



Physicochemical and thermal characteristics of microencapsulated Fe by electrostatic coacervation

Características fisicoquímicas y térmicas de Fe microencapsulado por coacervación electrostática

Mendoza-Meneses, C.J.¹, Gaytán-Martínez, M.^{2*}, Morales-Sánchez, E.³, Contreras-Padilla M.¹.

¹División de Investigación y Posgrado de la Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las Campanas, s/n. Col. Las Campanas, CP 76010, Santiago de Querétaro, Querétaro, México.

²Posgrado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N. Col. Centro, C.P. 76010 Santiago de Querétaro, Querétaro, México.

³Instituto Politécnico Nacional. CICATA-IPN Unidad Querétaro, Cerro Blanco N° 141, Col. Colinas del Cimatario, Santiago de Querétaro, Querétaro, C.P. 76090, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Mendoza-Meneses, C.J., Gaytán-Martínez, M., Morales-Sánchez, E., Contreras-Padilla M. (2020). Physicochemical and thermal characteristics of microencapsulated Fe by electrostatic coacervation. *Revista Bio Ciencias* 7, e680. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e680>



ABSTRACT

Fe (iron) is one of the micronutrients required by the human body. When Fe is directly added to the food, it can cause sensory changes in flavor and color, causing rejection by consumers. The use of techniques such as coacervation and electrostatics (electrostatic coacervation) to micro encapsulate Fe can be a solution for Fe inclusion in food. The aim of the present work was to microencapsulate Fe in sodium alginate by electrostatic coacervation using calcium chloride as crosslinker material. In a suspension of 1.5 % sodium alginate, FeSO₄ was added at 16 %, 33 % and 50 %. The viscosity of alginate and FeSO₄ suspensions was determined. Results showed a linear increase in viscosity in relation with the FeSO₄ content. The microcapsules were obtained by dripping on a 5.5 %

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: February 6th 2019.

Accepted/Aceptado: March 25th 2020.

Available on line/Publicado: March 27th 2020.

*Corresponding Author:

Gaytán-Martínez, Marcela. Posgrado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N. Col. Centro, C.P. 76010 Santiago de Querétaro, Querétaro, México. E-mail: marcelagaytanmartinez@yahoo.com.mx

RESUMEN

El Fe es uno de los micronutrientes que el cuerpo necesita. Cuando el Fe es adicionado en forma directa en los alimentos puede ocasionar cambios sensoriales, ocasionando rechazo por el consumidor. El uso de técnicas como la coacervación y la electrostática para obtener microcápsulas pueden ser una solución para la incorporación de Fe en alimentos. El objetivo del presente trabajo fue micro encapsular Fe en alginato de sodio por medio de coacervación electrostática usando como material reticulante el cloruro de calcio. En una suspensión de alginato de sodio al 1.5 %, se adicionó FeSO₄ al 16 %, 33 % y 50 %. Se determinó la viscosidad de las suspensiones de alginato y FeSO₄. Los resultados mostraron un aumento lineal en viscosidad respecto con el contenido de FeSO₄. Las microcápsulas fueron obtenidas por goteo sobre una solución reticulante de CaCl₂ al 5.5 % utilizando una bomba de jeringa, a un potencial eléctrico de 6, 7 y 8 KV y una distancia de 10 cm de la jeringa con la solución reticulante. A mayor potencial eléctrico menor diámetro de cápsulas debido a las fuerzas de atracción electrostática. Una vez obtenidas

CaCl₂ crosslinker solution using a syringe pump, at an electric potential of 6, 7 and 8 KV and distance of 10 cm from the syringe with the crosslinker solution. The greater the electric potential, the smaller the diameter of the capsules, due to the electrostatic attraction forces. Once the sodium alginate/Fe microcapsules were obtained, the capsules size, encapsulation efficiency and Fe release kinetics were determined. The results showed that the highest encapsulation efficiency was 66.94 ± 1.11 % using 16 % FeSO₄ at 8 KV. According to SEM micrographies, microcapsules size was 500 ± 100 μm with a spherical and smooth shape. At pH 7, 82.39 ± 0.72 % of Fe were released at 240 min, these values of time and pH could indicate that Fe release would be in the small intestine. The results showed that the technique of electrostatic coacervation has potential to obtain sodium/Fe alginate microcapsules, having application as an additive in food (fortification).

KEY WORDS

Electrostatics, microcapsules, iron, coacervation.

Introduction

Encapsulation is the retention of an active compound called a "core" by a coating material called a "wall" (Ray *et al.*, 2016). The core material must be compatible with the wall material to achieve encapsulation (Nava-Reyna *et al.*, 2015; Costamagna *et al.*, 2017) and the wall material will influence the morphology of the final package (Valenzuela *et al.*, 2013). A widely used wall material within carbohydrates is sodium alginate (SA) (Dias *et al.*, 2017). SA is a polymer formed by a polyanionic linear structure, made up by D-mannuric and L-guluronic acids. The polymer is extracted from algae, non-toxic, biocompatible and biodegradable; it has a good capacity to form gels, spheres, micro and nanoparticles. These characteristics make SA be used as an encapsulating material (Hernández-Gálvez, 2015; Hernández-Torres *et al.*, 2016; Babazadeh *et al.*, 2016).

One encapsulation technique that is widely reported in the literature is coacervation (Nazzaro *et al.*, 2012; Zhao & Wang, 2017). Coacervation is defined as the separation of a soluble colloid into two liquid phases, one of which contains

las microcápsulas de alginato de sodio/Fe se determinó: tamaño de las cápsulas, eficiencia de encapsulamiento y cinética de liberación del Fe. Los resultados mostraron que la mayor eficiencia de encapsulamiento fue de 66.94 ± 1.11 % usando 16 % de FeSO₄ y 8 KV de alto voltaje. De acuerdo a las micrografías de SEM, el tamaño de las microcápsulas fue de 500 ± 100 μm con una forma esférica y no rugosa. A pH de 7 se obtuvo un 82.39 ± 0.72 % de liberación de Fe a los 240 minutos; Estos valores de tiempo y pH podrían indicar que la liberación de Fe sería en el intestino delgado. Los resultados muestran que la técnica de coacervación electrostática tiene potencial para obtener microcápsulas de alginato de sodio/Fe teniendo aplicación como aditivo en alimentos (fortificación).

PALABRAS CLAVE

Electroestática, microcápsulas, hierro, coacervación.

Introducción

La encapsulación es la retención de un compuesto activo llamado "núcleo" por un material de recubrimiento llamado "pared" (Ray *et al.*, 2016). El material del núcleo debe ser compatible con el material de pared para lograr el encapsulamiento. (Nava-Reyna *et al.*, 2015; Costamagna *et al.*, 2017) y el material de pared influirá en la morfología del encapsulado final (Valenzuela *et al.*, 2013). Un material de pared ampliamente usado dentro de los carbohidratos es el alginato de sodio (SA) (Dias *et al.*, 2017). El SA en un polímero formado por una estructura lineal polianiónica, compuesto por ácidos D-manúrico y L-gulurónico. El polímero es extraído de algas, no tóxico, biocompatible y biodegradable; presenta una buena capacidad para formar geles, esferas, micro y nanopartículas. Estas características hacen que el SA sea utilizado como material encapsulante (Hernández-Gálvez, 2015; Hernández-Torres *et al.*, 2016; Babazadeh *et al.*, 2016).

Una técnica de encapsulación que se reporta ampliamente en la literatura es la coacervación (Nazzaro *et al.*, 2012; Zhao & Wang, 2017). La coacervación es definida como la separación de un coloide solvatado en dos fases líquidas, una de las cuales contiene una alta proporción de coloide (capa de coacervado) (Giro-Paloma *et al.*, 2016). Durante la coacervación el núcleo es envuelto por una película fluida

a high proportion of colloid (coacervate layer) (Giro-Paloma *et al.*, 2016). During coacervation the core is wrapped by a fluid and viscous film of the polymer. The fluid film is hardened and solidified to form a hard capsule around the core with the help of a crosslinker solution (CaCl_2) (Dias *et al.*, 2017). One of the advantages of the coacervation technique is its ease of implementation, as well as its low cost, however, a disadvantage is that particles of millimetric and micrometric size are obtained.

Another technique that has allowed the development of micro and nano-sized spherical particles or capsules is electrospinning (Soto-Martinez, 2018). Electrospinning is a technique that uses electrostatic forces to generate microfilaments and macroparticles. Electrospinning is widely used in both industrial processes and scientific research to obtain different products for several applications in the pharmaceutical field, metallurgy, automotive paint, fuel injection, cosmetics and food (Zhang *et al.*, 2013; Bock *et al.*, 2011). Currently, many biopolymers such as lipids, proteins and carbohydrates have been studied by means of electrostatic atomization techniques as electrospinning to produce nanofibers and wall materials for encapsulation processes (Lopez-Rubio *et al.*, 2009) but none of them have reported to use electrospinning and coacervation for producing Fe microcapsules.

