



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO DE FIN DE GRADO:

“Estudios de encapsulación de polifenoles del té: Propiedades y estabilidad.”

Autor: Félix Barrios Martínez.

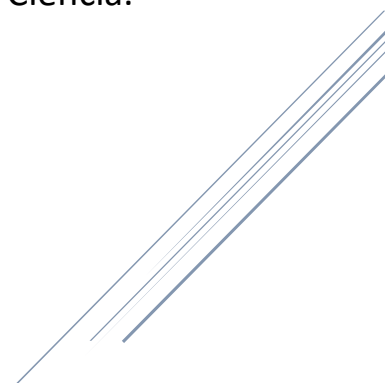
Tutora: Dña. Pilar Jiménez López.

Grado en Nutrición Humana y Dietética.

Curso 2018-2019.

Facultad de Medicina.

Departamento de Pediatría e Inmunología, Obstetricia y Ginecología,
Nutrición y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia.





Agradecimientos:

“A menudo damos por hecho las cosas que más merecen nuestra gratitud.”

Cynthia Ozick

Aparte de todas las horas empleadas en realizar este trabajo en el laboratorio, en mi cuarto o simplemente dándole muchas vueltas mientras estaba realizando otras tareas, el mérito no es todo mío. Sin el apoyo, de todas estas personas no podría haber sido posible realizarlo.

A mi tutora por ofrecerme un tema tan novedoso, por estar siempre a mi disposición y sobre todo por ofrecerme a trabajar en un espacio al que yo siempre he tenido un poco de respeto y en el que actualmente me siento más seguro para seguir quizás trabajando en un futuro.

A mis amigos del grado que siempre durante estos 4 años, nos hemos ofrecido mutuamente nuestra ayuda y nuestros mejores consejos. Espero seguir contando con vuestro apoyo en posteriores etapas de la vida.

A mi pareja por estar siempre apoyándome a pesar de los días duros de trabajo, por enseñarme que el amor puede con las malas rachas y te enseña a ser más humilde, compartiendo grandes cosas de la vida, sin pedir nada a cambio.

A toda mi familia, pero en especial a mi madre por interesarse siempre en mis trabajos, por darme ánimos cuando las cosas no salían como yo esperaba o simplemente por el esfuerzo que supone para ella los estudios de su hijo, espero algún día poder devolverte todo el esfuerzo que tu pusiste en mí de alguna forma.



ÍNDICE DE CONTENIDOS:

Páginas:

1. Resumen.....	4.
2. Abstract.....	5.
3. Introducción:	
3.1 La gastronomía molecular y sus grandes referentes.....	6-7.
3.2 Gelificantes. Proceso de gelificación. El alginato.....	7-9.
3.3 Proceso de esferificación y tipos.....	9-10.
3.4 Otros usos de la técnica de esferificación.....	10.
3.5 El té, tipos y catequinas del té.....	11-12.
3.6 Implicaciones terapéuticas del té verde en el cáncer.....	13-15.
4. Justificación y objetivos.....	16.
4.2 Objetivos.....	16.
4.3 Búsqueda bibliográfica PubMed.....	17.
5. Materiales y métodos:	
5.1 Diseño.....	18.
5.2 Materiales.....	18-19.
5.3 Métodos.....	19-23.
5.4 Análisis estadístico.....	23.
6. Resultados:	
6.1 Ensayo de formación de esferas a distintas concentraciones.....	24-27.
6.2 Medida de la eficacia de atrapamiento de polifenoles del té.....	27-30.
6.3 Estabilidad en función de distintos valores de pH y temperatura.....	31-33.
6.4 Análisis de la opinión sobre la cocina molecular en la población.....	34.
7. Discusión.....	35-36.
8. Conclusiones.....	37.
9. Bibliografía.....	38-40.
10. Anexos.....	40-43.



ÍNDICE DE FIGURAS:	Páginas:
Figura 1. Ravioli de pesto y esféricos de albaricoque.....	7.
Figura 2. El huevo roto de Aduriz.....	7.
Figura 3. Estructura del proceso de gelificación.....	9.
Figura 4. Tipos de procesos de esferificación.....	10.
Figura 5. Catequinas del té.....	12.
Figura 6. Mecanismos de EGCG en cáncer.....	13.
Figura 7. Curva patrón método Folin-Ciocalteu.....	21.
Figura 8. Curva patrón método CUPRAC.....	22.
Figura 9. Esferific. Alginato 0,25% C. cálcico 0,25%.....	24.
Figura 10. Esferific. Alginato 0,5% C. cálcico 0,25%.....	24.
Figura 11. Esferific Alginato 1% C. cálcico 0,25%.....	25.
Figura 12. Esferific Alginato 2% en C. cálcico 0,25%.....	25.
Figura 13. Esferific C. cálcico 0,5% y alginato 0,25%.....	26.
Figura 14. Esferific C. Cálcico 0,5% y alginato 0,5%.....	26.
Figura 16. Esferific C. Cálcico 0,5% y alginato 1%.....	26.
Figura 16. Esferific C. Cálcico 0,5% y alginato 2%.....	26.
Figura 17. Recta patrón de ácido gálico 1mM.....	27.
Figura 18. Gráfico de niveles de polifenoles de tés.....	27.
Figura 19. Recta patrón método CUPRAC.....	29.
Figura 20. Oxidación esferas.....	30.
Figura 21. Recta patrón Trolox método DPPH.....	30.
Figura 22. Pérdida de volumen encapsulado.....	32.
Figura 23. Variac. A. Antioxidante refrigeración.....	32.
Figura 24. Variac. A. Antioxidante ambiente.....	33.
Figura 25. Respuesta 1º encuesta.....	34.
Figura 26. Respuesta 2º encuesta.....	34.
Figura 27 Respuesta 3º encuesta.....	34.

ÍNDICE DE TABLAS:	Páginas:
Tabla 1: Búsqueda en PubMed..	17.
Tabla 2. Resultados de la cantidad de fenoles de 3 tipos de tés.....	27.
Tabla 3. Resultados de la cantidad de fenoles de muestras esferificadas y sin esferificar.....	28.
Tabla 4. Resultados de la actividad antioxidante de muestras esferificadas y sin esferifica.....	29.
Tabla 5. Resultados de la capacidad antirradicalaria de muestras esferificadas y sin esferificar.....	30.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

°C: Grados Celsius.

CUPRAC: Cupric reducing antioxidant capacity.

DPPH: Diphenol-1-2-picrylhydrazyl.

M: Concentración molar.

Mg: Miligramos.

EGCG: Epigallocatequina-3-galato.

mM: Milimolar.

μl: Microlitros.

Eq: Equivalentes.

O₂: Oxígeno.



1. Resumen.

La esferificación es una técnica innovadora usada en gastronomía y que se sitúa dentro del término de la cocina conceptual, fue creada por Ferrán Adriá y su equipo del restaurante el Bulli. Para este proceso se usa alginato y una fuente de calcio que suele ser cloruro cálcico, cuando el alginato entra en contacto con cationes divalentes se forma un gel que en las esferas sería la parte más externa que denominamos membrana que engloba un contenido líquido en su interior, esto provoca un efecto explosión en boca que convierte a este tipo de cocina en toda una experiencia sensorial. En este trabajo encapsulamos polifenoles del té, entre los que destacan las catequinas que tienen importantes implicaciones terapéuticas en la prevención y tratamiento del cáncer.

Se determina si las esferas son capaces de captar los principales nutrientes del té verde, los polifenoles, midiendo su eficacia de atrapamiento. Otro gran objetivo de este trabajo fue medir la estabilidad que tienen las esferas a distintas condiciones de temperatura y de pH y estudiar la liberación de los polifenoles de las esferas al exterior. El método usado para formar las esferas fue la esferificación directa, para medir la actividad antioxidante de las esferas y del contenido que iban liberando al exterior se emplearon 3 métodos espectrofotométricos: Folin-Ciocalteu, CUPRAC Y DPPH.

El estudio muestra diferencias en cuanto a forma, volumen y densidad de las esferas dependiendo de la concentración de alginato y cloruro cálcico usada. Se demostró que la esferificación es una técnica que conserva los polifenoles en su interior, con una eficacia de atrapamiento en torno al 60-75%, una menor pérdida de volumen a temperatura de refrigeración con respecto a la temperatura ambiente y una mayor pérdida de volumen cuando el alimento a encapsular está a pH ácido.

Con una mayor concentración de alginato y cloruro cálcico se obtienen esferas mejor formadas más perfectas y de mayor volumen. La esferificación es una técnica que tiene capacidad de encapsular los polifenoles en el interior de las esferas. La refrigeración es una buena técnica para conservar las esferas y no es demasiado eficaz esferificar alimentos con pH ácido.

Palabras clave: Esferificación directa, alginato, polifenoles, atrapamiento, estabilidad.



2. Abstract

Spherification is an innovative technique used in gastronomy and which is situated within the term of conceptual cuisine, It was created by Ferrán Adrià and his team at El Bulli restaurant. Alginate is used and a source of calcium that is usually calcium chloride, when the alginate comes in contact with divalent cations a gel is formed that in the spheres is the most external part that we call a membrane that includes a liquid content in its interior, this causes an explosion effect in the mouth that turns this type of cuisine into a sensory experience. In this work we encapsulate tea polyphenols, among which are the catechins that have important therapeutic implications in the prevention and treatment of cancer.

It is determined if the bead are able to capture the nutrients of green tea, polyphenols, measuring their efficacy of entrapment. Another objective of this work was to measure the stability of the beads at different temperature and pH conditions and study the release of the polyphenols from the beads abroad. The method used to form the beads was the direct spherification, to measure the antioxidant activity of the spheres and the content they were releasing to the outside were used 3 spectrophotometric methods: Folin-Ciocalteu, CUPRAC and DPPH.

The study shows differences in shape, volume and density of the beads depending on the concentration of alginate and calcium chloride used. It was demonstrated that spherification is a technique that conserves polyphenols inside, with an efficiency of entrapment around 60-75%, a lower volume loss at refrigeration temperature with respect to room temperature and a greater volume loss when the food to be encapsulated is at acidic pH.

With higher concentration of alginate and calcium chloride, beads that are more perfect and of greater volume are obtained. Spherification is a technique that has the ability to encapsulate the polyphenols inside the beads. Refrigeration is a good technique for preserving beads and isn't efficient to form beads foods with acidic pH.

Key words: Direct spherification, alginate, polyphenols, entrapment, stability.



3. Introducción.

3.1 LA GASTRONOMÍA MOLECULAR Y SUS GRANDES REFERENTES.

La gastronomía según la Real Academia Española (RAE) es el “arte de preparar una buena comida”, extendiéndome un poco más puedo dar una definición propia y es que según están creciendo las exigencias y la competencia en este amplio mundo de la restauración, la gastronomía podría entenderse como la dedicación continua del estudio de nuevas formas de preparar los alimentos para atraer la atención de las personas.

La gastronomía molecular, se entrama dentro de la investigación de nuevos avances químicos y bioquímicos que permitan crear nuevos alimentos y con ello aplicar la ciencia a la práctica culinaria.

Viendo las dos definiciones anteriores, podemos pensar en la palabra evolución, y es que la gastronomía dentro del mundo de la restauración ha avanzado mucho. Desde que aparece el primer restaurante en 1765 fundado por Monsieur Boulanger, donde la oferta era muy limitada y circunscrita a lo que el cocinero preparaba ese mismo día, hasta la actualidad donde encontramos en una misma ciudad cientos de restaurantes con diferentes tipos de comida, de diferentes países, con diferentes técnicas culinarias, es muy difícil no encontrar una opción acorde a tus apetencias.

En 1994 nace el término de cocina conceptual de la mano del español Ferran Adriá y su equipo del restaurante el Bulli, el trabajo que realizaron fue dejar de usar técnicas ya existentes mezclando diferentes alimentos y optar por crear nuevos conceptos y nuevas técnicas. De este movimiento salieron las espumas, las nuevas pastas, el mundo del helado salado, la esferificación, entre otras muchas técnicas que marcan una diferencia muy importante entre una cocina meramente creativa y una cocina evolutiva. Y es por esto por lo que Adriá y su restaurante el Bulli, han sido considerados mejor cocinero y restaurante del mundo desde los años 2006 hasta 2009 consecutivamente (El Bulli, S.F).

Centrándonos en el concepto de esferificación en el ámbito de la gastronomía, su origen se remonta al siglo XXI de la mano de Ferran Adriá y el Bulli. Este nuevo concepto dentro de la gastronomía molecular hace referencia a la encapsulación de líquidos con textura de gelatina. Estas esferas tienen que poseer estabilidad suficiente para poder ser manipuladas. La conformación en forma de esfera ocurre gracias al uso de polisacáridos de origen marino y bacteriano que tienen capacidad gelificante.



