarrollos para ampliar la escala de producción incluyen técnicas de emulsificación, mejoras en el sistema de extrusión con jeringas por aplicación de chorros de aire, unidades eléctricas, de vibración o discos giratorios, siendo los más promisorios lo que involucran sistemas emulsionados (Gouin, 2004).

Los métodos que involucran al alginato de Na o K como precursor de la matriz encapsulantes son la coacervación y la gelación iónica. Durante la coacervación compleja se produce la separación de fases de una emulsión o suspensión, que contiene el compuesto bioactivo, al combinarse el alginato con otro polímero de carga opuesta. Esto permite la formación de hidrogeles que incluyen el material activo, lográndose altos rendimientos. Por este mecanismo se han obtenido sistemas con una o múltiples capas, que otorgaron características específicas de permeabilidad y estabilidad a compuestos como aceites esenciales, aceites de pescado, vitaminas y enzimas, etc. La gelación iónica se produce por el entrecruzamiento de unidades de ácido urónico de distintas cadenas de alginato con cationes multivalentes (Ca^{+2} , Zn^{+2} , $\text{Fe}^{+2/+3}$, Co^{+2} , Ba^{+2} , Al^{+3}). Las cápsulas más utilizadas son las de alginato de Ca por su sencillez de preparación a escala de laboratorio, por extrusión o emulsificación, incluso en condiciones estériles. Son muy versátiles; virtualmente cualquier compuesto puede ser encapsulado con este sistema, ya sea hidrofóbico o hidrofílico, líquido o sólido.

La liberación controlada se define como el mecanismo mediante el cual uno o más compuestos pueden dirigirse a un sitio específico, en un tiempo y velocidad modulada (Mastromatteo *et al.*, 2010). Los mecanismos más importantes que regulan la velocidad de liberación de un compuesto activo son: difusión, hinchamiento, biodegradación/erosión y presión osmótica. La relevancia de cada uno de ellos dependerá en gran medida

de la composición de la matriz polimérica y del medio circundante, por lo que el agente activo puede ser liberado al medio por uno o por varios mecanismos actuando simultáneamente (Barba *et al.*, 2009).

La yerba mate es una planta nativa de la región subtropical de América del Sur, consumida y producida principalmente en Argentina, el sur de Brasil, Uruguay y Paraguay. En estos países se ingiere como bebida en proporciones de más de un litro por día por millones de personas, como mate, mate cocido o tereré. Esta planta contiene una gran variedad de compuestos bioactivos capaces de actuar frente a reacciones de estrés oxidativo, implicadas en el desarrollo de diversas enfermedades (Bracesco *et al.*, 2011). Actualmente el uso de antioxidantes naturales es de gran interés para el desarrollo de alimentos con propiedades especiales. Sin embargo, debido a la inestabilidad química y física de estos compuestos, su aplicación directa en alimentos es limitada. A través de diferentes técnicas de encapsulación se ha logrado conservar antioxidantes de origen natural como ingrediente funcional activo (Deladino *et al.*, 2008; Fang & Bhandari, 2010).

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar distintas formas de encapsular extractos antioxidantes de yerba mate; en matrices de alginato de calcio, alginato de calcio con recubrimiento de quitosano y almidón-alginato de calcio, estudiar las características morfológicas de los sistemas y analizar el mecanismo y la cinética de liberación de los polifenoles en sistemas modelo gastro-intestinales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las cápsulas

Para la obtención de las cápsulas de alginato de calcio se preparó un extracto acuoso de yerba mate al 3 % p/v y se mezcló con alginato de sodio al 2% p/v (Sigma–Aldrich, EE.UU). Las cápsulas se obtuvieron mediante gelificación iónica por goteo en una solución de CaCl_2 al 0,05 M usando una bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson®, Francia). Los geles permanecieron en la solución de CaCl_2 15 min, se filtraron y fueron lavados con solución buffer acético/acetato pH 5.5 para eliminar el exceso de iones calcio (Deladino *et al.*, 2008). Las cápsulas de alginato de calcio así obtenidas, se denominarán sistemas simples (SS).