Zhu *et al.* (2017), reported electrostatic coacervation as the combination of classical coacervation using sodium alginate/calcium chloride with electrostatics. The aim of joining both techniques is to obtain capsules of micrometric and nanometric size taking advantage of the electrostatic attraction between the core material and the wall material allowing a decrease in the particle size. The result of this combination generates a product in the form of micro-drops or fibers from 1000 μ to 0.5 μ (Soto-Martinez, 2018; Perez-Calderon *et al.*, 2018). Currently, the development of nanofibers has been very successful, due to the different fields in which they can be used, from the textile industry to the biomedical industry. However, in the area of food, few studies have been carried out in this area and are aimed at the use of compounds of natural and edible origin, such as amaranth protein. In the food industry, nanofibers can be very useful for the encapsulation of assets that are sensitive to pH or that interact with food components and reduce their biological activity. In this project, two bacteriocins (pediocin and nisin) were incorporated into amaranth and pullulan nanofibers. Solution properties,

and viscous of the polymer. The fluid film is hardened and solidified to form a capsule around the core with the help of a crosslinker solution (CaCl_2) (Dias *et al.*, 2017). One of the advantages of the technique of coacervation is its ease of implementation, as well as its low cost, however, a disadvantage is that particles of millimetric and micrometric size are obtained.

Another technique that has allowed the development of micro and nano-sized spherical particles or capsules is electrospinning (Soto-Martinez, 2018). Electrospinning is a technique that uses electrostatic forces to generate microfilaments and macroparticles. Electrospinning is widely used in both industrial processes and scientific research to obtain different products for several applications in the pharmaceutical field, metallurgy, automotive paint, fuel injection, cosmetics and food (Zhang *et al.*, 2013; Bock *et al.*, 2011). Currently, many biopolymers such as lipids, proteins and carbohydrates have been studied by means of electrostatic atomization techniques as electrospinning to produce nanofibers and wall materials for encapsulation processes (López-Rubio *et al.*, 2009) but none of them have reported the use of electrospinning and coacervation for the production of microcapsules of Fe.

Zhu *et al.* (2017), reported electrostatic coacervation as the combination of classical coacervation using sodium alginate/calcium chloride with electrostatics. The aim of joining both techniques is to obtain capsules of micrometric and nanometric size taking advantage of the electrostatic attraction between the core material and the wall material allowing a decrease in the particle size. The result of this combination generates a product in the form of micro-drops or fibers from 1000 μ to 0.5 μ (Soto-Martinez, 2018; Pérez-Calderón *et al.*, 2018). Currently, the development of nanofibers has been very successful, due to the different fields in which they can be used, from the textile industry to the biomedical industry. However, in the area of food, few studies have been carried out in this area and are aimed at the use of compounds of natural and edible origin, such as amaranth protein. In the food industry, nanofibers can be very useful for the encapsulation of assets that are sensitive to pH or that interact with food components and reduce their biological activity. In this project, two bacteriocins (pediocin and nisin) were incorporated into amaranth and pullulan nanofibers. Solution properties,

process parameters and some environmental conditions may affect the size and characteristics of the micro-droplets (Wen *et al.*, 2017).

It has been reported that microcapsules increase the absorption and efficiency of the encapsulated product and decrease the sensory perception of the encapsulated material when ingested (Zhao and Wang, 2017; Wu *et al.*, 2016; Appelqvist *et al.*, 2015; Valenzuela *et al.*, 2013). The advantage of the microencapsulation by coacervation (Sodium Alginate/Calcium Chloride) is that it protects the compounds in the nucleus from external factors affecting them, such as light, oxygen, pH and temperature, among others (Zhu, 2017; Dias *et al.*, 2017; Ray *et al.*, 2016; Aditya *et al.*, 2017).

Iron is a micronutrient that is vulnerable to digestive conditions. It is affected by gastric pH, which decreases its activity before reaching the intestine, where it is absorbed (Galán *et al.*, 2014). When encapsulating Fe to be used as an additive for food fortification, it must be taken into account the stomach pH and additionally its release into the small intestine. Fe Encapsulation has been reported using starch as a wall material by spray drying (Duran *et al.*, 2017). On the other hand, Valenzuela *et al.* (2014) reported iron encapsulation, obtained from bovine erythrocytes, using classical coacervation. The authors reported capsules sizes from 830 μm to 1.57 mm and a low encapsulation performance.

Therefore, the objective of this work was to obtain Fe microcapsules by electrostatic coacervation to be used as a food additive. The work was developed in 2 stages: obtaining the suspension of the core material: sodium alginate/ferrous sulfate (SA/FS) in a first stage and obtaining the microcapsules by electrostatic coacervation using calcium chloride as a crosslinker material in a second stage. Once obtained the micro capsules of SA/FS, they were physically and chemically characterized by measuring the particle size by means of SEM, Fe content, encapsulation efficiency, thermal stability, release profile and SA/FS solution viscosity.

Material and Methods

For iron encapsulation, ferrous sulfate (FS) in the form of heptahydrated crystals (CAS 7782-63-0) from Meyer, Química Suastes, S.A. de C.V. was used in different

ambientales pueden afectar el tamaño y las características de las micro-gotas (Wen *et al.*, 2017).

Se ha reportado que las microcápsulas aumentan la absorción y la eficiencia del producto encapsulado, y disminuye la percepción sensorial del material encapsulado cuando es ingerido (Appelqvist *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016; Zhao & Wang, 2017; Valenzuela *et al.*, 2013). La ventaja de la microencapsulación por coacervación Alginato de sodio/cloruro de calcio es que protege los compuestos del núcleo (Zhu, 2017) de factores externos que lo afectan como la luz, oxígeno, pH y temperatura, entre otros (Dias *et al.*, 2017; Ray *et al.*, 2016; Aditya *et al.*, 2017).

El hierro es un micronutriente vulnerable a condiciones digestivas. Es afectado por el pH gástrico, lo que disminuye su actividad antes de llegar al intestino, donde es absorbido (Galán *et al.*, 2014). Al encapsular Fe para ser utilizado como aditivo para la fortificación de alimentos, debe considerarse el pH del estómago y además su liberación en el intestino delgado. Se ha reportado el encapsulamiento de Fe utilizando almidón como material de pared por medio de secado por aspersión (Durán *et al.*, 2017). Por otra parte, Valenzuela *et al.* (2014), reportaron la encapsulación de hierro obtenido de eritrocitos bovinos usando coacervación clásica. Los autores reportan tamaños de cápsulas de 830 μm a 1.57 mm y un bajo rendimiento de encapsulación.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener microcapsulas de Fe por coacervación electrostática para ser utilizadas como aditivo en los alimentos. El trabajo se divide en 2 etapas: Una primera etapa corresponde a obtener la suspensión del material núcleo: Alginato de Sodio/Sulfato Ferroso (SA/FS). Una segunda etapa fue la obtención de las micro capsulas por coacervación electrostática utilizando como material reticulante cloruro de calcio. Una vez obtenidas las micro capsulas de alginato de sodio/Fe se caracterizaron fisicoquímicamente midiendo el tamaño de partícula por medio de SEM, contenido de Fe, eficiencia de encapsulamiento, estabilidad térmica, perfil de liberación y viscosidad de la solución SA/FS.

Material y Métodos

Para la encapsulación de hierro se utilizó sulfato ferroso (FS) en forma de cristales heptahidratados (CAS 7782-63-0) de la marca Meyer, Química Suastes, S.A. de C.V., en diferentes concentraciones; se empleó alginato de sodio (SA)

concentrations; sodium alginate (SA) (CAS 9005-38-3) (SA) was used as the wall material and calcium chloride was used as a crosslinker solution (CAS 10043-52-4) (CaCl_2); both reactive from Deiman S.A. de C.V. (Mexico).

Preparation of Sodium Alginate/Ferrous Sulfate suspension and of the crosslinker solution

Five suspensions were prepared using 1.5 g SA in 60 mL of water. Suspensions were stirred on a magnetic plate (Model SP46925, Barnstead Thermolyne, USA) for 30 minutes at 25 °C, and then they were completed to a final volume of 90 mL. Subsequently, FS was solubilized in 10 mL of water. The solution was mixed with 90 mL of SA suspension to reach the following concentrations: 16, 25, 33, 50 and 75 % wall material. Suspensions were stirred (Model SP46, Barnstead Thermolyne, USA) for 5 min. The crosslinker solution was prepared with a concentration of 1N CaCl_2 .

Viscosity and conductance of SA/FS suspensions.

Viscosity of the SA/FS suspensions (16, 25, 33, 50 and 75 % in relation to the wall material) was determined by using a rheometer (model MCR-101, Anton Parr, Austria) at 25 °C, adapted with a ST24-2D/2v/2v-30 geometry. In addition, conductance was measured, by using a conductivity meter (model PCE-CM 41, PCE Ibérica, Spain) at 25 °C.