En la página web de recetas de Ferrán Adriá podemos encontrar numerosas recetas de gastronomía molecular, en concreto esferificaciones de melón, guisantes, coco, mozzarella, raviolis¹, entre otras (Albert y Ferrán Adriá, 2012).



Figura 1. Raviolis de pesto y esféricos de albaricque. Fuente: El bulli.

El fundamento de la esferificación radica en poner en contacto el alimento junto a un polisacárido de origen natural como es el alginato y verterlo en un baño de cloruro cálcico para que el alginato forme una fina membrana y encapsule el líquido comestible en el interior.

Otro gran referente de este tipo de gastronomía es el chef Andoni Luis Aduriz y su restaurante Mugaritz situado en Rentería, Guipúzcoa, lugar donde más que comer lo que haces es explorar con el paladar. Aduriz trabajó con Ferran Adriá en el Bulli y posteriormente siguió sus pasos por separado, pero cuenta con todas las influencias de la cocina conceptual que allí realizaban. Para hacernos una idea de lo que este tipo de cocina supone a la hora de investigar y crear, su restaurante cierra 4 meses al año para dedicarse a innovar y crear nuevas técnicas y recetas. Aduriz dice ofrecer un contexto donde ejercer la libertad sensorial, para poder superar la imposición de las costumbres (Mugaritz, S.F). ¿Acaso crear un huevo² del que nos podemos comer hasta la cáscara, no es superar la costumbre? Seguro que sí.

Con todo esto lo que se quiere hacer ver es que la cocina va mucho más lejos, no es solo cumplir la importante función de nutrirnos bien, sino de hacer de ello, una experiencia llena de emociones y sorpresa. Es sin duda otra forma de disfrutar de la comida.



Figura 2. El huevo roto de Aduriz. Fuente: Mugaritz.

¹ Los raviolis de pesto no tienen forma esférica ya que se moldean para simular la forma de un ravioli tradicional.

² El huevo de Aduriz es un tipo de postre que simula un huevo con su cáscara rota.



3.2. GELIFICANTES. PROCESO DE GELIFICACIÓN. EL ALGINATO.

Para entender el proceso de esferificación es muy importante entender lo que ocurre y con qué compuestos se puede llevar a cabo y para ello en este punto hablamos de los gelificantes y más en concreto del alginato, sin duda el gelificante más usado para producir esferas.

Para entender que compuestos son gelificantes, tenemos que explicar el concepto de hidrocoloide. Los hidrocoloides están formados por cadenas largas de moléculas repetidas, formando largos polímeros que principalmente reúnen 3 características: Son fácilmente dispersables, son total o parcialmente solubles y tienen tendencia a hincharse con el agua. Su origen forma parte de productos naturales como: extractos de plantas o algas, harinas de semillas, exudados de árboles, limos gomosos, entre otros. Todos tienen muchos grupos hidroxilo en su estructura, de ahí que cuenten con la capacidad de absorber el agua, ya que los grupos hidroxilo son hidrófilos, es decir, absorben agua con facilidad. Los hidrocoloides pueden actuar como estabilizantes, espesantes o gelificantes (Mateos Aparicio, 2017). Los geles surgen cuando los hidrocoloides tienen la capacidad de formar una red de cadenas, que forma un sistema coloidal, donde un líquido es atrapado por una red tridimensional de sólidos.

El más usado para el proceso de esferificación es el alginato, polisacárido de origen marino, no tóxico, biodegradable y barato, que se encuentra en algas pardas (*Laminaria*, *Macrocystis*) y que tiene la capacidad de formar geles insolubles en presencia de cationes multivalentes, el más común es el calcio. Podrían usarse cationes como Bario, Cobre, Plomo, Zinc, Níquel, pero el Calcio es el más usado ya que no es tóxico, más concretamente lo que se usa es Cloruro cálcico.

El tipo de gelificación que ocurre cuando se usan alginatos es la gelificación ionotrópica, llamada así por el entrecruzamiento de cadenas de alginato con cationes multivalentes. En términos moleculares, los alginatos son polímeros binarios, no ramificados de ácido β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) de composición y estructura secuencial variable, que en conjunto forman el ácido algínico. Están compuestos de regiones homopoliméricas de M y G, denominados bloques MM y GG, intercalados con regiones heteropoliméricas MG. En solución los alginatos son flexibles, pero cuando actúan con iones metálicos divalentes como el Ca^{2+} , se forma una estructura ordenada, que deriva del requisito de que dos bloques GG (uno a cada lado), se alineen y se forme un hueco entre ambos en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para que el calcio encaje (Macías, Blandino & Cantero, 1999). Los bloques MM y MG no participan en las zonas de unión, sino que forman los llamados segmentos elásticos en la red del gel (Lupo Pasin, Bryshila., 2014). Las cadenas de alginato, asociadas al calcio forman una



estructura denominada “caja de huevos”, donde el calcio está en el centro coordinando su carga con los restos de ácido carboxílico de los ácidos manurónico y gulurónico.

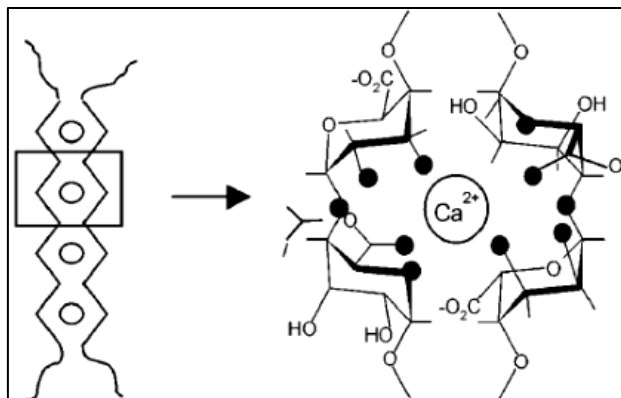


Figura 3. Estructura formada en el proceso de gelificación. Fuente: Alexander Mendez, 2014.

3.3. PROCESO DE ESFERIFICACIÓN Y TIPOS.

El proceso de esferificación se basa en la gelificación controlada de un líquido, que cuando se sumerge en un baño, que también es líquido, forma esferas (Ramírez, Jerónimo, Manzano, & Hernández, 2014). Se obtiene una vesícula formada por una fina membrana, que sería la parte gelificada con el líquido dentro. La preparación obtenida es esférica ya que esta conformación, permite minimizar el área de la interfase entre los dos líquidos y, por tanto, la energía del sistema. Desde el punto de vista culinario, la esferificación es un avance para las técnicas usadas en líquidos, ya que el resultado final engloba dos texturas: líquida en el interior y casi sólida en el exterior (Mans & Castells, 2011).

El proceso de esferificación varía ligeramente en función del alimento que se quiera encapsular y tenemos dos tipos: La esferificación directa o básica y la inversa.

Esferificación directa o básica: Usada para líquidos acuosos que no contienen calcio o no son ácidos. En este tipo de esferificación la solución que contiene el alimento y el agente gelificante, alginato sódico es añadida a un baño de cloruro cálcico que contiene los iones necesarios para formar la cubierta de la esfera. Se forma una vesícula líquida por dentro y gelificada en la superficie, cuyo grosor va a depender del tiempo de reacción en el baño de cloruro cálcico. Este proceso tiene un inconveniente ya que con el tiempo acaba gelificando todo el interior (Keerthana sivakumaran., 2018; Mans & Castells., 2011).

Esferificación indirecta: Es aplicable a todos los líquidos acuosos, incluidos lácteos y ácidos. En este caso la sal de calcio se disuelve con el producto alimentario y esta mezcla se introduce dentro de un baño que contiene el alginato (Mans y Castells., 2011)



La razón por la cual no pueden usarse en la esferificación directa líquidos ácidos radica en que el alginato es inestable a un pH inferior de 5 y cuando el alginato entra en contacto con el ácido, se forma ácido algínico, incapaz de formar la membrana de alginato cálcico necesaria para formar la esfera. Podemos arreglar esto añadiendo citrato de sodio y reducir su acidez. En el caso de los productos lácteos estos al contener calcio, nuestra mezcla gelificaría al instante si añadimos el alginato y no se podrían formar esferas (Aguirre., 2016).

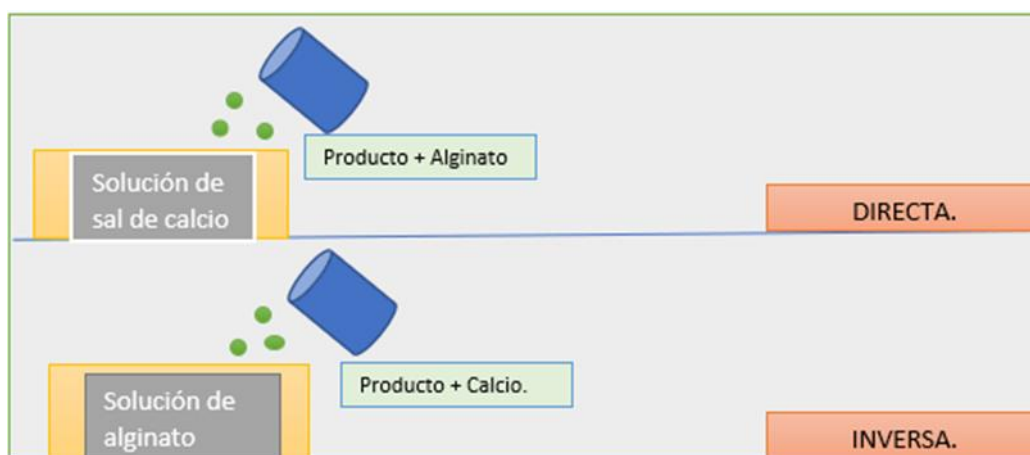


Figura 4. Tipos de procesos de esferificación. Elaboración propia.

3.4: OTROS USOS DE LA TÉCNICA DE ESFERIFICACIÓN.

El concepto de esferificación, como vamos a ver, no es solo una técnica usada en gastronomía, sino que tiene otras importantes aplicaciones. No solo se refiere a la acción de encapsular alimentos para consumo y disfrute humano, sino que en la actualidad se usa en la industria alimentaria para encapsular compuestos bioactivos, en la industria farmacéutica para encapsular medicamentos y en la industria biotecnológica para la inmovilización de células. En el caso de la industria alimentaria está en auge en los últimos años la encapsulación de compuestos bioactivos para diseñar alimentos funcionales, empleando para ello, esferificaciones de liberación controlada, por ejemplo, encapsulando polifenoles, que son compuestos muy sensibles que, gracias a la formación de este tipo de esferas, podemos usarlos incorporándolos a otros alimentos y asegurándonos de aprovechar sus amplias propiedades para beneficio de la salud. También se usa para inmovilizar biocatalizadores, ya que de esta forma podemos encapsular sustrato y biocatalizador dentro de una solución acuosa, facilitando así que ambos entren en contacto de forma adecuada (Hung Ching, Bansal & Bhandari, 2017)

Un reciente estudio realizado en la universidad de Vietnam describe la encapsulación de bacterias ácido-lácticas en esferas de alginato. En este estudio se encapsuló una bacteria ácido-láctica, aislada de yogur natural fermentado y a través de ensayos con carne de cerdo, se



demonstró su actividad antimicrobiana. De esta forma reduciríamos el consumo de ciertos aditivos químicos que causan efectos adversos para la salud (Ngoc Thuy Trang Le et al., 2019).

Las razones por las que la encapsulación va más allá de una técnica culinaria radican en que con ella obtenemos barreras que permiten que un compuesto no interaccione con el medio que lo rodea promoviendo una mayor vida útil del mismo, el control de la liberación del compuesto de forma gradual o simplemente formar cápsulas de materiales que a priori estaban en estado líquido, lo que configura grandes avances para la industria (Fang & Bhandari, 2010).

En el ámbito de la cocina molecular, se pretende lograr diferentes texturas o diferentes apariencias de un alimento para atraer la atención del consumidor. Debemos atender a si esta transformación afectaría la calidad de la materia prima que se va a usar en nuestro estudio y por eso vamos a hablar del té y de sus componentes más característicos, las catequinas.

3.5) EL TÉ, TIPOS Y CATEQUINAS DEL TÉ.

El té después del agua es la segunda bebida más consumida a nivel mundial (Sarah C. Forester & Joshua D. Lambert., 2003). Es consumido considerablemente en países como China, Japón e India. El consumo de té se ha asociado con muchos beneficios para la salud, incluido la prevención del cáncer y las enfermedades cardíacas.