Así mismo, se obtuvieron dos tipos de sistemas compuestos:

Las cápsulas con recubrimiento de quitosano (SSQ) se obtuvieron sumergiendo parte de las cápsulas de alginato de calcio en una solución de quitosano 0,5% p/v durante 30 min para formar una capa externa adicional.

Las cápsulas con relleno de almidón (SSA) se prepararon adicionando a la solución de alginato de calcio y extracto, almidón de maíz comercial (Maizena®) al 2% p/v.

Todas las cápsulas se secaron en estufa de convección forzada a 65°C durante 3 hs.

La eficiencia de la encapsulación de los antioxidantes de yerba mate se determinó mediante la destrucción de una cantidad conocida de cápsulas con citrato de sodio 5% p/v y la posterior determinación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (Schlesier *et al.*, 2002).

Caracterización de las cápsulas

El análisis morfológico de los encapsulados se realizó mediante microscopía SEM en un equipo FEI-Quanta 200 (Holanda). Las muestras se metalizaron con una capa de oro y se examinaron empleando un voltaje de aceleración de 20 kV.

La distribución de tamaño de poro en los sistemas encapsulados se analizó mediante porosimetría de intrusión de mercurio (PIM) en un equipo Pascal 440 Thermo Fisher. La presión máxima de Hg aplicada a las muestras fue de 400 MPa. El tratamiento de los datos experimentales fue realizado mediante la ecuación de Wasburn (1921).

Cinética de liberación de polifenoles en sistemas modelo

Con el objetivo de simular el pasaje por el tracto digestivo se prepararon las siguientes soluciones:

Fluido gástrico simulado (FGS): Para simular este fluido se empleó HCl, (Anedra, Argentina) el cual se preparó en una concentración de 0,1 M (pH 2).

Fluido intestinal simulado (FIS): Este fluido se simuló a través del buffer Sorensen's fosfato, formado por la mezcla de dos soluciones: KH_2PO_4 y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, para dar una solución final de pH=7,4. Para el ensayo se colocaron en un erlenmeyer 40 cápsulas de cada tipo, en 100 ml de fluido gástrico simulado, en un agitador orbital a 37°C y 180 rpm durante 3 hs. Luego de este período, se filtraron las cápsulas (aún íntegras) y se trasvasaron a 100 ml de fluido intestinal simulado, donde también permanecieron un tiempo de 3 hs. Una cantidad conocida de

.....

cápsulas se introdujo en un volumen de medio y permanecieron en un agitador orbital. Se tomaron alícuotas del sobrenadante a diferentes tiempos. Se cuantificó la fracción de polifenoles liberada a cada tiempo t respecto de la masa inicial de polifenoles encapsulada.

La masa inicial de polifenoles se determinó desintegrando la misma cantidad de cápsulas empleadas en el ensayo de liberación en una solución de citrato de sodio (5% p/v). El contenido de polifenoles en todos los casos fue medido mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Por otro lado, para el estudio de la cinética de cambio de masa de las cápsulas durante la inmersión en FGS se llevó a cabo un ensayo equivalente al descrito anteriormente. Se prepararon varios tubos con igual masa de cápsulas y volumen de medio. A diferentes

tiempos se seleccionó un tubo al azar, las cápsulas se filtraron, se secaron con papel Whatman No 1 y se pesaron. El porcentaje de cambio de masa fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta W(\%) = \left(\frac{W_t - W_0}{W_0} \right) * 100 \text{ (ecuación 1)}$$

Donde W_t representa la masa (g) de las cápsulas en el tiempo t y W_0 la masa (g) de cápsulas introducidas inicialmente. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado en el software Sigma Plot versión 11.0. Se realizaron análisis de varianza, con un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron cápsulas de alginato de calcio conteniendo extracto de yerba mate con una eficiencia de carga del 55% y de 48% para las cápsulas con recubrimiento de quitosano. Esta disminución se atribuyó al método de preparación principalmente y a la microestructura del sistema. La incorporación de almidón al 2% p/v mejoró significativamente la capacidad de carga alcanzando valores de eficiencia del 65 %.