Electrostatic coacervation equipment

The electrostatic coacervation equipment was designed and built at CICATA-IPN Campus Querétaro (Figure 1). The equipment consists of a motorized syringe pump, built in the laboratory, where the SA/FS suspension is placed, a 30 G needle connected to the syringe pump through a silicone hose, a high voltage source variable from 1 to 30 KV to generate electrostatic attraction forces (model 30A24-P30, Ultravolt, USA), 1 to 12 VDC variable low voltage source (LM317) for syringe pump control, a magnetic stirrer (model PC-320, CORNING, USA) with a 250 mL beaker for the CaCl_2 solution. The high voltage positive end was connected to the 30G needle and the high voltage negative end was placed under the beaker as shown in Figure 1.

Obtaining microcapsules through electrostatic coacervation process

SA/FS suspensions were placed in a 10 mL

como material de pared (CAS 9005-38-3), y como material reticulante se usó cloruro de calcio (CaCl_2) (CAS 10043-52-4) ambos de la marca Deiman S.A. de C.V. (México).

Preparación de la suspensión de alginato con sulfato ferroso y reticulante

Se prepararon cinco suspensiones usando 1.5 g de SA en 60 mL de agua. Las suspensiones se agitaron en una placa magnéticamente (Modelo SP46925, Barnstead Thermolyne, USA) por 30 minutos a 25 °C, posteriormente se aforó a 90 mL. Posteriormente, el FS fue solubilizado en 10 mL de agua. La solución se mezcló con 90 mL de la suspensión de SA para tener las siguientes concentraciones: 16, 25, 33, 50 y 75 % de material de pared. Las suspensiones se agitaron (Modelo SP46, Barnstead Thermolyne, USA) por 5 min. Se preparó la solución reticulante con una concentración de 1N de CaCl_2 .

Viscosidad y conductancia de suspensiones de SA/FS

Se determinó la viscosidad de las suspensiones de SA/FS (16, 25, 33, 50 y 75 % con respecto al material de pared), usando un reómetro (modelo MCR-101, Anton Parr, Austria) a 25 °C, adaptado con una geometría ST24-2D/2v/2v-30. Además, se midió la conductancia, mediante un conductímetro (modelo PCE-CM 41, PCE Ibérica, España) a 25 °C.

Equipo de coacervación electrostática

El equipo de coacervación electrostática fue diseñado y construido en el CICATA-IPN Unidad Querétaro (Figura 1). El equipo consta de una bomba de jeringa motorizada construida en laboratorio donde se coloca la suspensión de SA/FS, una aguja de 30 G conectada a la bomba de jeringa por medio de manguera de silicón, una fuente de alto voltaje variable de 1 a 30 KV para generar las fuerzas de atracción electrostática (modelo 30A24-P30, Ultravolt, USA), fuente de bajo voltaje variable de 1 a 12 VDC (LM317) para control de la bomba de jeringa, un agitador magnético (modelo PC-320, CORNING, USA) con un vaso de precipitado de 250 mL para la solución de CaCl_2 . Se conectó el positivo del alto voltaje en la aguja de 30G y el negativo del alto voltaje se colocó debajo del vaso de precipitado, como se muestra en la Figura 1.

Obtención de microcápsulas mediante el proceso de coacervación electrostática

Las suspensiones de SA/FS se colocaron en jeringa de 10 mL con una aguja de 30 G, la cual se acoplo en el equipo de coacervación electrostática (Figura 1).

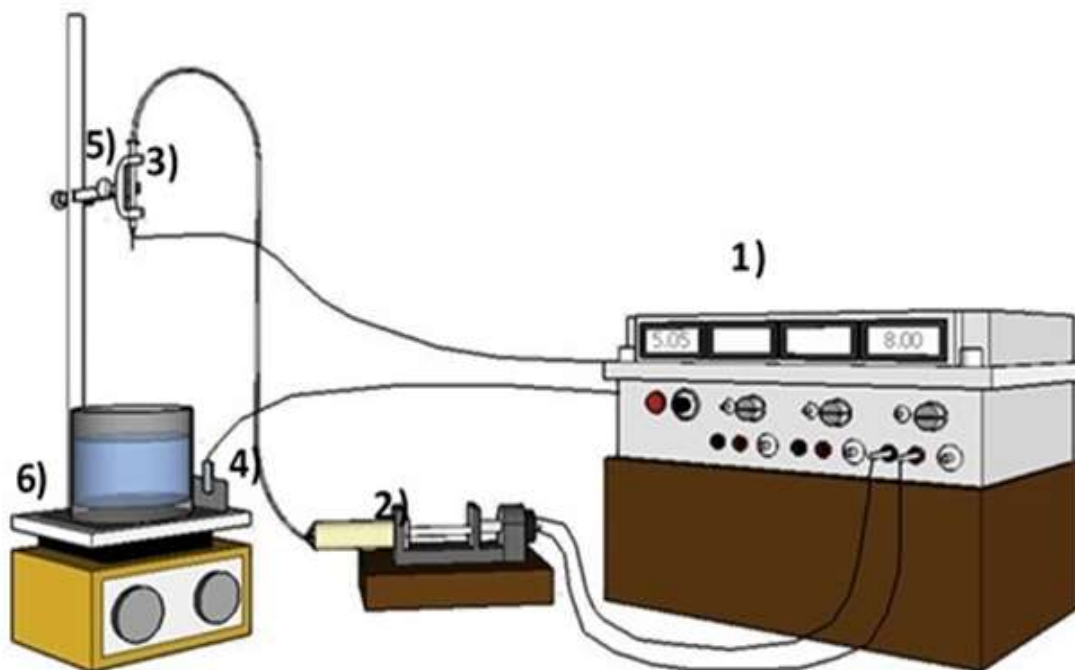


Figure 1. Electrostatic coacervation equipment to obtain SA/FS microcapsules.

1) Control panel: motor and high voltage control 2) Syringe pump 3) 1mL syringe with 30 G needle 4) Common electrode 5) High voltage electrode positioned on syringe needle 6) CaCl_2 crosslinker solution.

Figura 1. Equipo de coacervación electrostática para obtener microcápsulas de SA/FS.

1) Panel de control: motores y alto voltaje. 2) Bomba de jeringa. 3) Jeringa de 1mL con aguja de 30 G. 4) Electrodo común. 5) Electrodo de alto voltaje posicionado en la aguja de la jeringa. 6) Suspensión reticulante de CaCl_2 .

syringe with a 30 G needle, which was attached to the electrostatic coacervation equipment (Figure 1). The variables assessed for obtaining microcapsules were: high voltage, forward flow rate and distance between electrodes. The SA/FS suspension was deposited in a syringe, and by means of a syringe pump, drops were formed, forming capsules by coacervation with sodium alginate when falling into CaCl_2 . The flow rate ranged from 0.01 mL/min to 0.02 mL/min. The high voltage was connected to the needle, polarizing the SA/FS solution and, by electrostatic attraction forces, smaller drops were formed that fell into the crosslinker solution (CaCl_2) in constant agitation and at a distance of 10 cm (Figure 1). The microcapsules formed by electrostatic coacervation were filtered and rinsed with water to remove excess CaCl_2 . The microcapsules of each treatment were stored in 50 mL glass bottles in refrigeration and protected from light until analysis.

Las variables evaluadas fueron: alto voltaje, velocidad del flujo de avance y de la distancia entre electrodos sobre la obtención de microcápsulas. La suspensión de SA/FS se depositó en una jeringa, y con la ayuda de una bomba de jeringa se formaron gotas que al caer al CaCl_2 formaron cápsulas por coacervación con el alginato. La velocidad de flujo vario entre 0.01 mL/min hasta 0.02 mL/min. Se conectó el alto voltaje en la aguja polarizando la solución de SA/FS y por fuerzas electrostáticas de atracción se formaron gotas de menor que cayeron en la solución reticulante (CaCl_2) en agitación continua a una distancia de 10 cm (Figura 1). Las microcápsulas formadas por coacervación electrostática se filtraron y enjuagaron con agua para eliminar el exceso de CaCl_2 . Las microcápsulas de cada tratamiento se almacenaron en frascos de vidrio de 50 mL en refrigeración y protegidas de la luz, hasta su análisis.

Characterization of SA/FS microcapsules Iron content and encapsulation efficiency

The iron content in the microcapsules was determined by using the volumetric technique using 1N potassium permanganate (Verde *et al.*, 2013). 2 mg of microcapsules, 3 mL of distilled water and 1 mL of 10 % diluted sulfuric acid were placed and then stirred for 2 min. To determine the encapsulation efficiency, the following formula was applied, where Fe_t is the total added iron and Fe_s is the iron contained in the microcapsules (Equation 1).

$$\%EE = \frac{Fet - Fes}{Fet} \times 100$$

Size and morphology of the microcapsule

For the study of the morphology of the microcapsule, a Phenom Pro environmental scanning electron microscope (Desktop SEM, Eindhoven, The Netherlands) was used, which was conditioned to work in a low-vacuum module, with the electron beam adjusted to 5 kV. Pictures were taken at 150X and 500X. To determine the size, a digital optical microscope with 2MP sensor was used in a range of 300X - 1000X in magnification. Sixty microcapsules per treatment were evaluated, showing the average size \pm standard deviation. This test was performed in triplicate.