Los tipos de té más utilizados que existen en el mercado son: El té verde, el té negro y el té Oolong, que provienen de la misma planta, denominada *Camellia Sinensis* pero difieren en su producción y composición. El té verde se somete a un proceso térmico que puede ser cocción o tostado, para inactivar las enzimas oxidativas y después se seca. Por el contrario, el té negro se produce triturando las hojas del té frescas y dejando que este se oxide por la acción de las enzimas polifenol oxidasas junto con la del oxígeno atmosférico en un proceso de fermentación. El proceso de obtención del té Oolong es un proceso intermedio a los dos anteriores, sufre un proceso de fermentación, pero menor que en el caso del té negro, la oxidación enzimática de las hojas es breve e incompleta. El té verde se caracteriza químicamente por la presencia de grandes cantidades de compuestos fenólicos denominados catequinas. Una taza típica de té verde elaborado contiene en peso seco, en torno al 30 – 40% de catequinas las más importantes son: epicatequina (EC) representa un 6,4% del conjunto de catequinas, 3 epigalocatequina (EGC) representa un 19% del total, epicatequina-3-galato (ECG) representa aproximadamente un 13,6% del total y epigalocatequina-3-galato (EGCG), catequina en mayor cantidad representando un 59% del total de catequinas. Debido al proceso de fermentación una taza de



té negro contiene mucha menor cantidad de catequinas, estando en torno al 3-10% (Sarah C. Forester & Joshua D. Lambert., 2003).

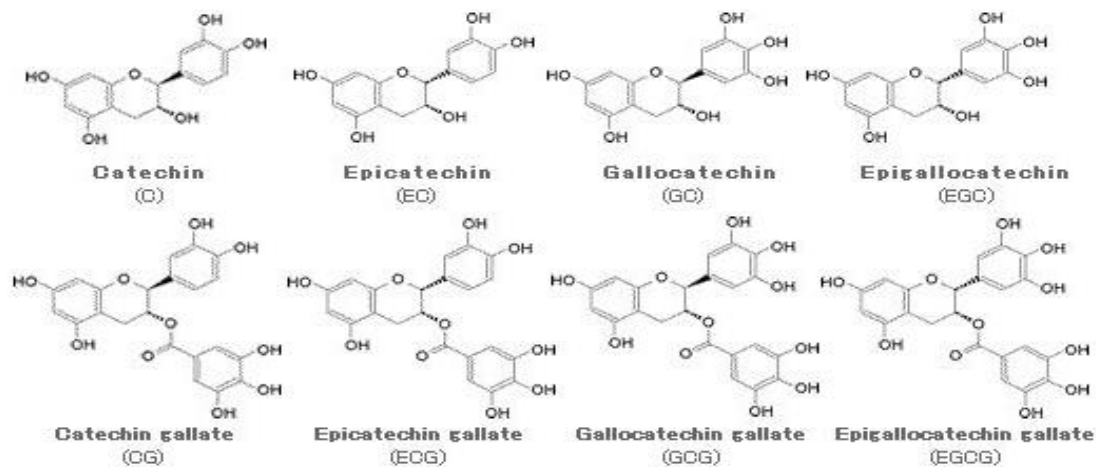


Figura 5. Catequinas del té. Fuente: Blue-B-Japan.

Además de polifenoles, el té contiene otros compuestos como: las metilxantinas principalmente cafeína entre un 2-5%, en cuantía muy inferior el té contiene teofilina entre 0,0002-0,013% y teobromina. Aminoácidos entre el 1-4% del extracto seco. Clorofila que se degrada durante la elaboración del té negro con formación de clorofílicos y feofóbidos de color pardo, que con el calor se convierten en feofitinas de color negro. Carotenoides como las xantofilas, neoxantina, violoxantina y beta-caroteno entre otros. Lípidos en cantidades muy bajas, prevalecen glicerofosfolípidos en hojas jóvenes, glicolípidos en hojas viejas, alcoholes triterpénicos, ácidos grasos como linoleico y linolénico. Los carbohidratos representan entre el 5 y 7% del extracto seco, como polisacáridos y azúcares más simples. Vitaminas sobre todo del grupo B y ácido ascórbico y más de 600 compuestos volátiles.

Entre los polifenoles del té verde, podemos encontrar hasta 6 grupos diferentes de flavanoles, hidroxí-4- flavanoles, antocianinas, flavonas y ácidos fenólicos. Entre los flavonoides en el té verde destacan las catequinas como componentes mayoritarios, más característicos y a los que se les atribuye la mayor parte de los efectos terapéuticos.

La principal razón por la que el té negro contiene menor cantidad de catequinas como ya se ha nombrado es debido al proceso de fermentación. Lo que ocurre en este proceso es la oxidación y polimerización de dichas catequinas, dando lugar a teaflavinas y tearubiginas, principios astringentes que dan color rojizo a dichas infusiones.

Analizaremos los efectos, más en concreto de los polifenoles del té verde y su papel en la quimioprevención del cáncer, ya que gran parte de nuestro estudio se enfoca en este tipo de té.



- **Cáncer de pulmón:** Extractos de té verde en dosis del 2% y EGCG a 1,2Mm en el agua potable, inhibieron la formación de tumores en ratones que fueron tratados con una potente nitrosamina encontrada en el humo del tabaco (Chung, F.L, 1999). La administración de té verde y EGCG por vía oral inhibe la metástasis de células LL2 de carcinoma de pulmón de Lewis en ratones (Sazuka, M et al, 1995).
- **Cáncer de piel:** En múltiples estudios se sugiere un efecto de EGCG como prevención de la inmunosupresión inducida por las radiaciones UVB, pudiendo así contribuir a la actividad quimiopreventiva en la prevención de la fotocarcinogénesis (Katiyar, S.K., 1999. Katiyar, S.K 2006).
- **Cáncer de páncreas:** EGCG ejerce un efecto supresivo del crecimiento en células pancreáticas cancerosas in vitro (Lyn-Cook, B.D. et al, 1999). El tratamiento con EGCG induce la detención del ciclo celular y la apoptosis de células pancreáticas cancerosas. Además, favorece la oligomerización de Bax y por tanto su activación. Bax es una familia de proteínas, que actúa provocando un agujero en la membrana de las mitocondrias, siendo esencial en el proceso apoptótico (Qanungo, S., M. Das, S. Haldar & A. Basu, 2005). Además, EGCG, activa las quinasas (JNKs) lo que las hace tener un gran papel actuando como inhibidores biológicos de carcinomas pancreáticos (Lyn-Cook, B.D. et al, 1999).
- **Cáncer de mama:** Diferentes estudios muestran el papel de EGCG como agente citotóxico para las células cancerosas de mama. Esta catequina inhibe la proliferación en diferentes células como MCF-7, BT474, Hs578t del cáncer de mama, pero no tienen este efecto en células sanas. Los polifenoles presentan un papel importante en la apoptosis de células del cáncer de mama ya que activan las caspasas, que son enzimas esenciales del proceso de muerte celular programada (Baliga, M. S., S. Meleth & S. K. Katiyar, 2005).
- **Cáncer de ovario:** EGCG presenta un efecto inhibitorio del crecimiento de células ováricas cancerosas, pero además se ha visto que el uso de esta catequina aumenta la sensibilidad al cisplatino, fármaco usado en quimioterapia.

Vistos los tipos de cáncer donde los polifenoles del té y más concretamente EGCG tienen mayor repercusión cabe destacar los efectos en la angiogénesis y en la metástasis:

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína señalizadora que está implicada en el proceso de angiogénesis o crecimiento de vasos sanguíneos a partir de otros existentes.

EGCG inhibe el crecimiento celular endotelial y además impide la unión de VEGF a su receptor, contribuyendo con ello a los efectos antiangiogénicos y quimiopreventivos del cáncer. Además,



el bloqueo del receptor VEGF repercute en la producción de IL8, RNAm y por tanto en los niveles de proteínas, que se verán disminuidos (Rodriguez, S.K. et al, 2006). La IL8 es un factor proangiogénico producido por macrófagos infiltrantes de tumores que facilita el desarrollo de vascularización en varios cánceres.

Metaloproteinasas de matriz (MMP) son unas enzimas que pueden descomponer el colágeno y participan en la degradación de la matriz extracelular. Están implicadas en el desarrollo de la metástasis, en concreto MMP2 Y MMP9 juegan un papel fundamental en la invasión del tumor. El papel de EGCG se concreta en la disminución de MMP2 Y MMP9 y por tanto actúan inhibiendo la metástasis e invasión tumoral (Vayalil, P.K. & S. K. Katiyar, 2004).

Durante la neovascularización tumoral, el factor de crecimiento endotelial vascular y los receptores de efrina (Eph) actúan como mediadores de la angiogénesis. La EGCG actúa inhibiendo la migración de células endoteliales mediada por EphA1 y por tanto afecta a la angiogénesis del tumor (Tang, F.Y., E. P. Chiang & C. J. Shih, 2006)

En definitiva, los polifenoles del té verde inhiben la metástasis mediante la regulación de la uroquinasa y las metaloproteinasas de matriz. Los polifenoles reducen la angiogénesis al disminuir la producción del factor de crecimiento endotelial vascular y la fosforilación de los receptores.

Es importante en este estudio que pretendemos hacer, valorar los compuestos más importantes del té verde y sus implicaciones terapéuticas ya que analizaremos si en el proceso de la esferificación, las esferas tienen la capacidad de encapsular estos compuestos o no y por tanto si presentan estas capacidades terapéuticas.



4. Justificación y objetivos.

Las investigaciones que relacionan la esferificación con la capacidad de retener nutrientes en el interior y su estabilidad son prácticamente inexistentes. Dado la gran expansión de esta cocina en la actualidad, me parece de gran importancia realizar un estudio para ver si esta técnica puede llegar a aportar nutrientes y no es solo una mera forma de decorar o atraer al público.

Como hemos visto, el té verde presenta grandes efectos terapéuticos en relación con el cáncer, pero ¿Si esferificamos té, estas esferas guardan esos efectos? Por eso comprobando si las esferas son capaces de encapsular los polifenoles del té en su interior, podemos deducir si este tipo de cocina aporta nutrientes y no solo una presentación agradable.

Además, también es importante determinar en qué condiciones las esferas son más estables y deducir que tipo de alimentos se pueden encapsular o no, pues no es eficiente hacer esferas y que se desintegren en cuestión de unos pocos minutos. Así como, las condiciones de temperatura en que deben guardarse para que su estabilidad se afecte lo menor posible.

4.2) OBJETIVOS:

- Determinar la capacidad de atrapamiento que tienen las esferas de té midiendo el contenido fenólico, capacidad antioxidante y antirradicalaria que presentan las esferas en su interior.
- Medir la estabilidad de las esferas a distintos valores de temperatura y pH.
- Describir la evolución de la cocina, centrándose en el concepto de cocina conceptual y más concretamente en el proceso de esferificación.
- Analizar principales elementos antioxidantes del té, más concretamente de las catequinas del té verde y sus efectos terapéuticos.
- Estudiar la influencia de las concentraciones de alginato y de cloruro cálcico necesarias para formar unas esferas estables.
- Estudiar la opinión que tiene la población sobre la cocina molecular.



4.2) BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA EN LA BASE DE DATOS PUBMED.

Para la obtención de la información pertinente para realizar este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica, utilizando la base de datos PubMed³, mediante la introducción de una serie de palabras clave. Por ello se van a representar en la tabla 1 los resultados del número de trabajos experimentales y reviews⁴ por orden, desde términos generales a términos más concretos.

Términos de búsqueda.	Total	Últimos 10 años.		Últimos 5 años.	
		Trabajo experimental.	Review.	Trabajo experimental.	Review.
Encapsulation	26252	17519	1371	10940	864
Tea Polyphenols	3475	1651	395	916	183
Beads	32306	13703	432	7134	215
Sodium Alginate	12361	6641	239	3838	130
Encapsulation + Poliphenols.	195	173	16	145	13
Polyphenols + Beads + Stability	5	5	0	1	0
Polyphenols + Beads + Entrapment	3	3	0	1	0
Tea polyphenols + Beads + Encapsulation.	0	0	0	0	0

Tabla 1: Resultados de la búsqueda bibliográfica en PubMed

Como podemos observar, no existe en la base de datos Pubmed estudios que analicen la encapsulación de polifenoles del té, así como la eficacia del atrapamiento y la estabilidad de las esferas en diferentes condiciones. Es muy importante conocer las nuevas técnicas culinarias y que ocurre con los nutrientes a la hora de utilizarlas.

³ PubMed es una base de datos de libre acceso del ámbito de ciencias de la salud ofrecida por la biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos.

⁴ El término review hace referencia a los artículos de revisión que siguen un método explícito para resumir la información que se dispone sobre un tema o problema de salud.



