



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

EFECTO DEL AGENTE RETICULANTE EN LA  
EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE  
AGENTES BIOACTIVOS LIPOFÍLICOS POR  
LA TÉCNICA COMBINADA COACERVACIÓN  
COMPLEJA-SECADO POR ASPERSIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

P R E S E N T A:

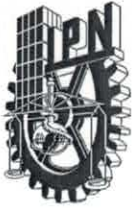
**MC. Sandra Rojas Moreno**

DIRECTORES DE TESIS:

DR. GUILLERMO I. OSORIO REVILLA  
DRA. TZAYHRÍ G. GALLARDO VELÁZQUEZ



CIUDAD DE MÉXICO  
2018



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 15:00 horas del día 01 del mes de Junio del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E. N. C. B para examinar la tesis titulada:

Efecto del agente reticulante en la eficiencia de encapsulación de agentes bioactivos lipofílicos por la técnica combinada coacervación compleja-secado por aspersión

Presentada por el alumno:

Rojas  
Apellido paterno

Moreno  
Apellido materno

Sandra  
Nombre(s)

Con registro: 

B	1	4	0	7	9	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Guillermo I. Osorio Revilla

Dra. Tzayhri G. Gallardo Velázquez

Dra. Cristian Jiménez Martínez

Dr. Mario G. Vizcarra Mendoza

Dr. Darío I. Téllez Medina

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Gerardo Aparicio Ozores



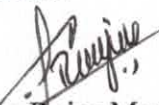


**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

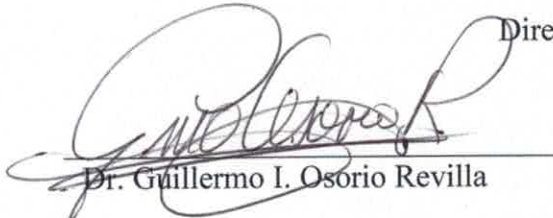
**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F., el día 01 del mes de Junio del año 2018, el (la) que suscribe Sandra Rojas Moreno alumno(a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro B140793, adscrito(a) a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Guillermo I. Osorio Revilla y Dra. Tzayhrí G. Gallardo Velázquez y cede los derechos del trabajo titulado **Efecto del agente reticulante en la eficiencia de encapsulación de agentes bioactivos lipofílicos por la técnica combinada coacervación compleja-secado por aspersion**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [osorgi@gmail.com](mailto:osorgi@gmail.com) o [srojas.mr@hotmail.com](mailto:srojas.mr@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Sandra Rojas Moreno  
Nombre y firma del alumno(a)

Vo. Bo  
Directores de Tesis:

  
Dr. Guillermo I. Osorio Revilla

  
Dra. Tzayhrí G. Gallardo Velázquez



# Effects of complex coacervation-spray drying and conventional spray drying on the quality of microencapsulated orange essential oil

Sandra Rojas-Moreno<sup>1</sup> · Fernando Cárdenas-Bailón<sup>1</sup> · Guillermo Osorio-Revilla<sup>1</sup>  · Tzayhrí Gallardo-Velázquez<sup>2</sup> · José Proal-Nájera<sup>3</sup>

Received: 25 April 2017 / Accepted: 31 October 2017 / Published online: 18 November 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

## Abstract

Orange essential oil (OEO) was microencapsulated by complex coacervation using a whey protein isolate (WPI)–arabic gum (AG) system followed by spray drying, and it was compared with the conventional spray drying microencapsulation process using N-Lok starch as wall material. Complex coacervation between WPI and AG was characterized in terms of zeta potential and coacervation efficiency. Coacervated microcapsules with different core:wall (OEO:WPI–AG) ratio (1:1–1:4) were spray dried using 160 and 90 °C as inlet and outlet temperature, respectively. Maltodextrin DE10 was added to protect integrity of coacervated microcapsules during spray drying. The highest retention and encapsulation efficiency (53 and 46% respectively) were obtained for a core:wall ratio of 1:2. The WPI:AG system with core:wall ratio of 1:2 was spray dried using 140–220 °C and 80–120 °C as inlet and outlet temperatures respectively, and the results indicated that these inlet and outlet temperatures had no significant effect on retention and encapsulation efficiency. Microencapsulation by conventional spray drying at 200–120 °C as inlet and outlet temperatures, resulted in the highest retention and encapsulation efficiencies (79 and 73% respectively), which represents 25% higher than spray dried coacervated microcapsules. After 4 months of storage, the spray dried coacervated microcapsules showed a tenfold higher carvone concentration (indicator of degradation), than the conventional microencapsulated spray dried product.