Las micrografías SEM obtenidas para las cápsulas de alginato control, con recubrimiento de quitosano y con agregado de almidón se muestran en la figura 1.

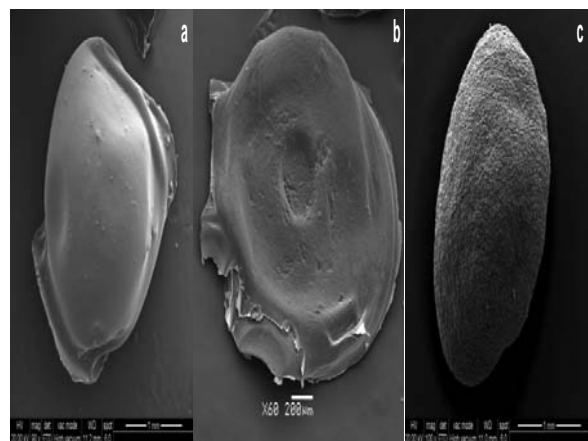


Figura 1. Micrografías SEM para cápsulas de alginato (a), alginato-quitosano (b) y alginato con relleno de almidón (c).

Se observó que las cápsulas con quitosano eran más irregulares y aplanadas luego del secado (figura 1b). Las cápsulas con almidón al 2 % (figura 1c), mantuvieron cierto grado de esfericidad; la distribución de los gránulos tanto en el exterior como en el interior de la matriz fue homogénea.

La porosidad es la relación entre los huecos o el volumen intersticial de una material y su masa. Los espacios o huecos comprenden hoyos y canales dentro de un material lo cual crea una superficie interna. En el caso de los encapsulados estudiados, la observación de la distribución y tamaño de poros puede estar relacionada con la velocidad y el mecanismo mediante el cual se libera el compuesto activo.

En las cápsulas secas, con y sin recubrimiento de quitosano, los poros mostraron diámetros comprendidos entre 10 y 1000 nm. Las cápsulas recubiertas con quitosano tuvieron una pequeña proporción de poros con diámetros mayores (entre 1000 y 10000 nm) con respecto a las cápsulas de alginato. Este hecho podría estar relacionado con lo hallado mediante fotografías SEM de cápsulas secas en las que se han observado rajaduras o canales en la superficie de dichas cápsulas, lo cual posiblemente derive en un mayor tamaño de poro detectado por porosimetría. Otros autores han informado valores de tamaño de poro de cápsulas de alginato de entre 5 y 200 nm ((George & Abraham, 2006).

En la figura 2 se observa la distribución de tamaño de poro para las cápsulas de alginato con y sin agregado de relleno de almidón.

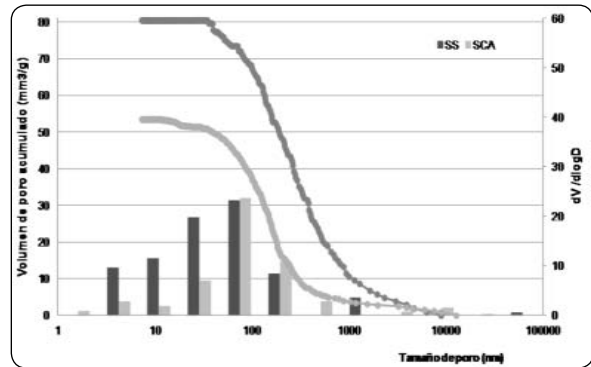


Figura 2. Distribución de tamaños de poro para las cápsulas de alginato sin (SS) y con (SCA) agregado de almidón de relleno. Eje principal: Volumen acumulado de poros (Gráfico de líneas), Eje secundario: dV/d Log D (Gráfico de barras).