5. Materiales y métodos:

5.1) DISEÑO.

“Estudios de encapsulación de polifenoles del té: Propiedades y estabilidad”, se trata de un estudio experimental en el que se valora el proceso de la esferificación, desde un punto de vista analítico, utilizando 3 métodos para determinar si las esferas tienen capacidad de atrapar polifenoles en su interior y cuantificarlos, así como evaluar la estabilidad que presentan las esferas, midiendo el volumen y la cantidad de antioxidantes que liberan al medio a distintos valores de pH y temperatura.

5.2) MATERIALES:

EQUIPOS:

- Agitador de tubos **Raypa**.
- Agitador magnético **ACS-160 J. Jimeno S.A.**
- Balanza de precisión **GRAM**.
- Balanza **KERN 572**.
- Espectrofotómetro **Helios épsilon**.
- Agitador basculante **Labnet**
- pHmetro **CRISON**.

- Pipetas automáticas 20 200 y 1000 µl **Proline plus de Biohit**.
- Frigorífico **Fagor**.
- Equipo de Agua Elix **MILLIPORE**.
- Equipo de agua **Milli-Q**.
- Baño de agua **VELP Scientifica**.
- Vitrocerámica **Fagor**.
- Bombona de nitrógeno **PRAXAIR**.

MATERIAL FUNGIBLE:

- Vasos de precipitado de 50, 100, 250, 500 ml.
- Agitadores magnéticos.
- Varilla imantada para la extracción de imanes magnéticos.
- Tubos eppendorf de 1,5 y 2 ml.
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml.
- Tubos de ensayo con tapón.
- Puntas de pipeta automática.
- Pipetas pasteur.
- Plástico Parafilm.

- Probetas de vidrio de 50, 100, 250 y 1000 ml.
- Pipetas de plástico estériles de 25ml.
- Gradilla para tubos de ensayo.
- Botellas de vidrio de 50, 100 y 500 ml.
- Espátulas metálicas.
- Cubetas de poliestireno para espectrofotometría visible de 3 ml.
- Cuenco de vidrio.
- Tijeras metálicas
- Escurridor.



REACTIVOS QUÍMICOS:

- Alginato de sodio **Panreac**.
- Cloruro cálcico **Panreac**.
- Reactivo de Folin **PROLABO (VWR)**.
- Carbonato Sódico **SIGMA**.
- Ácido gálico **SIGMA**.
- Acetato de amonio **SIGMA**.
- Cloruro de cobre **SIGMA**.
- Etanol 96% **PROLABO (VWR)**.
- Neocuproína **SIGMA**.

- DPPH **SIGMA**.
- Trolox **SIGMA**.
- Metanol **Panreac**.
- Ácido cítrico **Panreac**.
- Ácido clorhídrico **Panreac**.
- Hidróxido de sodio **Panreac**.
- Fluoresceína **SIGMA**.
- Polifenol 60 **SIGMA**.

MATERIALES BIOLÓGICOS:

- Té Oolong de la marca comercial Twinings©.
- Té verde de la marca comercial Pompadour©.
- Mezcla de 3 té: verde, blanco y rojo de la marca comercial Hacendado©.

5.3) MÉTODOS:

5.3.1) PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Los extractos empleados en la realización de este estudio son muestras de té, de polifenon 60, de té verde esferificado y de polifenon 60 esferificado. Para la preparación de los té, se pesa 1 gramo de té, después se pone a hervir 100 ml de agua, cuando esta llega a su punto de ebullición se retira y se añade 1 gramo de té dejándolo reposar 3 minutos, finalmente se filtra varias veces para asegurar que no haya ningún residuo de hoja de té. En cuanto a la preparación de polifenon 60, realizamos una solución a 1 mg/ml añadiendo 100 ml de agua y 0,1 g del extracto de polifenon 60.

Uno de los objetivos principales de este estudio es comparar la cantidad de polifenoles de la muestra sin esferificar y de la muestra esferificada, para ver la eficacia del atrapamiento de las esferas, por tanto, esferificamos el té y el polifenon 60 por el método de esferificación directa, que explicamos a continuación.



5.3.2) ESFERIFICACIÓN.

- 1º Preparamos una solución de cloruro cálcico al 0,5%, para ello disolvemos 4 g de cloruro cálcico en 800 ml de agua.
- 2º Disolvemos 1 g de alginato sódico en 100 ml de la muestra de té o de polifenon 60 durante 30 minutos aproximadamente en agitación, para asegurar que está bien disuelto
- 3º Recogemos 15 ml de la muestra con el alginato y lo depositamos gota a gota en el baño de cloruro cálcico con la ayuda de una pipeta.
- 4º Se deja reaccionar durante aproximadamente 2 minutos y después recogemos las esferas con la ayuda de un escurridor.
- 5º Lavamos las esferas con agua y las secamos con papel de filtro.

5.3.3) PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

Seguidamente aplicamos los métodos espectrofotométricos: Folin – Ciocalteu, DPPH y CUPRAC en las muestras esferificadas, que se explicaran a continuación. Para realizar estos métodos cuyos resultados se miden por espectrofotometría, las muestras deben estar en estado líquido y para ello realizamos una solución de HCl 1N, NaOH 1N y ácido cítrico al 7% a pH7 que va a desintegrar las esferas de manera que pasan a estado líquido. De esta forma podemos medir con los métodos espectrofotométricos las respectivas absorbancias. Debemos de tener en cuenta que, al añadir ácido cítrico en la solución anterior para desintegrar las esferas, los valores de las absorbancias serán más bajos puesto que diluimos la muestra. Por ello medimos el volumen de las esferas creadas por desplazamiento, en nuestro caso 12 ml de esferas formadas y después la cantidad de citrato que echamos para disolverlas, 9 ml en nuestro caso. Siendo el resultado final un volumen de 21 ml, del cual 12 ml son de las esferas, por lo que la dilución sería de 21/12, es decir, el factor de corrección que debemos aplicar en los resultados de los diferentes métodos realizados con las muestras esferificadas es de 1,75.



5.3.4) DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO TOTAL MEDIANTE EL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU.

Los fenoles reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu dando un color azul característico para la mayoría de los fenoles. El reactivo de Folin se obtiene ya preparado de casas comerciales. Este reactivo es una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con restos fenólicos presentes en las proteínas (tirosinas) y en compuestos como ácido gálico y sus derivados, flavonoides, etc. El ácido fosfomolibdotúngstico, formado por las dos sales en medio ácido de coloración amarilla, se reduce por los grupos fenólicos y da lugar a un complejo de color azul intenso (T. Girbés, P. Jiménez, M. Córdoba & J. Tejero, 2014).

Para llevar a cabo la reacción, mezclamos 0,6 ml de Carbonato sódico al 7,5%, 0,2 ml de reactivo de Folin junto con 0,02 ml del extracto de la muestra y finalmente 680 μ l de agua Elix. La mezcla resultante se incuba 10 minutos a 50°C en un baño de agua.

Después se miden las absorbancias de las muestras a 760 nm, en el espectrofotómetro.

Para determinar el contenido fenólico de nuestra muestra realizamos una recta patrón con 20, 40, 60 y 80 μ l de ácido gálico 1 mM donde determinaremos los equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra analizada

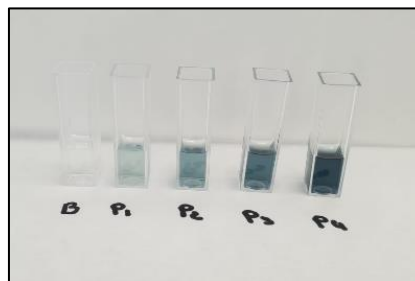


Figura 7. Curva patrón de ácido gálico 1mM, método Folin-Ciocalteu.

5.3.5) DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO CUPRAC.

El siguiente método espectrofotométrico determina la capacidad antioxidante de algunos alimentos y de preparaciones ricas en polifenoles. Se usa el reactivo Cu(II)-neocuproína[Cu(II)-Nc] como agente oxidante cromogénico. Se determina el contenido de polifenoles que se oxidan, reduciendo el Cu(II) de la neocuproína a Cu(I), lo que aporta una coloración que se mide a una absorbancia de 450nm en el espectrofotómetro (T. Girbés, P. Jiménez, M. Córdoba & J. Tejero, 2014).

Para llevar a cabo la reacción se mezclan 0,02 ml de la muestra, 1 ml de cloruro de cobre 10 mM, 1 ml de acetato de amonio 1M a pH 7, 1 ml de neocuproína 7,5 mM y 980 μ l de agua Elix. Después se deja 60 minutos en ausencia de luz y posteriormente se determinan las absorbancias a 450 nm en un espectrofotómetro.

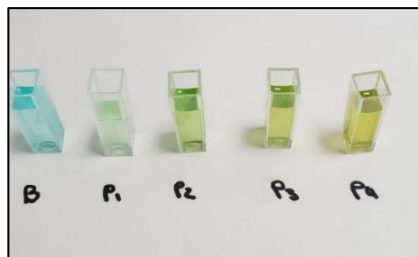


Figura 8. Curva patrón de ácido gálico 1mM en etanol, método CUPRAC.



En este estudio previamente se ha realizado una recta patrón de ácido gálico 1 mM en etanol con volúmenes 20, 40, 60, 80 μ l y extrapolando la absorbancia de nuestras muestras en la recta, determinaremos los equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra analizada.

6.3.4) DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA MEDIANTE EL MÉTODO DPPH.

El último método espectrofotométrico utilizado en este estudio es el del radical DPPH, este radical orgánico sirve para medir la capacidad antioxidante. El radical tiene una coloración púrpura, cuantificable a 515 nm, que se pierde progresivamente en presencia de sustancias antioxidantes (Brand – Williams, Cuvelier et al 1995).

Para llevar a cabo la reacción se mezclan 0,02 ml de muestra, 0,08 ml de metanol al 80% y 2,9 ml de DPPH 0,1 mM en metanol y se deja reposar 10 minutos. Después se mide la absorbancia a 515 nm.

Como en los anteriores estudios creamos una recta patrón, en este caso de Trolox 1 mM con volúmenes de 25, 50, 75 y 100 μ l y extrapolando los valores de la absorbancia en recta, tendremos los equivalentes de Trolox por gramo de muestra analizada.

5.3.5) MEDIDA DE LA EFICACIA DE ATRAPAMIENTO Y ESTABILIDAD.

Para medir la eficacia del atrapamiento de las esferas, usamos los 3 métodos anteriormente citados en muestras de Té verde, Polifenon 60, Té verde esferificado y Polifenon 60 esferificado. De esta forma compararemos las actividades antioxidantes de las muestras sin esferificar con las esferificadas, tomando como referencia los valores sin esferificar que serían el 100% del contenido fenólico que las esferas podrían captar y se comparan con los resultados del contenido fenólico en las muestras esferificadas. Finalmente, a través de una regla de 3 se calcula que porcentaje de antioxidantes que han captado las esferas con respecto a la muestra sin esferificar.

Para medir la estabilidad de las esferas, se crean esferas de Polifenon 60 y se someten a unas condiciones de PH 6,2 y pH 3 y entre 19-20°C y 4-6°C de temperatura respectivamente. De esta forma podemos concluir que condiciones son óptimas para aprovechar durante un mayor tiempo nuestras esferas, además de aportarnos indicios sobre qué tipo de alimentos pueden o no esferificarse. Realizamos un pH ácido de 3 simulando la esferificación de vinagres y un pH de 6,2 para ver el comportamiento de las esferas con alimentos más neutros. La medida de la estabilidad se realiza midiendo la cantidad de líquido que las esferas liberan al exterior durante un periodo de 6 horas, controlando el volumen que las esferas han liberado a tiempo 0, 3 y 6 horas aplicando a ese volumen los 3 métodos espectrofotométricos ya citados y así también



calcular en que proporción se van liberando los polifenoles del té. Después se amplía la medida del volumen liberado hasta las 72 horas. Al ser periodos de tiempo largos, se crearon atmósferas de nitrógeno para guardar las esferas y evitar el efecto oxidativo en los polifenoles

5.3.6) ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA COCINA MOLECULAR EN UN GRUPO DE POBLACIÓN.

Se realiza un modelo de encuesta a través de la aplicación Google formularios. La muestra poblacional está compuesta por 184 varones y mujeres de edades comprendidas entre 18-70 años, la encuesta estuvo activa 3 días. Compuesta por 4 preguntas que se verán más adelante.