**Keywords** Complex coacervation · Spray drying · Microencapsulation · Whey protein isolate · Arabic gum

## Introduction

Essential oils are volatile liquids mostly insoluble in water and can be easily degraded under the action of oxygen, light, moisture and heat treatment [1, 2]. Orange essential oil, a natural ingredient, is widely used to provide flavour and aroma to a variety of food, cosmetics and perfumery

products [3]. The major constituent of orange essential oil is d-limonene accounting for 90% of total weight [4, 5]. Carvone is the main oxidation product of d-limonene, so an increase in the content of this compound can be used as an indicator of the quality degradation of orange essential oil [6]. Quality of essential oils may be preserved by using microencapsulation techniques, since these processes help preserve aroma and slow down the degradation of essential oil and other undesirable chemical changes [1, 7].

Microencapsulation by spray drying is the most commonly employed process to protect volatile compounds like essential oils from degradation [8]. It involves the atomization of emulsions in a drying medium at high temperature, allows rapid evaporation of water to form a crust on the surface and almost instantly entraps the core material [9, 10]. The initial step in microencapsulation by spray drying is the selection of a suitable wall material. The most common wall materials used for flavor or essential oil microencapsulation are modified starches as Capsul, N-Lok, Hi-cap and Encapsul [9]. These modified starches have emulsification

✉ Guillermo Osorio-Revilla  
osorgi@gmail.com; gosorior@ipn.mx

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Del. Miguel Hidalgo, 11340 Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Departamento de Biofísica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Del. Miguel Hidalgo, 11340 Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Instituto Politécnico Nacional, Sigma No. 119 Fracc. 20 de Noviembre II, Durango, Mexico

RESEARCH ARTICLE



## Effect of the cross-linking agent and drying method on encapsulation efficiency of orange essential oil by complex coacervation using whey protein isolate with different polysaccharides

Sandra Rojas-Moreno<sup>a</sup>, Guillermo Osorio-Revilla<sup>a</sup>, Tzayhrí Gallardo-Velázquez<sup>b</sup>, Fernando Cárdenas-Bailón<sup>a</sup> and Gabriela Meza-Márquez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Ciudad de México, Mexico; <sup>b</sup>Departamento de Biofísica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Ciudad de México, Mexico

### ABSTRACT

Orange essential oil was microencapsulated by complex coacervation with whey protein isolate (WPI): carboxymethylcellulose (CMC), WPI:sodium alginate (SA) and WPI:chitosan (CH). Effect of pH, protein:polysaccharide ratio and solid concentration on coacervation efficiency were selected for the best coacervation conditions. Tannic acid (TA), sodium tripolyphosphate, oxidised tannic acid and transglutaminase enzyme (TG) were used as cross-linking agents. Highest encapsulation efficiency (EE) for wet coacervated microcapsules ranged from 88% to 94%. Microcapsules were freeze and spray dried to evaluate their effect on its integrity. EE was higher than 80% in freeze dried coacervated microcapsules with and without cross-linking agent, but they formed a solid cake. Spray-dried samples formed a free fluid solid (10–20 µm), where the systems WPI:CMC and WPI:CH cross-linked with TA and TG, respectively showed the highest EE (47% and 50% respectively), representing 400% improvement compared to the samples without cross-linking.