Microcapsule thermal stability

Thermal stability was analyzed in a Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter (model DSC-1, Switzerland), 3 g of sample were weighed in a 40 μ L aluminum crucible, which was sealed by mechanical pressure (ME-00119410 model). The sample was left to stand for 15 minutes. Subsequently, an isotherm was performed from 30 to 240 $^{\circ}$ C with a heating rate of 10 $^{\circ}$ C/min. An empty crucible was used as a reference. The temperature stability and the degradation enthalpy were reported. The measurements were made in duplicate. The measurement was reported \pm standard deviation.

Microcapsule release profile

The release profile was evaluated by placing 12 grams of microcapsule in buffer solution at pH 2, 4 and 7.4 at 37 $^{\circ}$ C for 4 hours. The amount of iron released was analyzed every 10 minutes for the first 60 minutes, then measured every 30 minutes. The amount of iron

Caracterización de las microcápsulas de SA/FS Contenido de hierro y eficiencia de encapsulamiento

El contenido de hierro en las microcápsulas se determinó empleando la técnica de volumetría usando permanganato de potasio al 1N (Verde *et al.*, 2013). Se colocaron 2 mg de microcápsulas, 3 mL de agua destilada y 1 mL de ácido sulfúrico diluido al 10 %, posteriormente se agitaron por 2 min. Para determinar la eficiencia de encapsulamiento se aplicó la siguiente fórmula, donde Fe_t es el hierro total agregado y Fe_s es el hierro contenido en las microcápsulas (Ecuación 1).

$$\%EE = \frac{Fet - Fes}{Fet} \times 100$$

Tamaño y morfología de la microcápsula

Para el estudio de la morfología de la microcápsula, se utilizó un microscopio electrónico de barrido ambiental Phenom Pro (Desktop SEM, Eindhoven, Países Bajos) que se acondicionó para trabajar en módulo de bajo vacío, con el haz de electrones ajustado a 5 kV. Las imágenes se tomaron a 150X y 500X. Para determinar el tamaño se empleó un microscopio óptico modelo digital con sensor 2 MP en un rango de 300x – 1000X en magnificación. Se evaluaron 60 microcápsulas por tratamiento, mostrando el tamaño promedio \pm desviación estándar. Esta prueba se realizó por triplicado.

Estabilidad térmica de la microcápsula

La estabilidad térmica se analizó en un calorímetro diferencial de barrido Marca Mettler Toledo (modelo DSC-1, Switzerland), se pesaron 3 g de muestra en un crisol de aluminio de 40 μ L sellado mediante presión mecánica (modelo ME-00119410). La muestra se dejó reposar por 15 minutos. Posteriormente se realizó un isoterma de 30 a 240 $^{\circ}$ C a una razón de calentamiento de 10 $^{\circ}$ C/min. Se empleó un crisol vacío como referencia. Se reporta la temperatura de estabilidad y la entalpía de degradación. Las mediciones se realizaron por duplicado. Se reporta la medición \pm desviación estándar.

Perfil de liberación de la microcápsula

El perfil de liberación se evaluó colocando 12 gramos de microcápsula en una solución buffer a pH 2, 4 y 7.4 a una temperatura de 37 $^{\circ}$ C durante 4 horas. Se analizó la cantidad de hierro liberado, cada 10 minutos los primeros 60 minutos, posteriormente se midieron cada 30 min. La cantidad de hierro fue analizada por titulación

was analyzed by volumetric titration (Cendejas & Ortega, 2017). The release percentage at a given time was reported. The test was performed in triplicate.

Statistical analysis

A randomized analysis was performed with a 3^3 factorial arrangement. The variables analyzed were the SA/FS ratio, the feed flow and the applied potential. Results were reported as mean \pm standard deviation. Statistical analysis of the tests was performed by using an ANOVA and comparison of means by using Tukey's test ($p < 0.05$) by using MINITAB 17.

Results and discussion

Characterization of SA/FS suspension

Figure 2 showed viscosity and electrical conductivity values of SA suspensions added with FS (SA/FS). The viscosity of the suspensions was between 224 ± 4.37 mPa·s (16 % FS ratio) up to 1227 ± 11.01

por volumetría (Cendejas & Ortega, 2017). Se reporta el porcentaje de liberación a un determinado tiempo. La prueba se realizó por triplicado.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis aleatorio con un arreglo factorial 3^3 . Las variables analizadas fueron la relación de SA/FS, el flujo de alimentación y el potencial aplicado. Los resultados se reportan con la media \pm la desviación estándar. El análisis estadístico de las pruebas se empleó ANOVA y comparación de medias empleando la prueba de Tukey ($p < 0.05$) utilizando MINITAB 17.

Resultados y discusión

Caracterización de la suspensión de SA/FS

La Figura 2, muestra los valores de viscosidad y conductividad eléctrica de las suspensiones de SA adicionadas con FS (SA/FS). La viscosidad de las suspensiones estuvo entre 224 ± 4.37 mPa·s (relación 16 % de FS) hasta 1227 ± 11.01 mPa·s (relación 75 % de FS). Estos resultados están asociados con el peso molecular del

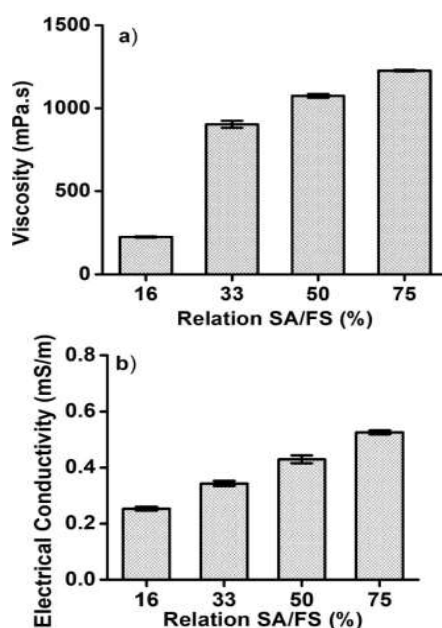


Figure 2. Viscosity (a) and electrical conductivity (b) of sodium alginate and ferrous sulphate suspensions.

Figura 2. Viscosidad (a) y conductividad eléctrica (b) de las suspensiones de alginato de sodio y sulfato ferroso.

mPa•s (75 % FS ratio). These results were associated with SA molecular weight which influences directly on viscosity (Avendaño-Romero, 2013).

The interaction of SA with FS showed a significant effect on the viscosity of the suspensions ($p < 0.05$). In Figure 2 (a), it is shown that as FS concentration increases, the viscosity increases. Soto-Martínez (2018) reported that the viscosity of the suspensions used is a determining factor in the formation of the microcapsules when the electrostatic technique is employed. The authors reported that at viscosity less than 800 cP, it was possible to generate droplets, which favored the formation of microcapsules. The concentration of 16 % of ferrous sulphate was the solution with the lowest viscosity and the one that allowed the best droplets formation and, consequently, the highest encapsulation efficiency.

Another determining factor for the electrostatic technique is the electrical conductivity. Figure 2(b) showed the conductivity as a function of FS concentration. The values obtained for conductivity were between 0.299 mS/m (16 % ferrous sulphate ratio) up to 0.581 mS/m (75 % ferrous sulphate ratio). The polysaccharides are not good conductors of electricity and the concentration of alginate was constant, so the change in conductivity was attributed to FS. Colín-Orozco *et al.* (2013) reported that conductivity is influenced by the type of solvent, the material dissolved and the availability of free ions, the latter two being associated with FS content. This coincides with the results where the increase in electrical conductivity is proportional to the increase in the amount of added iron, since FS is a salt that dissociates in water. Perez-Calderon *et al.* (2018), reported that water has 0.04 mS/m up to 0.2 mS/m, on the other hand, Quintero *et al.* (2018) reported values of 2 % chitosan-based solutions with an electrical conductivity of 0.214×10^{-3} mS/m. The 16 % FS suspension presented a conductivity of 0.299 mS/m, these conductivity values were higher than those reported due to the addition of FS. The latter is due to the fact that salts are dissociated in aqueous solutions causing greater conductivity.

Iron content and percentage of encapsulation efficiency

In Table 1, the effect of the variables of the electrostatic coacervation process on the formation of the microcapsules was shown. High voltage and feed

SA que influye directamente en la viscosidad (Avendaño-Romero, 2013).

La interacción de SA con FS mostró un efecto significativo sobre la viscosidad de las suspensiones ($p < 0.05$). En la Figura 2 (a), se puede observar que conforme aumenta la concentración de FS se incrementa la viscosidad. Soto-Martínez (2018), reportaron que la viscosidad de las suspensiones usadas es un factor determinante en la formación de las microcápsulas cuando se emplea la técnica de electrostática. Los autores reportan que a viscosidad menores de 800 cP es posible generar gotas, lo que favorece la formación de las microcápsulas. La concentración de 16 % de FS fue la solución de menor viscosidad y la que permitió la mejor formación de gotas y, en consecuencia, la de mayor eficiencia de encapsulamiento.