Se obtuvo un tamaño de poro promedio de 100 nm, para los sistemas con y sin relleno de almidón. Las cápsulas de alginato de calcio resultaron más porosas que las que contenían almidón al 2%. El agregado de relleno modificó el perfil de distribución de poros generando una disminución del volumen acumulado de poros, principalmente entre los 5-50 nm. Este comportamiento fue atribuido a la distribución de almidón en el interior de la matriz como se pudo observar en las fotografías SEM (Figura 1), el cual dificultaría el ingreso de mercurio en el ensayo debido a que aumenta la tortuosidad del sistema.

Liberación en sistemas simulados in vitro

El extracto de yerba mate fue liberado casi en su totalidad en el estómago; en el fluido intestinal liberado los valores obtenidos fueron del 15% aproximadamente para cápsulas húmedas. En las figuras. 3 y 4 se muestran las curvas de liberación del extracto en fluido gástrico simulado.

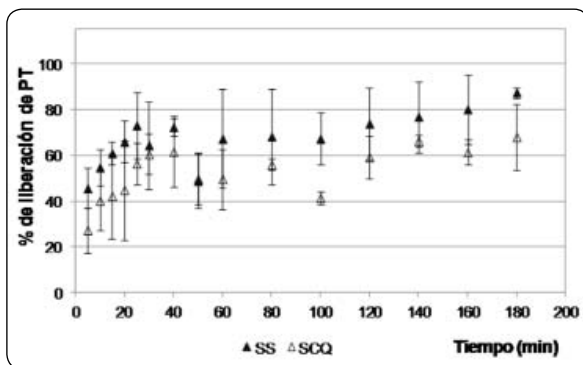


Figura 3. Porcentaje de extracto liberado para cápsulas de alginato control húmedas (SS) y para cápsulas con quitosano húmedas (SCQ).

Se observa en las figuras 3 y 4 que los sistemas secos liberan el contenido del compuesto activo más rápidamente, indicando el cambio de mecanismo en ambas condiciones físicas. Durante el proceso de secado los compuestos activos, solubles en agua, se desplazan hacia la superficie, se acumulan y son liberados más rápidamente.

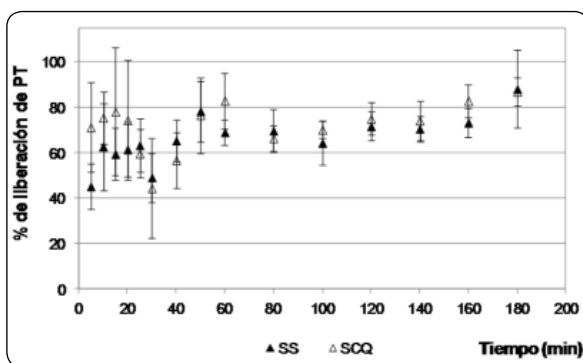


Figura 4. Porcentaje de extracto liberado para cápsulas de alginato control secas (SS) y para cápsulas con quitosano secas (SCQ).

La cinética de liberación de polifenoles en FGS para las cápsulas secas con y sin agregado de relleno se muestra en la figura 5. Al comparar todos los sistemas secos, se observa que la liberación 50% de los polifenoles totales se produce en un tiempo entre 5-10 min para las cápsulas control de alginato y con recubrimiento de quitosano; sin embargo, para las cápsulas con relleno de

almidón fueron necesarios 25 min para liberar dicho porcentaje (figura 3, 4 y 5). A tiempos mayores, la cantidad de polifenoles totales liberada continuó en ascenso pero a menor velocidad, siendo este efecto más notorio en las cápsulas con almidón, el cual disminuyó sustancialmente la cinética de liberación. Este efecto modulador puede explicarse teniendo en cuenta el estudio de las características microestructurales discutidas anteriormente.

En este sistema, el almidón actúa como material de relleno reforzando la estructura y ocupando parcialmente los espacios internos de la matriz, disminuyendo así la porosidad del sistema. Los gránulos de almidón dispersos en la matriz actúan como barrera al flujo de solvente conduciendo sus moléculas a través de un camino tortuoso, que hace más lenta la liberación de compuesto activo (figura 5).