5.4) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todas las determinaciones en nuestras muestras se han hecho de forma triplicada con el objetivo de corregir el error del pipeteado, por ello los resultados que mostraremos a continuación son la media de 3 medidas. Con este estudio no se busca atribuir ningún valor concreto a las muestras, sino comparar dos tipos de muestras, las esferificadas con el alimento sin esferificar. En el anexo 1 mostramos dos tablas con todos los valores en general de este estudio donde se representa la media y la desviación estándar de dichos valores.

6. Resultados.

6.1 ENSAYO DE FORMACIÓN DE ESFERAS A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CLORURO CÁLCICO Y ALGINATO.

- **Con cloruro cálcico al 0.25% y alginato al 0,25%:** Se forman esferas pequeñas, de forma irregular. Al tacto son muy débiles ya que la pared que se ha formado es muy fina. Con una cantidad de 15 ml de alginato al 0,25% se formaron 6,9 gramos de esferas, se contaron **266 esferas** formadas, por lo que cada esfera tiene un peso medio de **0,03 g**. El diámetro de 10 esferas es de 3,2 cm, por lo que podemos sacar el radio medio de cada esfera que es de 0,16 cm y calcular el volumen y la densidad de las esferas:

- Volumen: $\frac{4}{3} * \pi * (0,16 \text{ cm})^3 =$

0,02 cm³

- Densidad: $0,03\text{g}/0,02\text{cm}^3 = 1,5$

g/cm³

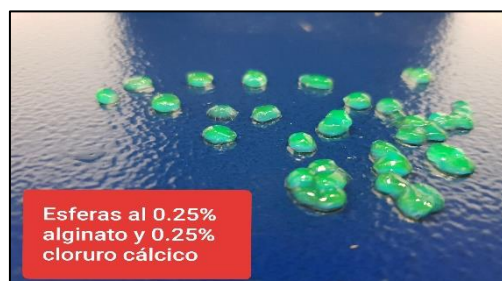


Figura 9. Esferificaciones Alginato 0,25% en Cloruro cálcico al 0,25%. Foto original tomada en el laboratorio

- **Con cloruro cálcico al 0,25% y alginato al 0,5%:** Se observa un mayor tamaño de las esferas, más redondas y sin tantos bordes irregulares. Son un poco más manipulables que las anteriores, aunque se rompen con una leve presión de los dedos. Con una cantidad de 15 ml de alginato al 0,5% se formaron 12,56 gramos de esferas, se contaron **266 esferas** formadas, por lo que cada esfera tiene un peso medio de **0,05 g**. El diámetro de 10 esferas es de 3,7 cm, por lo que el radio de cada esfera es de 0,18 cm y con ello calcular:

- Volumen: $\frac{4}{3} * \pi * (0,18 \text{ cm})^3 =$

0,024 cm³

- Densidad: $0,05 \text{ g}/0,024 \text{ cm}^3 = 2,08$

g/cm³



Figura 10. Esferificaciones Alginato 0,5% en Cloruro cálcico al 0,25%. Foto original tomada en el laboratorio



- **Con cloruro cálcico al 0,25% y alginato al 1%:** Lo más destacable es que el tiempo de formación con estas concentraciones es inmediato. Se observan esferificaciones prácticamente de forma perfecta, de mayor tamaño. Son resistentes a la manipulación, se pueden escurrir bien y secarlas con papel de filtro, lo que demuestra su estabilidad. Con 15 ml de alginato al 1% se formaron 14,76 gramos de esferas, se contaron 263 esferas formadas, el peso medio de cada esfera es de **0,06 g**. El diámetro de 10 esferas es de 4,5 cm, por lo que el radio de cada esfera es de 0,22 cm:

- Volumen: $\frac{4}{3} * \pi * (0,22 \text{ cm})^3 =$

0,044 cm³

- Densidad: $0,06\text{g}/0,044\text{cm}^3 =$ **1,36**

g/cm³



Figura 11. Esferificaciones Alginato 1% en Cloruro cálcico al 0,25%. Foto original tomada en el laboratorio

- **Con cloruro cálcico al 0,25% y alginato al 2%:** Prácticamente en cuanto a morfología son similares a las anteriores esferas e igualmente su tiempo de formación es inmediato. Estas esferas presentan un inconveniente que interesa mucho desde el punto de vista gastronómico y es que a esta concentración de alginato se forma una esfera demasiado gomosa y casi gelificada en su totalidad, pues apretando con los dedos y rompiendo la esfera queda muy poco líquido en su interior, lo que resultaría un gran fallo desde el punto de vista gastronómico recurrir a concentraciones de alginato tan elevadas porque por definición lo que se busca es una esfera semisólida en su parte externa y líquida en el interior para que en la boca surja ese efecto explosión. Con 15 ml de alginato al 2% se formaron 16,92 g de esferas y se contaron 250 esferas formadas, por lo que cada esfera tiene un peso medio de **0,07 g**. El radio de cada esfera es de 0,245 cm:

- Volumen: $\frac{4}{3} * \pi * (0,245 \text{ cm})^3 =$

0,061 cm³

- Densidad: $0,07 \text{ g}/0,061 \text{ cm}^3 =$ **1,098**

g/cm³

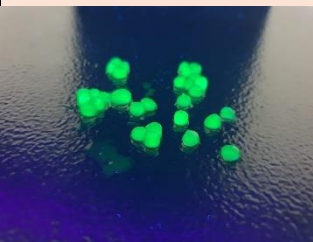
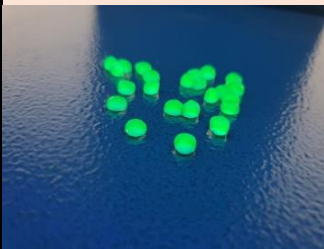

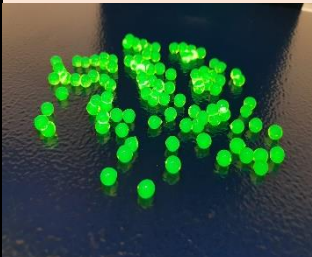


Figura 12. Esferificaciones Alginato 2% en Cloruro cálcico al 0,25%. Foto original tomada en el laboratorio



Podemos observar como a medida que se va incrementando la concentración de alginato, las esferas aumentan tanto de peso como de volumen ya que captan más líquido y además a altas concentraciones de alginato, como se ha mencionado se forma una membrana más gruesa en las esferas que hace que pesen más. Esto es favorable hasta cierto punto ya que nos interesa que la pared esté bien formada y nos permita tener una esfera lo más esférica posible y que aguante en el tiempo, pero también una excesiva gelificación supone tener como resultado una esfera demasiado gomosa, sin apenas líquido en el interior. Por lo que hasta el momento podemos determinar que la concentración ideal de alginato para formar las esferas es del 1%.

Se repitió el mismo procedimiento, pero incrementando la concentración de cloruro cálcico al 0,5%, de esta forma determinamos la influencia que tiene la concentración de cloruro cálcico en la formación de esferas:

<p>Con cloruro cálcico al 0,5% y alginato al 0,25%:</p> <p>Peso medio de cada esfera: 0,044 g. Radio de cada esfera: 0,22 cm.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Volumen: $\frac{4}{3} * \pi * (0,22 \text{ cm})^3 =$ 0,044 cm³ • Densidad: 0,044 g/0,044 cm³= 1 g/cm³  <p>Figura 13. Esferas cloruro cálcico 0,5% y alginato 0,25%</p>	<p>Con cloruro cálcico al 0,5% y alginato al 0,5%:</p> <p>Peso medio de cada esfera: 0,049 g. Radio de cada esfera: 0,2225 cm.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Volumen: $\frac{4}{3} * \pi * (0,2225 \text{ cm})^3 =$ 0,048 cm³ • Densidad: 0,049 g/0,048 cm³= 1,02 g/cm³  <p>Figura 14. Esferas cloruro cálcico 0,5% y alginato 0,5%</p>
<p>Con cloruro cálcico al 0,5% y alginato al 1%:</p> <p>Peso medio de cada esfera: 0,053 g. Radio de cada esfera: 0,23 cm.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Volumen: $\frac{4}{3} * \pi * (0,23 \text{ cm})^3 =$ 0,051 cm³ • Densidad: 0,053 g/0,051 cm³= 1,04 g/cm³  <p>Figura 15. Esferas cloruro cálcico 0,5% y alginato 1%</p>	<p>Con cloruro cálcico al 0,5% y alginato al 2%:</p> <p>Peso medio de cada esfera: 0,062g. Radio de cada esfera: 0,24 cm.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Volumen: $\frac{4}{3} * \pi * (0,24 \text{ cm})^3 =$ 0,06 cm³ • Densidad: 0,062 g/0,06cm³= 1,03 g/cm³  <p>Figura 16. Esferas cloruro cálcico 0,5% y alginato 2%</p>



La diferencia de aumentar un 0,25% más la concentración de cloruro cálcico, nos ayudó a ver que a la concentración de 0,5% se formaban unas esferas más perfectas y voluminosas, formándose una mejor membrana de las esferas. Pero los resultados no tenían mucha diferencia con respecto a los resultados al 0,25%, por lo que se concluye que a una concentración superior al 0,25% de cloruro cálcico ya se formarían esferas estables pero que se puede aumentar hasta 0,5% para una mejor formación. Lo que sería determinante es la concentración de alginato que al 0,25% y al 0,5% son esferas demasiado débiles y al 2% demasiado gomosas y gelificadas, por lo que al 1% de alginato se forman esferas perfectas, manipulables, ni excesivamente gomosas, ni débiles.

Por tanto, determinamos nuestra concentración ideal en 0,5% de cloruro cálcico y 1% de alginato y estas concentraciones son las que usaremos para nuestros posteriores estudios.

6.2) MEDIDA DE LA EFICACIA DEL ATRAPAMIENTO DE POLIFENOLES DEL TÉ:

6.2.1) ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE 3 TIPOS DE TÉS

Realizamos un ensayo para analizar el tipo de té que tiene más antioxidantes. Los té utilizados han sido: Un té negro, un tipo de té mezcla de 3 tipos: blanco, verde y rojo, y un té verde. Usamos el método de Folin Ciocalteu y extrapolamos los valores de la absorbancia en la recta patrón que se hizo previamente y los resultados son los siguientes:

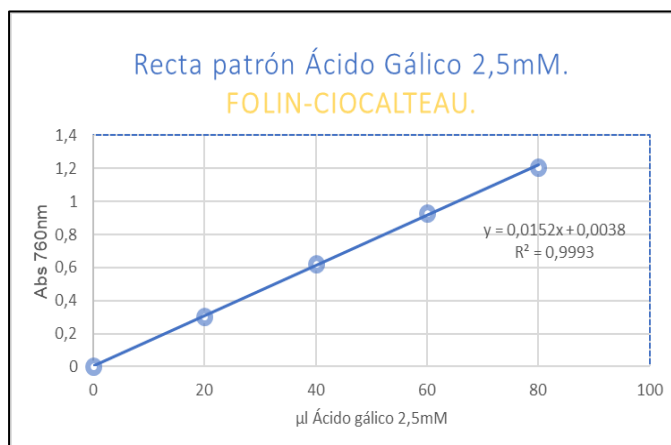


Figura 17. Recta patrón de ácido gálico 1Mm.

Tipo de té:	mg de Gálico 2,5mM/g de muestra.
Té negro.	106,2
Mezcla de 3 té.	97,7
Té verde.	157,2

Tabla 2. Resultados de la cantidad de fenoles de 3 tipos de té: té verde, té mezcla y té negro.

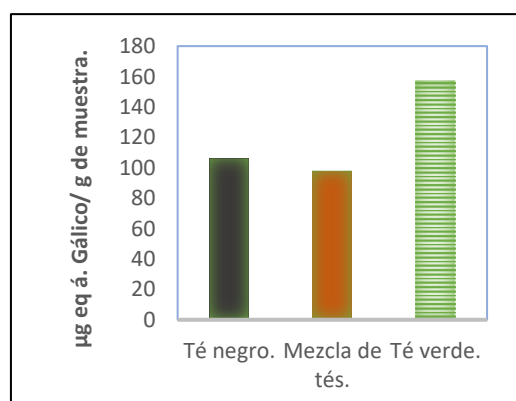


Figura 18. Gráfico de niveles de polifenoles de diferentes té.



Como cabía esperar el té verde es el que más fenoles tiene ya que es un té que no ha sufrido un proceso de fermentación como el té negro.

Para nuestros estudios posteriores, por tanto, vamos a escoger este tipo de té y extracto de polifenon 60. La razón es hacer el estudio con dos muestras con contenido alto en fenoles para que nos dé una señal de atrapamiento alta. El polifenon 60 nos dará una señal más alta cuando midamos la eficacia del atrapamiento de los polifenoles ya que su concentración en catequinas es más alta que la del té verde para infusión puesto que es un extracto que contiene un porcentaje igual o mayor al 60% en catequinas, entonces los cambios que experimentemos en las esferas con polifenon 60 nos permitirá ver cambios más atenuados.