Otro factor determinante para la técnica de electrostática es la conductividad eléctrica. En la Figura 2(b), se muestra la conductividad en función de la concentración de FS. Los valores obtenidos de conductividad estuvieron entre 0.299 mS/m (relación de 16 % de FS) hasta 0.581 mS/m (relación de 75 % de FS). Los polisacáridos no son buenos conductores de electricidad aunado a que la concentración de alginato fue constante por lo que el cambio de conductividad es atribuido al FS. Colín-Orozco *et al.* (2013) reportan que la conductividad está influenciada por el tipo de solvente, el material disuelto y la disponibilidad de iones libres, estos últimos asociados con el contenido de FS. Lo anterior coincide con los resultados en donde el aumento en la conductividad eléctrica es proporcional al incremento en la cantidad de hierro añadida, ya que el FS es una sal que se disocia en agua. Pérez-Calderón *et al.* (2018), reportó que el agua tiene 0.04 mS/m hasta 0.2 mS/m, por otra parte, Quintero *et al.* (2018) reportaron valores de soluciones a base de quitosano al 2 % con conductividad eléctrica de 0.214×10^{-3} mS/m. La suspensión del 16 % de FS presentó una conductividad de 0.299 mS/m, estos valores de conductividad son mayores que los reportadas debido a la adición del FS. Lo anterior se debe a que las sales se disocian en soluciones acuosas ocasionando mayor conductividad.

Contenido de hierro y porcentaje en eficiencia de encapsulamiento

En la Tabla 1, se muestra el efecto de las variables del proceso de coacervación electroestática en la formación de las microcápsulas. El alto voltaje y el flujo de alimentación no tuvieron efecto significativo en la formación de las microcápsulas mientras que la relación SA/FS influyó significativamente.

Los resultados obtenidos muestran que cuando la concentración de FS es menor (16 %), la eficiencia de

Table 1.
Encapsulation efficiency and size of iron microcapsules obtained by electrostatic coacervation

Tabla 1.
Eficiencia de encapsulamiento y tamaño de microcápsulas de hierro obtenidas por coacervación electroestática

Sample	SA-FS suspension (%)	Flow (mL/min)	Voltage (KV)	Iron content (mg)	Encapsulation efficiency (%)	Tamaño de partícula (µm)
1	16	0.012	6	164.06 ± 1.82 ^c	65.73 ± 0.73 ^a	847.60 ± 57.80 ^a
2	16	0.014	6	162.24 ± 1.82 ^c	65.00 ± 0.73 ^a	643.95 ± 46.65 ^{c,d,e}
3	16	0.016	6	165.28 ± 1.05 ^c	66.22 ± 0.42 ^a	455.80 ± 25.71 ^{g,h,i,j}
4	16	0.012	7	166.49 ± 2.78 ^c	66.46 ± 0.73 ^a	842.95 ± 45.03 ^{a,b}
5	16	0.014	7	164.67 ± 1.05 ^c	65.97 ± 0.42 ^a	482.50 ± 32.19 ^{e,f,g,h,i,j}
6	16	0.016	7	164.06 ± 4.82 ^c	65.73 ± 1.93 ^a	365.10 ± 35.16 ^l
7	16	0.012	8	167.71 ± 3.16 ^c	66.94 ± 1.11 ^a	632.30 ± 29.14 ^{c,d,e,f}
8	16	0.014	8	161.02 ± 1.05 ^c	64.51 ± 0.42 ^a	545.95 ± 28.35 ^{d,e,f,g,h,i}
9	16	0.016	8	162.85 ± 2.10 ^c	65.24 ± 0.84 ^a	456.15 ± 29.79 ^{g,h,i,j}
10	33	0.012	6	329.94 ± 1.82 ^b	65.73 ± 0.36 ^a	676.25 ± 32.70 ^{b,c,d}
11	33	0.014	6	330.55 ± 2.10 ^b	65.85 ± 0.42 ^a	538.40 ± 46.68 ^{d,e,f,g,h,i}
12	33	0.016	6	328.12 ± 4.82 ^b	65.36±0.96 ^a	454.40 ± 27.87 ^{g,h,i,j}
13	33	0.012	7	330.55 ± 1.05 ^b	65.50±0.21 ^a	646.30 ± 13.37 ^{c,d,e}
14	33	0.014	7	328.12 ± 1.82 ^b	65.36 ± 0.36 ^a	576.55 ± 14.83 ^{c,d,e,f,g,h}
15	33	0.016	7	328.12 ± 1.82 ^b	65.36 ± 0.36 ^a	462.15 ± 21.70 ^{f,g,h,i,j}
16	33	0.012	8	326.91 ± 1.05 ^b	65.12 ± 0.21 ^a	615.10 ± 22.52 ^{c,d,e,f,g}
17	33	0.014	8	328.73 ± 2.78 ^b	65.61 ± 0.56 ^a	585.85 ± 21.71 ^{c,d,e,f,g}
18	33	0.016	8	328.73 ± 1.05 ^b	65.73 ± 0.36 ^a	409.65 ± 14.66 ^{h,i,j}
19	50	0.012	6	449.65 ± 1.05 ^b	59.82 ± 0.14 ^b	717.60 ± 18.55 ^{a,b,c}
20	50	0.014	6	452.08 ± 0.00 ^a	60.14 ± 0.00 ^b	655.30 ± 20.81 ^{c,d}
21	50	0.016	6	447.82 ± 2.78 ^a	59.57 ± 0.37 ^b	517.40 ± 18.86 ^{d,e,f,g,h,i,j}
22	50	0.012	7	449.04 ± 1.05 ^a	59.73 ± 0.14 ^b	662.45 ± 21.65 ^{c,d}
23	50	0.014	7	450.86 ± 1.05 ^a	59.98 ± 0.02 ^b	557.90 ± 25.28 ^{c,d,e,f,g,h}
24	50	0.016	7	450.26 ± 1.82 ^a	59.90 ± 0.24 ^b	455.50 ± 23.16 ^{g,h,i,j}
25	50	0.012	8	449.04 ± 1.05 ^a	59.73 ± 0.02 ^b	508.75 ± 20.80 ^{d,e,f,g,h,i,j}
26	50	0.014	8	449.04 ± 1.05 ^a	59.73 ± 0.02 ^b	468.25 ± 23.04 ^{e,f,g,h,i,j}
27	50	0.016	8	448.43 ± 1.82 ^a	59.49 ± 0.37 ^b	381.45 ± 19.17 ^j

SA: sodium alginate, FS: ferrous sulphate. Averages with different letters in the same column indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

SA: alginato de sodio, FS: sulfato ferroso. Medias con letra diferente en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

flow had no significant effect on microcapsules formation while the SA/FS ratio had a significant influence.

The results obtained showed that when FS concentration was lower (16 %), the encapsulation efficiency (EE) was higher. The EE was between 59.49 ± 0.37 % (50 % of FS)

encapsulamiento (EE) es mayor. La EE, estuvo entre 59.49 ± 0.37 % (50 % de FS) y 66.94 ± 1.11 % (16 % de FS) (Tabla 1). Estudios previos sobre el efecto de la concentración de FS sobre la EE son variados. Valenzuela *et al.* (2014) reportó valores de 59.5 % a 75.7 % EE usando hierro hémico obtenido a partir de eritrocitos.

and 66.94 ± 1.11 % (16 % of FS) (Table 1). There are varied previous studies on the effect of FS concentration on EE. Valenzuela *et al.* (2014) reported values of 59.5 % to 75.7 % EE using hemic iron obtained from erythrocytes.

On the other hand, Table 1 showed that as FS concentration increased, the EE decreased and the iron content increased, that is, the retention capacity decreased, which indicated that the salt is found inside the alginate microparticle as well as it could be adhered to its surface. Another reason why EE decreased as the SA/FS ratio increased may be associated with a disproportionate amount of wall material, which generated material incrustations that made EE decrease (Cuatzo, 2010), and increasing viscosity, which interfered with drop formation. Iron III salts are reported in the literature to have up to 80 % EE, however, they are less bioavailable for the body (Duran *et al.*, 2017).

Microcapsule size and morphology

The size of the microcapsules obtained was shown in Table 1. The conditions of the electrostatic potential, the

Por otro lado, en la Tabla 1 muestra que al aumentar la concentración de FS disminuyó la EE y aumento el contenido de hierro, es decir, la capacidad de retención disminuyó lo que indican que la sal se encuentra al interior de la micropartícula de alginato así como también podría estar adherida a su superficie. Otra razón por la que la EE, disminuye a medida que la relación de AS/FS se incrementa, puede estar asociada con una desproporción del material de pared, lo que genera incrustaciones de material que hacen que disminuya la EE (Cuatzo, 2010), e incrementando la viscosidad, lo cual interfiere con la formación de la gota. En la literatura se reporta que las sales de hierro III tienen hasta un 80 % de EE, sin embargo, son menos biodisponibles para el organismo (Durán *et al.*, 2017).