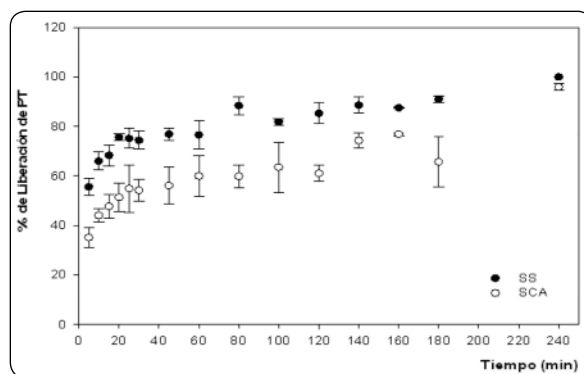


Figura 5. Cinética de liberación de polifenoles en FGS para cápsulas secas SS y SCA.

El mismo efecto ha sido observado por otros autores con el agregado de rellenos inertes como bentonita, silicatos, celulosa, entre otros (Gal & Nussinovitch, 2007; Puttipatkhachorn *et al.*, 2005; Rassis *et al.*, 2002; Sultana *et al.*, 2000).

Como los sistemas con quitosano no produjeron ventajas en la modulación para la liberación de los compuestos activos, el análisis

sis de los perfiles de cinéticos para determinar los mecanismos predominantes solamente se realizó con los sistemas control y con relleno de almidón. Para ello se aplicó el modelo de Peppas and Sahlin (1989) (2):

$$\frac{m_t}{m_\infty} = k_d \cdot t^m + k_r \cdot t^{2-m} \quad (\text{ecuación 2})$$

La constante k_d representa la contribución difusional, mientras que el segundo término, k_r , representa la contribución de la relajación del caso II, del modelo de Korsmeyer y Peppas. Los parámetros del modelo fueron calculados mediante el software DDSolver (Murúa-Pagola *et al.*, 2009). El nivel de ajuste de los datos a cada ecuación, se evaluó tomando como referencia los valores R^2 corregido y la distribución de los residuos entre los valores medidos y los estimados en cada caso.

El modelo de Peppas y Sahlin ajustó satisfactoriamente la cinética de liberación de ambos tipos de cápsulas. Se obtuvo una buena distribución de residuos y un valor de R^2 corregido óptimo (tabla 1). Este modelo tiene en cuenta como mecanismos de liberación predominantes un acoplamiento de la difusión y la relajación macromolecular (Peppas & Sahlin, 1989)

Tabla 1
Parámetros cinéticos obtenidos para cápsulas secas

Sistema	Parámetros cinéticos			R^2 corregido	Distribución de residuos
<i>Modelo difusión-relajación (Peppas y Sahlin)</i>					
	k_d	k_r	m		
SS	45,74 ^c	0,60	0,18	0,98	Buena
SCA	23,16	4,91	0,18	0,96	Buena

Si bien, para ambos sistemas se observa una contribución del mecanismo de relajación

a la liberación, este resultó insignificante en relación al aporte difusivo ($k_d \gg k_r$) (tabla 1). Así mismo, el valor de k_d resultó mayor para el sistema simple, indicando una velocidad de liberación mayor como se mencionó anteriormente.

Respecto al comportamiento de cambio de masa en FGS, valores de $\% \Delta W > 0$, corresponden a fenómenos de hinchamiento y $\% \Delta W < 0$ a mecanismos de erosión (Wang *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.

En el caso de los encapsulados obtenidos, el mecanismo predominante durante la inmersión en FGS, fue el hinchamiento (figura 6). Ambos sistemas SS y SCA, aumentaron su masa alrededor de un 150% con respecto al valor inicial en un tiempo de inmersión en FGS de 240 min.