6.2.2) EFICACIA DE ATRAPAMIENTO DE ESFERAS DE TÉ VERDE Y DE POLIFENON 60:

Determinación del contenido fenólico. Método Folin-Ciocalteu.

En cuanto al contenido fenólico del té verde, los 157,2 mg de eq de ácido gálico/ g de té verde, representa el contenido fenólico total que las esferas podrían retener en su interior, pero la realidad es que, al realizar el proceso de esferificación, las esferas retienen 94,3 mg de equivalentes de ácido gálico/g de té verde en su interior. Con esto podemos concluir que las esferas muestran una eficacia de atrapamiento de un 60,1% y que por tanto un 39,9% de los fenoles se pierden en este proceso.

En cuanto al polifenon 60, que como podemos ver da una señal mucho más alta en contenido de fenoles ya que es un concentrado de catequinas de té verde, de 811,3 mg de equivalentes de ácido gálico logramos encapsular 612,4 mg de eq de ácido gálico, lo que se traduce en una eficacia de atrapamiento de las esferas en torno a un 75,49%.

Muestras	mg de Gálico2,5mM/g de muestra.
Té verde.	157,2
Té verde esferificado.	94,3
Polifenon 60.	811,3
Polifenol 60 esferificado.	612,4

Con estos resultados podemos dilucidar que la eficacia de atrapamiento de las esferas, depende de la cantidad de compuestos fenólicos que tenga la sustancia a encapsular y que se sitúa en torno a un 60-75% aproximadamente, también depende de las condiciones en que se haya realizado la encapsulación y el tiempo que pase desde que se obtiene la muestra, hasta que se logra encapsular, seguramente en este proceso hayamos perdido por efecto oxidativo del oxígeno, fenoles presentes en la muestra.

Tabla 3. Resultados de la cantidad de fenoles de muestras esferificadas y sin esferificar.



Determinación de la capacidad antioxidante. Método CUPRAC.

Con el siguiente método denominado CUPRAC podemos ver que en el proceso de esferificación se pierde en torno al 61-62% de la capacidad antioxidante que presenta el té verde en infusión. Esto puede deberse como hemos visto con anterioridad a que la capacidad de atrapamiento que presentaban las esferas de té representaba en torno un 60% del contenido total de fenoles y además debemos de tener en cuenta que a través de las membranas de las esferas el oxígeno entra en el interior y puede oxidar los fenoles traduciéndose en un descenso de su capacidad antioxidante.

El polifenol 60 esferificado representa un 85,22% de la capacidad antioxidante con respecto a la solución de polifenol 60 que tenemos inicialmente, por lo que pierde en torno al 15% de la capacidad antioxidante en el proceso de esferificación. La diferencia con respecto al té verde puede deberse a que la infusión de té verde se dejaba reposar hasta que estuviese a temperatura ambiente, empleando ahí un tiempo donde el oxígeno puede oxidar los compuestos fenólicos, cosa que no pasa con la solución de polifenol 60 que se prepara con agua y polifenol a temperatura ambiente y no hay que esperar a que se enfríe.

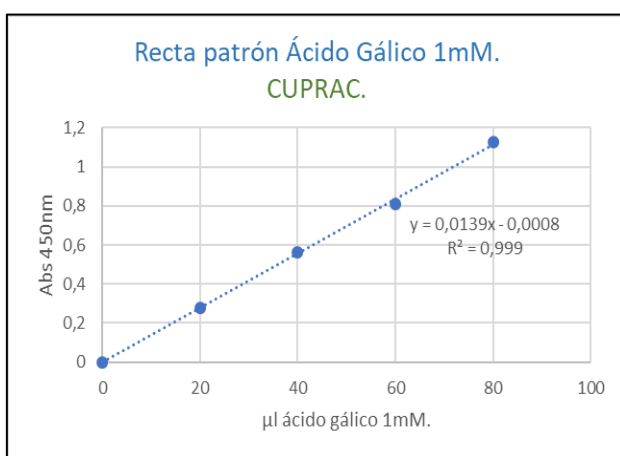


Figura 19. Recta patrón método CUPRAC.

Muestras	mg Gálico1mM/g de muestra.
Té verde.	88,4
Té verde esferificado.	34
Polifenon 60.	168,74
Polifenon 60 esferificado.	143,65

Tabla 4. Resultados de la actividad antioxidante de muestras esferificadas y sin esferificar.



Determinación de la capacidad antirradicalaria. Método del DPPH.

Al determinar la capacidad antirradicalaria por el método del DPPH, como cabe esperar, la capacidad antirradicalaria es menor en las muestras esferificadas que en las muestras sin esferificar. Este indicador de la capacidad antioxidante sigue la misma línea que las dos pruebas anteriores. En muestras de té verde esferificado se ve un descenso mayor de la capacidad antirradicalaria, puesto que las esferas con respecto al té sin esferificar representan un 8,4% de esta capacidad, como se ha comentado anteriormente este descenso tan grande puede deberse al tiempo que conlleva el proceso de preparación del té, puesto que hay que dejarlo enfriar y también al tiempo que tarda en disolverse el alginato en el té. Es un periodo de tiempo donde el oxígeno actúa oxidando los polifenoles. Como hemos visto las esferas de polifenon 60 presentan un 33,3% de la capacidad antirradicalaria que presenta la solución de polifenon 60 sin esferificar, la razón puede ser que el tiempo para preparar las esferas de polifenon 60 es menor que para preparar esferas de té ya que el polifenon 60 parte de una solución de agua fría y no conlleva un periodo de enfriamiento de la muestra.

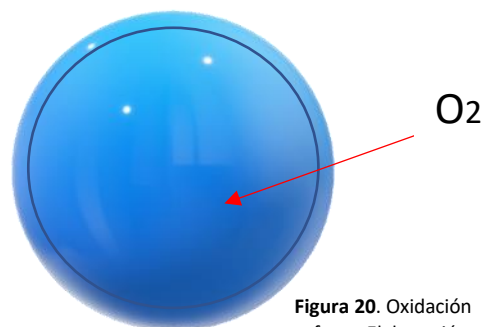


Figura 20. Oxidación esferas. Elaboración propia.

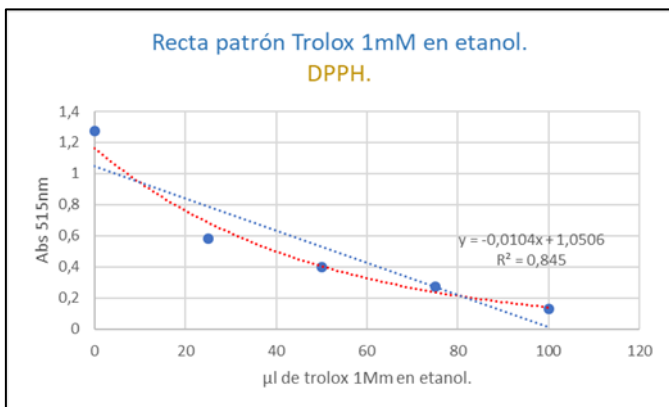


Figura 21. Recta patrón Trolox método DPPH. Elaboración propia.

Muestras	mg de trolox1mM/g de muestra.
Té verde.	209,8
Té verde esferificado.	17,6
Polifenon 60.	671,36
Polifenon 60 esferificado.	223,7

Tabla 5. Resultados de la capacidad antirradicalaria de muestras esferificadas y sin esferificar.



6.3) MEDIDA DE LA ESTABILIDAD EN FUNCIÓN DE DISTINTOS VALORES DE PH Y TEMPERATURA.

Desde el punto de vista de la restauración colectiva, es muy importante ver en qué condiciones son más estables las esferas y pierden menos contenido, por ello vamos a realizar un primer ensayo donde realizamos esferas de polifenon 60 (1mg/ml) y vemos su estabilidad a temperatura ambiente y en nevera. Después hacemos un segundo ensayo modificando el pH de dichas esferas, hasta tener un valor de pH de 3 y las sometemos a las mismas condiciones de temperatura que las anteriores. Como se trata de un ensayo con un intervalo de tiempo largo, para evitar el efecto oxidativo de los polifenoles se crearon atmósferas artificiales de nitrógeno.

6.3.1) ESFERAS DE POLIFENON 60 A PH 6,2 Y PH 3 Y A TEMPERATURA AMBIENTE (19-20°C) Y TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN (4-6 °C).

Como podemos observar en la figura 22⁵, partimos de un volumen de esferas de 12 ml. A las 3 horas las esferas conservadas a temperatura ambiente (19-20°C) y con pH 6,2 pierden 1,2 ml de su contenido encapsulado, mientras que las esferas conservadas a temperatura de refrigeración (4-6°C) a ese mismo pH pierden 0,5 ml de su contenido encapsulado. A las 6 horas las esferas conservadas a temperatura ambiente y pH 6,2 pierden 1,6 ml de su contenido y sin embargo a ese mismo pH, pero almacenadas a temperatura de refrigeración no experimentan pérdida de estabilidad ya que pierden 0,5 ml, mismo valor que a las 3 horas. Para ver este efecto de la temperatura en un tiempo más prolongado, se dejaron las esferas durante 72 horas y se observa que las esferas mantenidas a temperatura ambiente y pH 6,2 liberan un total de 3,6 ml y las refrigeradas a dicho pH solamente 0,8 ml. Con esto podemos concluir que la refrigeración conserva las esferas puesto que fueron almacenadas varios días y solamente perdían una pequeña cantidad, mientras que a temperatura ambiente van perdiendo su volumen más rápidamente en función del tiempo. Esto es muy importante para la restauración colectiva ya que para establecimientos que realicen este tipo de cocina es muy importante saber en qué condiciones pueden almacenar durante un tiempo mayor estas esferas y así permitir crear más cantidad de estas, refrigerarlas y usarlas en días posteriores. Modificando el pH de las esferas a un pH ácido de 3 podemos observar como las esferas conservadas en refrigeración pierden 2,5 ml a las 3 horas y 3 ml a las 6 horas, mientras que las conservadas a temperatura ambiente pierden 4 ml a las 3 horas y 5,6 ml a las 6 horas. Con esto podemos concluir que es poco eficaz esferificar alimentos que tengan un pH ácido ya que en poco tiempo las esferas se desintegran más rápidamente y pierden mucho volumen.

⁵ En la figura 22 se presentan las curvas de pérdida de volumen que experimentan las esferas a distintos valores de pH y temperatura.

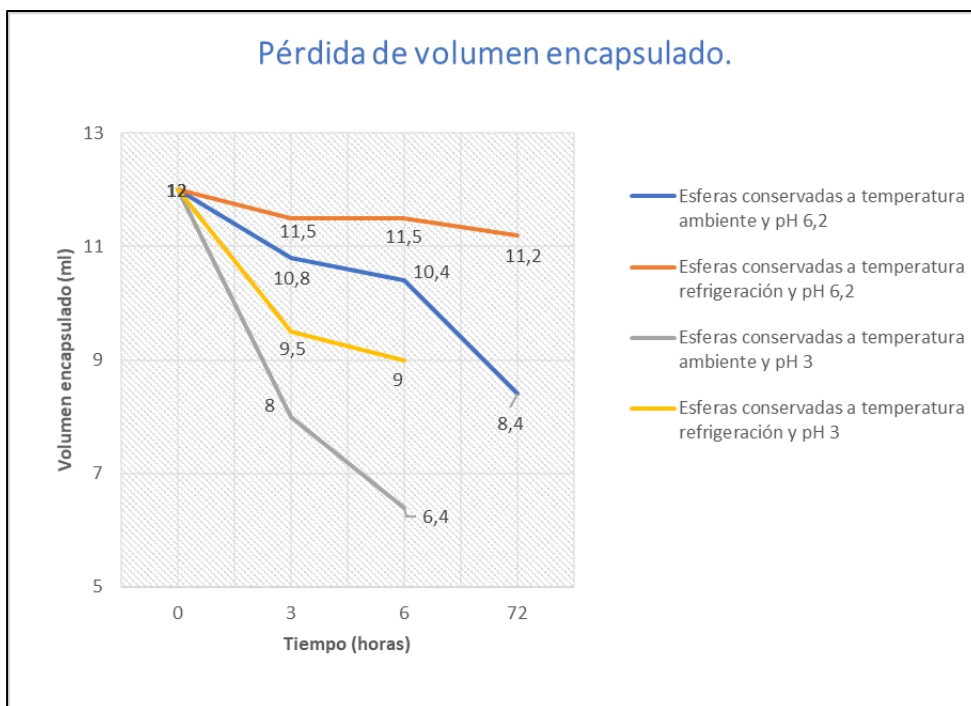


Figura 22. Pérdida de volumen encapsulado a diferentes valores de pH y temperatura.