Tamaño y morfología de la microcápsula

El tamaño de la microcápsulas obtenidas se muestra en la Tabla 1. Las condiciones del potencial electrostático, la relación de SA/FS tuvieron efecto significativo en este parámetro. Lo anterior puede estar relacionado debido a que, a mayor contenido de hierro,

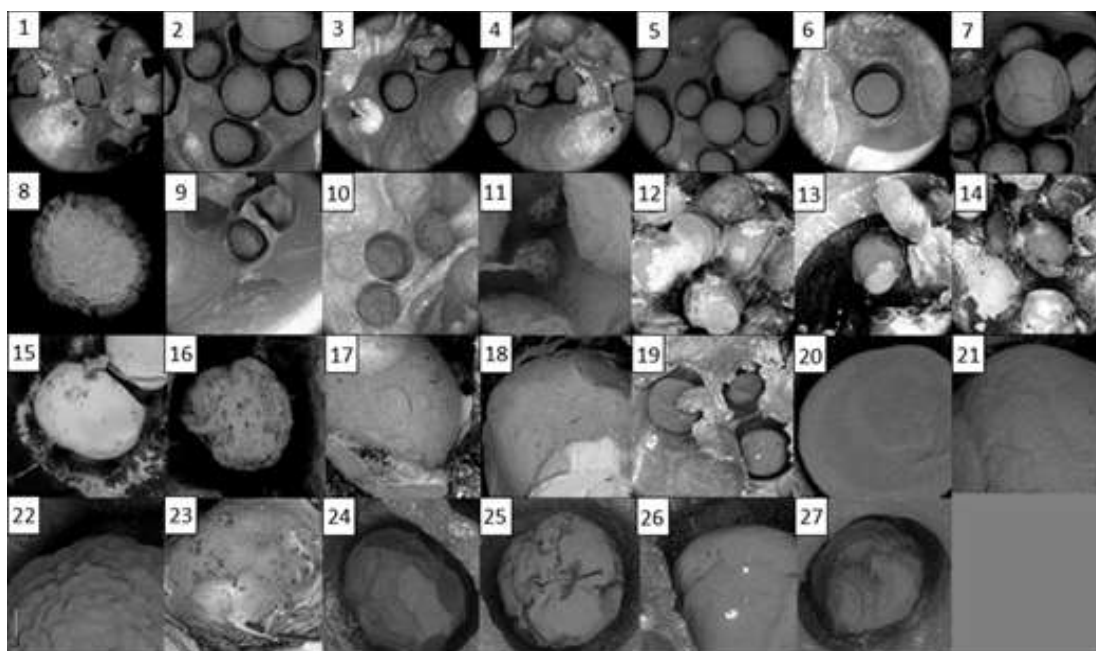


Figure 3. Micrographs of electrostatic coacervation microcapsule

Figura 3. Micrografías de las microcápsulas obtenidas por coacervación electrostática

SA/FS ratio had a significant effect on this parameter. This may be related to the fact that the higher the iron content, the higher the viscosity, due to the high content of iron salts, making the formation of the microcapsules more difficult.

The morphology of the iron microcapsules obtained by electrostatic coacervation was presented in Figure 3. The microcapsules had a spherical shape and their sizes ranged between 350 and 850 μm , being lower values than those reported in the literature for capsules obtained by coacervation (Valenzuela *et al.*, 2014). Microcapsules were observed to not have a spherical shape, but with similar sizes. Samples 11, 14, 18 and 23 showed a typical effect of electro spinning, which was the incorporation of monofilaments adhered to the microcapsule (Figure 3). Other treatments showed a rough appearance on the surface of the microcapsule (Figure 3, samples 1, 8, 9, 22, 24 and 27), this may be due to the combination of the feed flow and the electrical potential applied. While in treatments 10, 16, 25 and 26 (Figure 3), cracks were present. Menger *et al.* (1998) indicated that ionic electrostatic bonds can form positive to negative aggregates in the formation of coacervations, appearing as deformations, which can be accentuated by the potential applied.

Treatments 19, 20 and 21 (Figure 3) showed a smooth surface appearance, possibly due to the difference of electrical potential. Treatments 2, 3, 4, 5 and 6 (Figure 3), which contained 16 % FS, were spherical and with a uniform appearance.

Valenzuela *et al.* (2014), reported capsules from 830 μm to 1.57 mm, using Dehydrated Bovine Erythrocytes (EBDA) as a source of iron using classical coacervation. Durán *et al.* (2017) reported that iron encapsulation using spray drying generated particle sizes between 200 and 600 μm , smaller than those found in the present work. However, the technique used by the authors can oxidize iron, which would affect its bioavailability in the organism.

Processing conditions of 16 % FS with a voltage of 8 KW and a flow rate of 0.012 mL/min were the ones that allowed to obtain the highest encapsulation efficiency (66.94 ± 1.11), besides, with a spherical appearance, uniform with a size of $632.30 \pm 29.14 \mu$. Therefore, this treatment was selected for thermal stability tests and to determine the release profile of the encapsulated compound.

umenta la viscosidad por el alto contenido de sales de hierro dificultando la formación de las microcápsulas.

La morfología de las microcápsulas de hierro obtenidas por coacervación electrostática se presenta en la Figura 3. Las microcápsulas presentan una forma esférica y sus tamaños fluctuaron entre los 350 a 850 μm , valores más bajos que lo reportado en la literatura para cápsulas obtenidas por coacervación (Valenzuela *et al.*, 2014). Se observaron microcápsulas que no presentan forma esférica, pero con tamaños similares. En las muestra 11-14, 18 y 23, se presentó un efecto propio del electro spinning el cual es la incorporación de monofilamentos adheridos a la micro capsula. (Figura 3). Otros tratamientos mostraron una apariencia rugosa en la superficie de la microcápsula (Figura 3, muestra 1, 8, 9, 22, 24 y 27), esto se puede deber a la combinación del flujo de alimentación y el potencial aplicado. Mientras que en los tratamientos 10, 16, 25 y 26 (Figura 3) se presentaron fisuras. Menger *et al.* (1998) indican que la unión electrostática de los iones puede formar agregados de positivo a negativo en la formación de coacervado, manifestándose en deformación, lo cual se puede acentuar por el potencial aplicado.

Los tratamientos 19, 20 y 21 (Figura 3) presentaron una apariencia lisa en la superficie, posiblemente debido a la diferencia de potencial eléctrico. Los tratamientos 2, 3, 4, 5 y 6 (Figura 3), que contienen un 16 % de FS fueron esféricos y con apariencia uniforme.

Valenzuela *et al.* (2014), reportaron cápsulas de 830 μm a 1.57 mm, usando como fuente de hierro Eritrocitos bovinos deshidratados (EBDA) usando coacervación clásica. Durán *et al.* (2017) reportan que la encapsulación de hierro usando secado por aspersion genera tamaños de partícula entre 200 a 600 μm , menores a los encontrados en el presente trabajo. Sin embargo, la técnica usada por los autores puede oxidar el hierro lo que afectaría su biodisponibilidad en el organismo.

Las condiciones de procesamiento de 16 % de FS con un voltaje de 8 KW y un flujo de 0.012 mL/min fueron las que permitieron obtener la mayor eficiencia de encapsulamiento (66.94 ± 1.11) además, con apariencia esférica, uniforme con un tamaño de $632.30 \pm 29.14 \mu$. Por lo tanto, este tratamiento fue seleccionado para pruebas de estabilidad térmica y determinar el perfil de liberación del compuesto encapsulado.

Estabilidad térmica de la microcápsula

Para comparar la estabilidad térmica que ofrece la

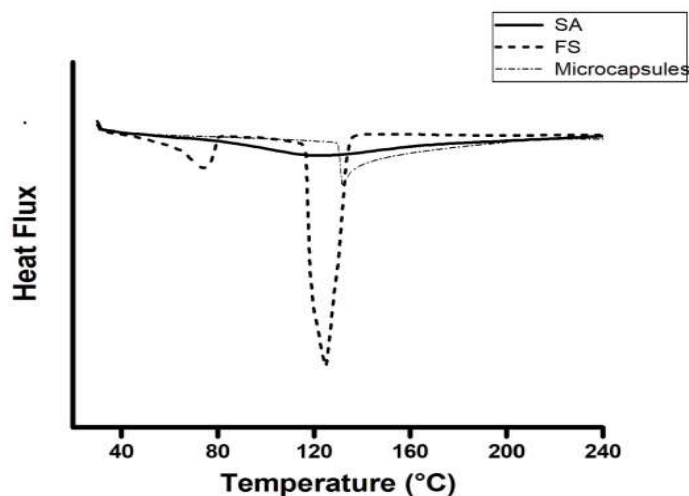


Figure 4. Thermal stability of ferrous sulphate (FS), microcapsules of sodium alginate (SA) and microcapsules of SA/FS.
Figura 4. Estabilidad térmica de sulfato ferroso (FS), microcápsulas de alginato de sodio (SA) y microcápsulas de SA/FS.