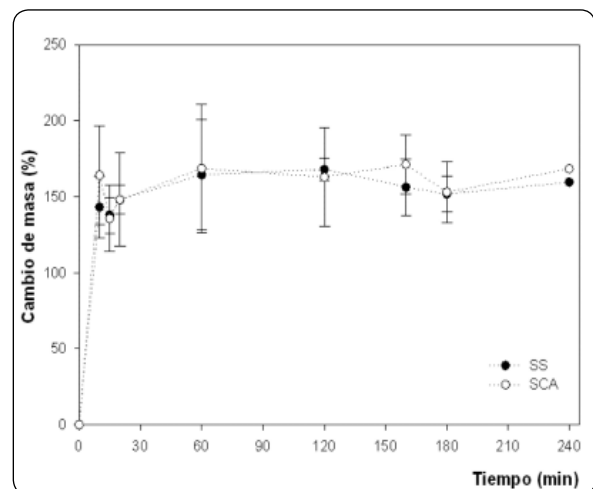


Figura 6. Cinética de hinchamiento de cápsulas secas

El mayor hinchamiento se alcanzó en los primeros tiempos de ensayo (0-10 min). Estos resultados correlacionan con lo observado en el perfil de liberación de los sistemas (figura 5), siendo el porcentaje liberado de PT mayor al 30% en este mismo intervalo de tiempo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los encapsulados desarrollados en este trabajo, necesitan de una hidratación previa para que el compuesto activo comience a difundir hacia el medio. Las cápsulas secas poseen una matriz en estado vítreo ($T_g = 55^\circ\text{C}$), con-

dición en la cual existe muy baja movilidad de las moléculas. Por lo tanto, es necesario la plastificación y/o relajación de las cadenas poliméricas para que el compuesto activo pueda difundir dentro de la matriz (Brazel & Peppas, 2000; Peppas & Khare, 1993).

CONCLUSIONES

Se obtuvieron tres sistemas de encapsulación con base de alginato de calcio. La inmersión de las cápsulas en FGS no modificó el contenido de polifenoles encapsulado. El recubrimiento con quitosano no incrementó la protección obtenida con el sistema control. El agregado de almidón a la matriz de alginato de calcio mejoró la eficiencia de carga de polifenoles de la yerba mate. La incorporación de almidón permitió obtener

matrices menos porosas con respecto a las de alginato de calcio y con recubrimiento de quitosano. Como consecuencia, disminuyó la velocidad de liberación de los polifenoles de yerba mate permitiendo una liberación en forma modulada.

Se comprobó que los mecanismos involucrados fueron la difusión e hinchamiento simultáneos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barba, A. A., d'Amore, M., Chirico, S., Lamberti, G., & Titomanlio, G. (2009). A general code to predict the drug release kinetics from different shaped matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(2-3), 359-368.
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzini, L., Lapasin, R., & Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416-423.
- Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., & Gugliucci, A. (2011). Recent advances on Ilex paraguariensis research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(3), 378-384.
- Brazel, C. S., & Peppas, N. A. (2000). Modeling of drug release from Swellable polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49(1), 47-58.
- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., & Martino, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from Ilex paraguariensis. *Carbohydrate Polymers*, 71(1), 126-134.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
- Gal, A., & Nussinovitch, A. (2007). Hydrocolloid carriers with filler inclusion for diltiazem hydrochloride release. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(1), 168-178.
- George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan: a review. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 1-14.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 330-347.
- Mastromatteo, M., Mastromatteo, M., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 591-598.

- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I., & Martínez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, *91*(3), 380-386.
- Peppas, N. A., & Khare, A. R. (1993). Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *11*(1-2), 1-35.
- Peppas, N. A., & Sahlin, J. J. (1989). A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, *57*(2), 169-172.
- Puttipipatkachorn, S., Pongjanyakul, T., & Priprem, A. (2005). Molecular interaction in alginate beads reinforced with sodium starch glycolate or magnesium aluminum silicate, and their physical characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, *293*(1-2), 51-62.
- Rassis, D. K., Saguy, I. S., & Nussinovitch, A. (2002). Collapse, shrinkage and structural changes in dried alginate gels containing fillers. *Food Hydrocolloids*, *16*(2), 139-151.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radical Research*, *36*(2), 177-187.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, *62*(1-2), 47-55.
- Wang, Q., Hu, X., Du, Y., & Kennedy, J. F. (2010). Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydrate Polymers*, *82*(3), 842-847.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de la Yerba Mate por el financiamiento otorgado en el marco de los subsidios PRASY.