En la figura 23⁶, podemos observar la variación de la actividad antioxidante de las esferas a temperatura de refrigeración a las 3 horas y a las 6 horas, para ello mediamos la actividad antioxidante del líquido que las esferas perdían. Hemos visto en la figura 22 como las esferas iban perdiendo volumen y por tanto al perder volumen, las esferas iban perdiendo fenoles de su interior, en proporción a ese volumen perdido. Las esferas conservadas a temperatura ambiente se desintegraban más que las refrigeradas y por tanto tendremos una mayor pérdida de fenoles en las conservadas a temperatura ambiente que en las refrigeradas.

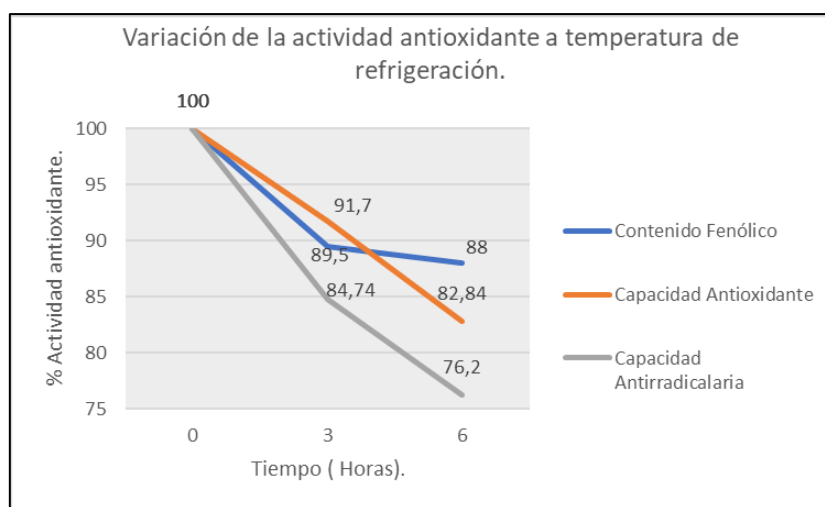


Figura 23. Variación de la actividad antioxidante de las esferas a temperatura de refrigeración.

⁶ En la presente gráfica el eje de ordenadas se representa desde 75 simulando un corte en dicho eje para que la gráfica pueda observarse mejor. Este efecto también se lo hemos dado a las gráficas 22 y 24.



En la gráfica 24 podemos observar la variación de la actividad antioxidante de las esferas a temperatura ambiente a las 3 horas y a las 6 horas.

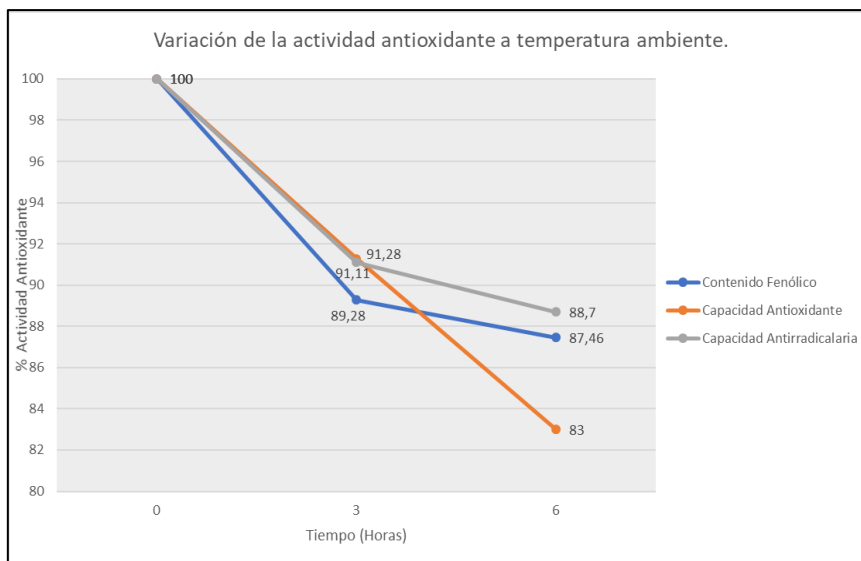


Figura 24. Variación de la actividad antioxidante de las esferas a temperatura ambiente.

La variación de la actividad antioxidante como podemos observar es similar en ambos casos, es decir, por ml de volumen perdido pierden una cantidad similar de fenoles, pero como las refrigeradas solo se pierden 0,5 ml en las 6 horas, aunque pierdan casi la misma cantidad de fenoles por ml de muestra, el volumen perdido es menor y por tanto pierden menos fenoles. Por lo que parece que la pérdida de fenoles es proporcional al volumen perdido por las esferas.



6.4) ANÁLISIS DE LA OPINIÓN SOBRE LA COCINA MOLECULAR EN UN GRUPO DE POBLACIÓN.

Como hemos dicho anteriormente, encuestamos a un grupo de 184 personas de edades comprendidas entre los 18 70 años, a través de la aplicación Google formularios y se obtuvieron los siguientes resultados:

1º ¿Has probado alimentos que han sufrido un proceso de cocina molecular, como esferificaciones? En caso negativo indica si te gustaría hacerlo.

2º ¿Crees que el alimento se deteriora nutricionalmente con estos procesos?

3º De haber respondido si en la pregunta anterior ¿Crees que estas técnicas pueden ser dañinas para la salud?

Respuestas a la pregunta 1º.

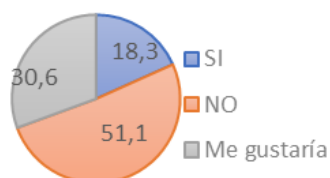


Figura 25: Respuesta 1º de la encuesta

Respuestas a la pregunta 2º.

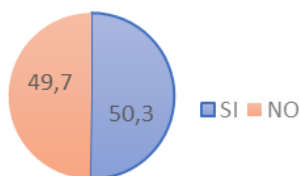


Figura 26: Respuesta 2º de la encuesta

Respuestas a la pregunta 3º

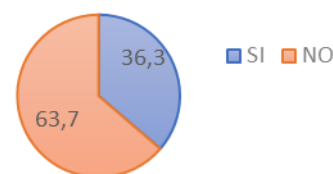


Figura 27: Respuesta 3º de la encuesta

En la pregunta número 4 se pedía una breve opinión sobre la cocina molecular, las respuestas más comunes entre la muestra fueron que la cocina molecular les parece muy innovadora y que con ella se puede sacar un gran partido a ciertos alimentos. Otros opinan que como la cocina tradicional no hay ninguna. Muchos de los encuestados hacen referencia a que creen que podría ser perjudicial para la salud y que en la actualidad el crecimiento de la incidencia de ciertas patologías es debido al mal uso que se hace de la ciencia, ya que piensan que los productos que se usan para ello son dañinos para la salud. Y, por último, otra de las respuestas más registradas es que el alimento sufre mucho en este proceso ya que se manipula mucho y entonces creen que esta cocina no aportaría ningún tipo de beneficios.

Uno de los objetivos de este trabajo es aclarar las dudas que tiene la población frente a este tipo de cocina. Muchas personas no se atreven a probarla porque debido a la falta de información sobre el tema se hacen muchas especulaciones que crean un miedo en la población.



7. Discusión.

El inicio del proceso de esferificación donde se elige que concentración de cloruro cálcico y de alginato tendrán las soluciones para formar las esferas, ya es un punto muy importante a la hora de realizar este proceso ya que dependiendo de que concentraciones se usen se formarán esferas más o menos de forma perfecta, más o menos duraderas y esto es importante no solo por sacar el máximo partido visualmente a la esfera, sino porque como ya hemos visto a concentraciones de alginato más altas, 2% y superiores, se forman esferas muy gomosas ya que se gelifica todo el contenido líquido del interior de la esfera lo que afectaría mucho a la sensación en el paladar. A mayor cantidad de polisacárido y fuente de calcio se consiguen geles más consistentes y gomosos para los que habrá que aplicar una mayor fuerza para romperlos (Urias et al., 2019 y Barros., 2012). Estas concentraciones más altas podían tener implicación en la industria alimentaria para encapsular compuestos bioactivos tales como fitoesteroles (Claudia Sofía Solis, 2016). En este estudio no se tuvo control ni de temperatura ni de pH.

Otro parámetro muy importante y que nos interesa desde el punto de vista nutricional, es si este proceso de esferificación tiene capacidad de encapsular efectivamente en su interior nutrientes y ver si este proceso de cocina molecular los afecta y en qué proporción se pierden durante este proceso. Por ello como prueba de concepto encapsulamos los polifenoles de té verde y polifenon 60 y las esferas mostraban una eficacia de atrapamiento en torno a 60-75% de los polifenoles que contenían las muestras sin esferificar. En la bibliografía encontramos un artículo de Claudia Sofía Solis, en 2016 donde se describe la obtención de esferas de fitoesteroles con una eficacia de atrapamiento del 70%.

En el ámbito de la restauración colectiva interesa saber en qué condiciones podemos aprovechar durante un tiempo más prolongado las esferas y ver si existen condiciones que nos permitan almacenar para usarlas posteriormente. En nuestro estudio concluimos que las esferas eran más estables a pH 6,2 que a pH 3 y además que las esferas se conservan mejor cuando se almacenan a 5°C que a temperatura ambiente. En productos de alta acidez, el alginato de sodio es menos útil ya que pierde su estabilidad, por ello en productos ácidos puede usarse alginato de propilenglicol (G.C. Avendaño – Romero., 2013).

Podemos ver como los resultados de este estudio concuerdan con los resultados de los pocos estudios similares que podemos encontrar acerca de la esferificación. Cabe destacar que en la actualidad no existen estudios de encapsulación de polifenoles del té en donde se mida tanto la eficacia de atrapamiento como la estabilidad, medida como la liberación de polifenoles al medio.



En este estudio también se analiza la opinión que tiene la población sobre la cocina molecular.

En este punto se observa como un gran porcentaje de la población, no prueba estas técnicas cuando sale a comer fuera o incluso en su propia casa por miedo a que puedan ser perjudiciales para la salud y por qué los alimentos se deterioran mucho desde el punto de vista nutricional.

En nuestro caso se usa E 400 (ácido algínico), un aditivo que no es absorbido por el cuerpo, pero en grandes cantidades puede impedir la absorción de oligoelementos, por ello está prohibido en alimentación de lactantes y niños pequeños. En mi opinión usar aditivos como ingredientes en alimentos, no tiene por qué significar un riesgo contra de la salud de las personas puesto que se usan en pequeñas cantidades y además la cocina molecular no es habitual en la dieta diaria de una persona, es más una experiencia muy puntual.

Dada la premura de tiempo no se han podido realizar muchos experimentos. Pero los resultados indican claramente que las esferas de alginato retienen efectivamente los polifenoles en las condiciones estudiadas. Por otro lado, las esferas tienen suficiente estabilidad como para mantener el estado de reducción de los polifenoles dentro de la esfera.



8. Conclusiones.

- El proceso de esferificación directa se realiza preparando una solución de alginato y el alimento a encapsular y añadiéndola por goteo a una solución de cloruro cálcico.
- La concentración correcta para conseguir unas esferas regulares es de 0,5% de cloruro cálcico y 1% de alginato. Desde el punto de vista gastronómico no interesa superar esta concentración ya que a concentraciones más altas se gelifica en totalidad el contenido de la esfera perdiendo el concepto de explosión en boca propio de la esferificación.
- La esferificación como técnica de la cocina molecular, tiene la capacidad de conservar los nutrientes en el interior de las esferas. Las esferas de té presentaron una eficacia de atrapamiento del 60-75% del contenido fenólico.
- La refrigeración es una buena técnica para la conservación de esferas puesto que nos permite almacenarlas hasta 3 días en nevera. Por el contrario, el almacenamiento a temperatura ambiente y superior supone una desestabilización de las esferas, provocando la liberación del contenido.
- La esferificación a pH 3 provoca la formación de esferas más inestables que a pH 6,2.
- La variación de la actividad antioxidante de las esferas a medida que van liberando su contenido, es proporcional al volumen que liberan y no hay diferencias significativas entre almacenarlas a temperatura ambiente o en nevera.
- Las almacenadas a temperatura ambiente pierden más antioxidantes porque pierden más volumen no por el hecho de estar a temperatura ambiente.
- La cocina molecular va siendo cada vez más conocida por la población, pero todavía existen demasiadas incógnitas y miedos por parte de la sociedad ante esta tendencia.