Thermal stability of the microcapsule

To compare the thermal stability offered by the microcapsule to the iron, free FS, a microcapsule with iron and without iron were used, both obtained with a feed flow of 0.12 mL/min and an applied voltage of 8 kw to 10 (Figure 4). The FS showed two endotherms, one between 66 °C and 80 °C, and the other at 117 °C – 131 °C (Figure 4), the first corresponding to instability (72 °C), which affected its functionality.

SA/FS microcapsules obtained by electrostatic coacervation showed an endotherm between 130 °C and 141 °C. These results showed that the wall material (Alginate) offers a thermal protection to the encapsulated material (Ferrous sulphate). Rodríguez-Llimós *et al.* (2003) reported that SA as a wall material provides thermal stability to the encapsulated materials, when encapsulating paracetamol.

Fe release profile of SA/FS microcapsules

The mechanism of controlled release of FS was evaluated at pH 2.0, 4 and 7.2 (Figure 5). A slower release of FS was observed from coacervates at pH 2 compared to coacervates at pH 4 and 7 ($p \leq 0.05$) (Figure 5). Barros *et al.* (2016) reported that this same combination, by passing the microcapsules from an acidic medium to a basic medium, showed an improvement in the release of the compound.

microcápsula al hierro se usó el FS libre, la microcápsula con hierro y sin hierro ambas obtenidas con flujo de alimentación de 0.12 mL/min y un voltaje aplicado de 8 kw a 10 (Figura 4). El FS mostró dos endotermas, una entre los 66 °C y 80 °C, y la otra a 117 °C-131 °C (Figura 4), el primero corresponde a la inestabilidad (72 °C), lo que afecta su funcionalidad.

Las microcápsulas de SA/FS obtenidas por coacervación electrostática presentaron un endoterma entre los 130 °C y 141 °C. Estos resultados demuestran que el material de pared (Alginato) ofrece una protección térmica al material encapsulado (FS). Rodríguez-Llimos *et al.* (2003) reportaron que el SA como material de pared brinda estabilidad térmica a los materiales encapsulados, al encapsular paracetamol.

Perfil de liberación de Fe de microcápsulas de SA/FS

Se evaluó el mecanismo de liberación controlada del FS a pH 2.0, 4 y 7.2 (Figura 5). Se observó una liberación más lenta de FS de los coacervados a pH 2 en comparación con los coacervados sometidos a pH 4 y 7 ($p \leq 0.05$) (Figura 5). Barros *et al.* (2016) reportaron que esta misma combinación, haciendo pasar las microcápsulas de un medio ácido a uno básico, mostró una mejora en la liberación del compuesto.

Las microcápsulas que se sometieron a pH 7.4 presentó el efecto estallido (Gran porcentaje de material liberado en corto

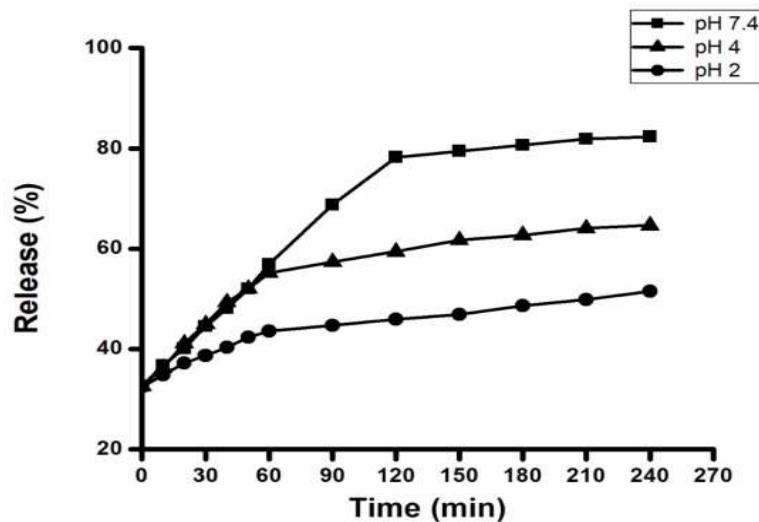


Figure 5. Iron release profile of SA/ FS microcapsules at different pH.

Figura 5. Perfil de liberación de hierro de microcápsula de SA/FS a diferentes pH.

The microcapsules that were subjected to pH 7.4 showed a burst effect (large percentage of material released in a short time) in the second hour, followed by a gradual release in the rest of the time ($p \leq 0.05$) (Figure 5). The release at pH 4 and 7 did not present significant differences until 60 min of exposure to pH. However, at 240 min it was 82.39 ± 0.72 % at pH 7.4, followed by pH 4 with 64.37 ± 0.28 % and at pH 2 the release was 21.52 ± 1.68 %.

Sankalia *et al.* (2005) described very short times of release, for SA capsules when encapsulating papain. The authors released 100 % of its content in 60 minutes of *in vitro* incubation in simulated intestinal solution at pH 6.8; discussing this fact as a consequence of an increase in the affinity between Ca^{2+} ion and Na^+ phosphate buffer, weakening the crosslinker polymer, generating the total disintegration of the SA matrix.

On the other hand, Durán *et al.* (2017) reported a release time of three hours of the sensitive components, such as minerals and vitamins, encapsulated with SA in media with a pH above 6.5, which corresponds to the results found in this study. Based on the results found, it would be advisable to incorporate the iron microcapsules obtained by electrostatic coacervation, in foods with acidic pH to ensure their integrity and preservation of Fe for a longer time. On the other hand, the results found

(tiempo) en la segunda hora, seguido de una liberación gradual en el resto del tiempo ($p \leq 0.05$) (Figura 5). La liberación a pH 4 y 7 no presentaron diferencias significativas hasta los 60 min de exposición al pH. Sin embargo, a los 240 min se tuvo un 82.39 ± 0.72 % a pH de 7.4, seguido de pH 4 con un 64.37 ± 0.28 % y a pH 2 la liberación fue de 21.52 ± 1.68 %.

Sankalia *et al.* (2005), describieron tiempos muy cortos de liberación, para cápsulas de SA al encapsular papaína. Los autores liberaron el 100 % de su contenido en 60 minutos de incubación *in vitro* en solución intestinal simulada a pH 6.8; argumentando este hecho como consecuencia de un incremento en la afinidad entre el ion Ca^{2+} y el tampón fosfato de Na^+ , debilitando la reticulación del polímero, generando la desintegración total de la matriz de SA.

Por otra parte, Durán *et al.* (2017) reportó un tiempo de liberación de tres horas de los componentes sensibles, como minerales y vitaminas, encapsulados con SA en medios a pH superior a 6.5, lo que corresponde con los resultados encontrados. Con base en los resultados encontrados sería recomendable la incorporación de las microcápsulas de hierro obtenidas por coacervación electrostática, en alimentos con pH ácidos para asegurar su integridad y conservación del Fe por mayor tiempo. Por otro lado, los resultados encontrados son alentadores ya que el pH del

are encouraging since the pH of the small intestine, where the iron must be released to be absorbed, is approximately 7.

Conclusion

The electrostatic coacervation technique allowed microencapsulation of FS with high encapsulation efficiency ($66.94 \pm 1.11\%$) in average particle sizes of $600 \mu\text{m}$, under processing conditions of $0.12\text{mL}/\text{min}$ power flow and an applied voltage of 8kw at 10cm of separation between electrodes.

The SA/FS microcapsules obtained presented a thermal stability to iron up to 130°C according to the measurements performed with DSC. This thermal stability of the SA/FS capsules would allow them to be added to food and cooked below 120°C without compromising the nutritional quality of the compound.

Fe release profile of the SA/FS microcapsules obtained by electrostatic coacervation showed that Fe is released up to pH 7. This pH 7 value allowed to infer that the micronutrient could be released in the small intestine and not in the stomach.

Sources of funding

This project had the financial support of the Fund for Special Projects of the Rectory of the UAQ with the folio FOPER-2018-00418. It was also partially funded by the National Polytechnic Institute with grant SIP 20180197 and SIP 20196083.

Acknowledgements

Mendoza-Meneses thanks the National Council of Science and Technology (CONACYT, Mexico) for its support during his postgraduate studies.

References

- Aditya, N. P., Espinosa, Y. G. and Norton, I. T. (2017). Encapsulation systems for the delivery of hydrophilic nutraceuticals: Food application. *Biotechnology advances*, 35(4): 450-457. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.012>
- Appelqvist, I. A., Cochet-Broch, M., Poelman, A. A. and Day, L. (2015). Morphologies, volume fraction and viscosity of cell wall particle dispersions particle related to sensory perception. *Food Hydrocolloids*, 44: 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.012>

intestino delgado, lugar en donde debe liberarse el hierro para ser absorbido, es aproximadamente 7.

Conclusión

La técnica de coacervación electrostática permite microencapsular FS con una alta eficiencia de encapsulamiento ($66.94 \pm 1.11\%$) en tamaños de partícula promedio de $600 \mu\text{m}$, en condiciones de procesamiento de flujo de alimentación de $0.12 \text{mL}/\text{min}$ y un voltaje aplicado de 8kw a 10cm de separación entre electrodos.

Las microcápsulas de SA/FS obtenidas presentan una estabilidad térmica al hierro hasta una temperatura de 130°C de acuerdo a las mediciones realizadas con DSC. Esta estabilidad térmica de las capsulas de SA/FS permitirían adicionarlas a alimentos y someterlos a cocción por debajo de 120°C sin comprometer la calidad nutricia del compuesto.

El perfil de liberación del Fe de las microcápsulas de SA/FS obtenidas por coacervación electrostática muestra que el Fe se libera hasta un pH 7. Este valor de pH 7 permite inferir que el micronutriente podría liberarse en el intestino delgado y no en el estómago.

Fuentes de financiamiento

Este proyecto contó con el apoyo financiero del Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría de la UAQ con folio FOPER-2018-00418. También fue financiado parcialmente con el proyecto SIP 20180197 and SIP20196083 del Instituto Politécnico Nacional.

Agradecimientos

Mendoza-Meneses agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo durante sus estudios de posgrados.

- Avenidaño-Romero, G. C. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. 10.
- Babazadeh, A., Ghanbarzadeh, B. and Hamishehkar, H. (2016). Novel nanostructured lipid carriers as a promising food grade delivery system for rutin. *Journal of Functional Foods*, 26: 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.07.017>
- Barros, A. P. H., Morantes, M. T. A., Hoyos, M. I. C. and Ospino, L. J. M. (2016). Preparation of chitosan nanoparticles modified with sodium alginate with potential for controlled drug release. *Revista EIA/English version*, 12(2): 75-83.
- Bock, N. Woodruff, M. A. Hutmacher, D. W. and Dargaville, T. R. (2011). Electro spraying, a reproducible Method for Production of Polymeric Microspheres for Biomedical Applications. *Polymers* 3(1): 131-149 <https://doi.org/10.3390/polym3010131>
- Cendejas, X. L. M. & Ortega, I. A. Q. (2017). Síntesis y caracterización de esferas poliméricas para la liberación de fármacos. *Jóvenes en la Ciencia revista de divulgación de la ciencia*, 3(2): 2696-2700. <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/>
- Colín-Orozco, J., Zapata-Torres, M., Pedroza-Islas, R. and Rodríguez-Gattorno, G. (2013). Crecimiento y caracterización de nanofibras obtenidas a partir de proteína aislada de suero lácteo y óxido de polietileno por la técnica de electrohilado. *Superficies y vacío*, 26(2): 31-35. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-35212013000200001&lng=es&tlng=es
- Costamagna, M. S., Gómez-Mascaraque, L. G., Zampini, I. C., Alberto, M. R., Pérez, J., López-Rubio, A. and Isla, M. I. (2017). Microencapsulated chañar phenolics: A potential ingredient for functional foods development. *Journal of Functional Foods*, 37: 523-530. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.018>
- Cuatzo, L., M. I. (2010). Efecto de las condiciones de proceso en la conservación de alimentos encapsulados por el método de gelificación iónica [Maestría]. Instituto Politécnico Nacional, México. <http://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/9472/1/120.pdf>
- Dias, D. R., Botrel, D. A., Fernandes, R. V. D. B. and Borges, S. V. (2017). Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, 13: 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.001>
- Durán, E., Villalobos, C., Churio, O., Pizarro, F. and Valenzuela, C. (2017). Encapsulación de hierro: Otra estrategia para la prevención o tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro. *Revista chilena de nutrición*, 44(3): 234-243. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0717-75182017000300234&script=sci_arttext&tlng=e
- Galán, M. G., Llopart, E., Tissera, E., Alladio, A. and Drago, S. R. (2014). Bioaccesibilidad de hierro de fortificación y zinc endógeno de fideos comerciales tipo spaghetti. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 18(2): 74-80. <https://doi.org/10.14306/renhyd.18.2.53>
- Giro-Paloma, J., Martínez, M., Cabeza, L. F., and Fernández, A. I. (2016). Types, methods, techniques, and applications for microencapsulated phase change materials (MPCM). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53: 1059-1075. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.09.040>
- Hernández-Gálvez, V. S. (2015). Encapsulación de hierro hemínico en cápsulas de alginato de sodio como un suplemento oral para cerdos neonatos: estudio in vitro. http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/136262/Encapsulaci%F3n-de-hierro-hem%EDnico-en-c%E1psulas-de-alginato-de-sodio-como-un-suplemento-oral-para-cerdos-neonatos-%20estudios-in-vitro.pdf?sequence=1!□«P□□_&@□
- Hernández-Torres J., Iliina, A., Ventura-Sobrevilla, J. M., Belmares-Cerda, R. E., Contreras-Esquivel, J. C., Álvarez, G. M. and Martínez-Hernández, J. L. (2016). La microencapsulación de bioactivos para su aplicación en la industria. *Yeast Saccharomyces cerevisiae and the production of alcohol*. 12. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420003>
- López-Rubio, A., E. Sanchez, Y. Sanz, and J. M. Lagaron. 2009. Encapsulation of Living Bifidobacteria in Ultrathin PVOH Electrospun Fibers. *Biomacromolecules*. 10:2823–2829. doi:10.1021/bm900660b.
- Menger, F. M., R. Zana, and B. Lindman. 1998. Portraying the Structure of Micelles. *J. Chem. Educ.* 75:115. doi:10.1021/ed075p115.
- Nava-Reyna, E., G. Michelena-Álvarez, A. Lliná, and J. L. Martínez-Hernandez. 2015. Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 23:64–70.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F. and Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology.

- Current opinion in biotechnology*, 23(2): 182-186. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.001>
- Pérez-Calderón, J. F., Santos, M. V. and Zaritzky, N. E. (2018). Desestabilización de emulsiones petróleo/agua mediante la aplicación del biopolímero quitosano. Asociación Química Argentina. *Journal of the Argentine Chemical Society*, 105(1): 1-13. <http://hdl.handle.net/11336/86385>
- Ray, S., Raychaudhuri, U. and Chakraborty, R. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13: 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>
- Rodríguez-Llamos, A. C., Chiappetta, D., Szeliga, M. E., Fernández, A. and Bregni, C. (2003). Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol. *Ars pharmaceutica*, 44(4): 333-342. <http://hdl.handle.net/10481/28182>
- Quintero, B. P., Trujillo, V. C., Muñoz, G., Valbuena, W. L., Zuluaga, F., Parra, W. G. and Marmolejo, A. R. (2018). Preparación y caracterización de geles conductores a base de quitosano para posibles aplicaciones biomédicas. *Revista de Ciencias*, 21(1): 91-99. <https://doi.org/10.25100/rc.v21i1.6349>
- Soto-Martínez, K. M. (2018). Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas de proteína de amaranto y pululano cargadas con dos bacteriocinas: nisina A y pediocina PA-1 [Thesis]. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1129>
- Sankalia, M. G., Mashru, R. C., Sankalia, J. M. and Sutariya, V. B. (2005). Papain entrapment in alginate beads for stability improvement and site-specific delivery: physicochemical characterization and factorial optimization using neural network modeling. *Aaps pharmscitech*, 6(2): E209-E222. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1208%2Fpt060231.pdf>
- Valenzuela, C., Hernández, V., Rodríguez, F. and Carrillo, R. (2013). Tecnología de encapsulación y su aplicación en ciencias veterinarias. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(2): 58-75. <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/122625/tecnologia-de-encapsulacion-y-su-aplicacion-en-ciencias-veterinarias.pdf?sequence=1>
- Valenzuela, C., Hernández, V., Morales, M. S., Neira-Carrillo, A. and Pizarro, F. (2014). Preparation and characterization of heme iron-alginate beads. *LWT-Food science and technology*, 59(2): 1283-1289. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.030>
- Verde, C. J., Á. E. Vega, C. J. López, Z. M. Estrada, S. F. Malpica, Z. C. Pelayo, C. M. Pérez, S. P. Ruiz, A. G. Trejo, and C. L. Tovar. 2013. Manual de prácticas de laboratorio Química Orgánica I. primera. Universidad Autónoma Metropolitana, México. <http://www.izt.uam.mx/ceu/publicaciones/MQA/analitica.pdf>
- Wen, P., Zong, M. H., Linhardt, R. J., Feng, K. and Wu, H. (2017). Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*. 70: 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.009>
- Wu, N., Liu, X., Zhao, C., Cui, C. and Xia, A. (2016). Effects of particle size on the magnetic and microwave absorption properties of carbon-coated nickel nanocapsules. *Journal of Alloys and Compounds*, 656: 628-634. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.10.027>
- Zhao, W. & Wang, Y. (2017). Coacervation with surfactants: From single-chain surfactants to gemini surfactants. *Advances in colloid and interface science*, 239: 199-212. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.04.005>
- Zhu, F. (2017). Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. *Food Chemistry*, 229: 542-552. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.101>
- Zhang, X. Kobayashi, I. Uemura, K. Nakajima, M. *Colloids Surf. (2013) A: Physicochem. Eng. Asp.* 2013: 436, 937.