9. Bibliografía.

1. Aguirre, A. (2016). Esferificación inversa de bebida nutricional sabor fresa, desarrollada para el beneficio de la niñez intermedia y determinación de su tiempo de vida útil en condiciones adecuadas [Tesis]. Universidad Rafael Landívar, Guatemala de la asunción.
2. Aminah Jatoi, Neil Ellison, Patrick A. Burch, Jeff A. Sloan...(2003). A Phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma. *Cancer*. 97(6): 1442-1446.
3. Andoni Luis Aduriz. (s.f.). Recuperado 7 abril, 2019, de <https://www.mugaritz.com/es/andoni-luis-aduriz/co-1276143453/>
4. Baliga, M. S., S. Meleth & S. K. Katiyar. (2005). Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metástasis.specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo Systems. *Clin Cancer Res*. 11. 1918-27.
5. Barros R. (2012). Estudos dos fatores que influenciam os atributos de esferas de alginato. [Tesis] Universidad de de Aveiro. Aveiro.
6. Brand-Williams W, Cuvelier M.E, Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food sci. Technol*, 28, 25-30.
7. Bulli, E. L. (2012). videos y recetas. Recuperado 3 abril, 2019, de <http://www.albertyferranadria.com/esp/videos-y-recetas-sferificacion.html>
8. Chung, F.L. (1999). The prevention of lung cancer induced by a tobacco-specific carcinogen in rodents by green and black tea. *Proc Soc Exp Biol Med*, 220, 244-8.
9. G. C. Avendaño- Romero, A. López- Malo y E. Palou. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimento. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 7-1: 87-96.
10. Historia 1998-2002. (s.f.). Recuperado 6 abril, 2019, de <http://elbulli.com/historia/index.php?lang=es&seccion=5>
11. Islam Rady, Hadir Mohamed, Mohamad Rady, Imitiaz A. Siddiqui, Hasan Mukhtar. (2018) Cancer preventive and therapeutic effects of EGCG, the major polyphenol in green tea. *Egyptian journal of basic and applied sciences*, Vol 5(1): 1-23.
12. Katiyar, S. K., M. S. Matsui, C. A. Elmets & H. Mukhtar. (1999). Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatequin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem photobiol*, 69, 148-53.
13. Katiyar, S., C. A. Elmets & S. K. Katiyar. (2006). Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *J Nutr Biochem* (2006).



14. Laurie, S. A., Miller, V. A., Grant, S. C., Kris, M. G. & Ng, K. K. (2005). Phase I study of green tea extract in patients with advanced lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 55, 33-38.
15. Lupo Pasin, B. (2014). Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales [Tesis]. Universitat de Barcelona. Barcelona.
16. Lyn-Cook, B. D., T. Rogers, Y. Yan, E. B Blann, F. F. Kadlubar & G. J. Hammons. (1999). Chemopreventive effects of tea extracts and various components on human pancreatic and prostate tumor cells in vitro. *Nutr Cancer*, 35, 80-60.
17. Macías, M., Blandino, A., & Cantero, D. (1999). Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and calcium concentration on gelation kinetics. *Journal of bioescience and bioengineering*, 88(6):686-9.
18. Mans, C., & Castells, P. (2011). La nueva cocina científica. Investigación y ciencia.
19. Mateos Aparicio. (2017). Aditivos alimentarios. Madrid: Editorial Dextra.
20. Ngoc Thuy Trang Le, Long Giang Bach, Duy Chinh Nguyen, Tran Hong Xuan Le, Khanh Hung Pham, Dai Hai Nguyen & Thai Thanh Hoang Thi. (2019). Evaluation of Factors Affecting Antimicrobial Activity of Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* Microencapsulated in Alginate-Gelatin Capsules and Its Application on Pork Meat as a Bio-Preservative. *Environmental research and public health*. 16(6): 1017.
21. Qanungo, S., M. Das, S. Haldar & A. Basu (2005). Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*, 26, 958-67.
22. Ramirez, C., Jerónimo, L., Manzano, M., & Hernández, L. (2014). Encapsulamiento alimentario a base de alginato sódico y cloruro cálcico para evitar la oxidación del mango.
23. Rodriguez, S.K., W. Guo, L. Liu, M. A. Band, E. K. Paulson & M. Meydani. (2006). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, inhibits vascular endothelial growth factor angiogenic signaling by disrupting the formation of a receptor complex. *Int J Cancer*, 11, 1635-44.
24. Sarah C. Forester & Joshua D. Lambert. (2011). Antioxidant effects of green tea. *Molecular nutrition food research*, 55(6): 844–854.
25. Sazuka, M., S Murakami, M. Isemura, K. Satoh & T. Nuwika. (1995). Inhibitory effects of green tea infusion on in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse lung carcinoma cells. *Cancer lett*, 98, 27-31.



26. Su Hung Ching, Nidhi Bansal & Blesh Bhandari. (2017). Alginate gel particles- A review of production techniques and physical properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57:6, 1133-1152.
27. Tang, F. Y., E. P. Chiang & C. J. Shih. (2006). Green tea catechin inhibits ephrin-A1-mediated cell migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells. *J Nutr Biochem*.
28. T. Girbés, P. Jiménez, M. Córdoba & J. Tejero. (2014). Manual docente de métodos espectrofotométricos de análisis de polifenoles y de la actividad antioxidante en alimentos o medicamentos. Madrid: Editorial CERSA.
29. Urias V. Lizardi J, Carvajal E, Martinez A, Rascón A. (2009). Gelificación iónica de pectina de bajo grado de esterificación extraída de garbanzo. *Fitotecnia mexicana*. 39(1):17-24.
30. Vayalil, P. K. & S. K. Katiyar. (2004). Treatment of epigallocatechi-3-gallate inhibits matrix metalloproteinases-2 and -9 via inhibition of activation of mitogen-activated protein kinases c-jun and NF-KappaB in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Prostate*, 59, 33-42.
31. Zhongxiang Fang & Blesh Bhandari. (Encapsulation of polyphenols- a review trends food sci technol. (2010). *Trends in food science & technology*, 21(10):510-523.



10. Anexos.

ANEXO 1: TABLAS DE RESULTADOS CON LA MEDIA Y LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.

Muestras:	Contenido fenoles (mg de ácido gálico/ g muestra)	Actividad antioxidante (mg de ácido gálico/ g muestra)	Actividad antirradicalaria (mg de Trolox/ g muestra)
Té negro.	106,2 ±0,029	-	-
Mezcla 3 té.	97,2 ±0,099	-	-
Té verde.	157,2 ±0,1	88,4 ±0,05	209,8 ±0,029
Té verde esferificado.	94,3 ±0,02	34 ±0,003	17,6 ±0,0
Polifenon 60.	811,3 ±0,049	168,74 ±0,009	671,36 ±0,359
Polifenon 60 esferificado.	612,4 ±0,169	143,65 ± 0,049	223,7 ±0,05

% Actividad antioxidante				
Temperatura	En temperatura ambiente.		En temperatura de refrigeración.	
Tiempo				
A tiempo 3 horas.	Contenido fenoles (mg de ácido gálico/ g muestra)	89,28% ±0,02	Contenido fenoles (mg de ácido gálico/ g muestra)	87,46% ±0,199
	Actividad antioxidante (mg de ácido gálico/ g muestra)	91,28% ±0,009	Actividad antioxidante (mg de ácido gálico/ g muestra)	83% ±0,01
	Actividad antirradicalaria (mg de Trolox/ g muestra)	91,11% ±0,23	Actividad antirradicalaria (mg de Trolox/ g muestra)	88,7% ±0,099
A tiempo 6 horas.	Contenido fenoles (mg de ácido gálico/ g muestra)	89,5% ±0,10	Contenido fenoles (mg de ácido gálico/ g muestra)	88% ± 0,32
	Actividad antioxidante (mg de ácido gálico/ g muestra)	91,7% ±0,040	Actividad antioxidante (mg de ácido gálico/ g muestra)	82,84% ± 0,019
	Actividad antirradicalaria (mg de Trolox/ g muestra)	84,74% ± 0,008	Actividad antirradicalaria (mg de Trolox/ g muestra)	76,2% ± 0,099



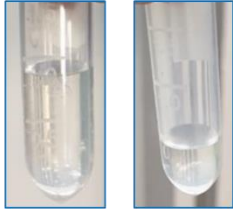
ANEXO 2: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES USADAS EN LOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.

- **Solución patrón de ácido gálico 2,5mM en agua:** Se pesan 0,03 g de ácido gálico y se disuelven en 72 ml de agua Elix, y posteriormente se guarda a 4°C hasta su utilización.
- **Carbonato sódico 7,5%:** Se pesan 7,5 g de carbonato sódico y se disuelven en 90 ml de agua Elix, después se enrasan hasta los 100 ml
- **Acetato amónico 1M, pH7:** Se pesan 88,54 g de acetato amónico y se disuelven en 500 ml de agua Elix. Una vez disuelto el acetato amónico se ajusta hasta obtener un pH de 7,5 posteriormente la solución se guarda a 4°C.
- **Ácido gálico 1mM en etanol al 96%:** Se disuelven 0,08 g de ácido gálico en 100 ml de agua Elix, después se enrasan hasta 500 ml en una probeta y posteriormente se guarda a 4°C.
- **Cloruro de cobre (II) 10mM:** Aplicando la siguiente fórmula $M = \frac{g/PM}{L}$ pesamos 0,85 g de Cloruro de cobre y los disolvemos en 500 ml de agua Elix y posteriormente lo guardamos a 4°C.
- **Neocuproína (Nc) 7,5Mm en etanol al 96%:** Pesamos 0,2 g de Neocuproína y disolvemos en 80 ml de agua Elix, después enrasamos hasta los 100 ml con agua y guardamos a 4°C.
- **DPPH. Radical 2, 2-Difenil-1-picrylhydrazyl 0,1mM en etanol:** Pesamos 0,02 g de DPPH lo disolvemos en 500 ml de metanol y lo guardamos a 4°C.
- **Trolox 1 mM en metanol:** Pesamos 0,013 g de Trolox y lo disolvemos en 50 ml de metanol y lo guardamos a 4°C.
- **Solución desintegradora de esferas:** Es una solución importante en este estudio, ya que nos permite desintegrar las esferas y con ello ver y analizar su contenido. Para realizarla se disuelven 50 g de cítrico en 200 ml de NaOH y 300 ml de agua.

ANEXO 3: GALERÍA DE FOTOS DEL ESTUDIO.

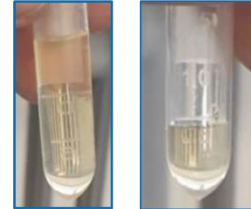
MEDIDA DE LA PÉRDIDA DE VOLUMEN ENCAPSULADO⁷:

Perdida de volumen a las 3 horas a pH 6,2



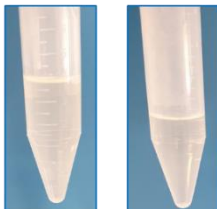
Ambiente Refrigeración

Perdida de volumen a las 6 horas a pH 6,2



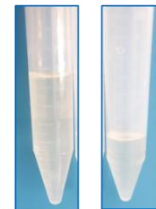
Ambiente Refrigeración

Perdida de volumen a las 3 horas a pH 3



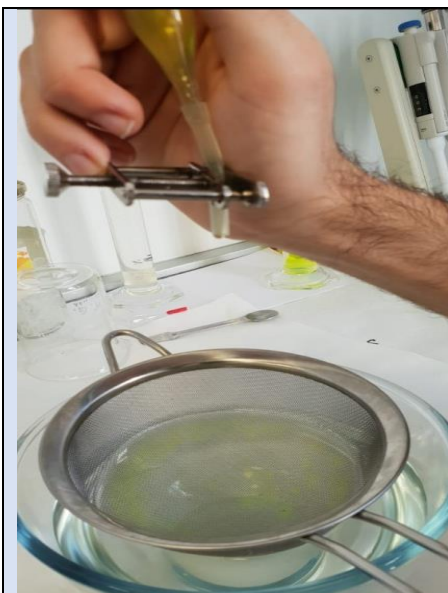
Ambiente Refrigeración

Perdida de volumen a las 6 horas a pH 3



Ambiente Refrigeración

PROCESO DE ESFERIFICACIÓN:



**PROCEDIMIENTO USADO PARA
ESFERIFICAR.**



**ESFERAS FORMÁNDOSE EN EL BAÑO DE
CLORURO CÁLCICO.**



**ESFERAS FORMADAS SECÁNDOSE
EN PAPEL DE FILTRO.**

⁷ En las imágenes podemos observar el volumen que las esferas iban perdiendo a distintas condiciones.