### ARTICLE HISTORY

Received 9 November 2017  
Revised 5 March 2018  
Accepted 5 March 2018

### KEYWORDS

Complex coacervation;  
cross-linking; orange  
essential oil; spray drying;  
freeze drying

### Introduction

Complex coacervation is one of the most important microencapsulation methods currently used to protect several materials like flavours, essential oil, omega 3 fatty acids, vegetable oils, antioxidants, sweeteners, antibiotics and active pharmaceutical ingredients for controlled release applications (Prata et al., 2008; Mendanha et al., 2009; Zhang et al., 2011; Costa de Conto et al., 2013; Karaca et al., 2013; Wang et al., 2014; Yang et al., 2014; Jain et al., 2015; Santos et al., 2015; Yang et al., 2015; Koupantsis et al., 2016; Calderón-Oliver et al., 2017). Coacervation occurs when two oppositely charged polymers (in aqueous solution), mixed in a stoichiometric ratio, are attracted by electrostatic forces, then phase separation occurs resulting in a rich coacervated phase in equilibrium with a poor coacervated liquid phase (Kruif et al., 2004; Prata et al., 2008; Zhang et al., 2011). The coacervated phase consists of the wall material deposited as a thin layer over the core material (Zhang et al., 2012). In the case of complex coacervation, blends of proteins and polysaccharides are commonly used, and

the most widely studied coacervation system has been gelatine (G):arabic gum (AG) (Mendanha et al., 2009). Although complex coacervation is not a simple technique, high encapsulation efficiencies can be obtained (>85%) (Costa de Conto et al., 2013) and it also affords the possibility of encapsulating a higher amount of core material per unit mass of wall material compared to other microencapsulation techniques (Kralovec et al., 2012).

Microcapsules produced by complex coacervation (coacervates), are usually very unsteady and have a poor mechanical resistance due to the ionic nature of electrostatic interaction between the polymers (Prata et al., 2008; Zhang et al., 2012). So, it is necessary to stabilise these structures by cross-linking the wall material (Dong et al., 2008; Butstraen and Salaûn, 2014). Cross-linking transforms the fragile membrane of the coacervate into a rigid membrane (Prata et al., 2008; Zhang et al., 2011), thus coacervates become water insoluble, acquire better thermos-mechanical resistance and obtain excellent features for controlled release applications (Fuguet et al., 2007; Zhang et al., 2012; Butstraen and Salaûn, 2014; Yang et al., 2014).

El presente proyecto de investigación se realizó en la Planta Piloto de Ingeniería y en el Laboratorio de Investigación IV Ingeniería del Departamento de Ingeniería Bioquímica, así como en el Laboratorio Central de Instrumentación-Investigación del Departamento de Biofísica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Guillermo I. Osorio Revilla y la Dra. Tzayhrí G. Gallardo Velázquez, dentro de los proyectos de investigación SIP-20151001, SIP-20161077, SIP-20161448, SIP-20171657 y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

# DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

Mis padres (**Gregorio<sup>t</sup>** y **Socorro**) y hermanos (**Omar** y **Daniela**), mis seres queridos de gran importancia. He concluido con éxito un proyecto que en un principio podría parecer una tarea titánica e interminable, sin embargo, me siento muy feliz por la confianza puesta sobre mí persona, especialmente cuando he contado con su apoyo desde que tengo memoria. Este nuevo logro es gracias a ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de una tesis doctoral es un trabajo arduo y lleno de retos, el cual sería imposible sin la participación de personas e instituciones que facilitan las cosas para que dicho trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mis agradecimientos.

De manera muy especial y sincera agradezco al **Dr. Guillermo I. Osorio Revilla** y a la **Dra. Tzayhrí G. Gallardo Velázquez** por haberme aceptado para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su capacidad para guiar mis ideas, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Les agradezco por haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de este proyecto. Así como su apoyo, comprensión y solidaridad en momentos difíciles de la vida.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a mis sinodales: Dr. Mario G. Vizcarra Mendoza, Dra. Cristian Jiménez Martínez y Dr. Darío I. Téllez Medina, por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia para el seguimiento de este proyecto. No cabe duda que su análisis crítico ha enriquecido el trabajo realizado.



<b>CONTENIDO</b>	
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Aceites esenciales	3
2.1.1 Aceite esencial de bergamota	3
2.2 Ácidos grasos omega 3	4
2.2.1 Propiedades de los ácidos grasos omega 3	5
2.3 Inestabilidad oxidativa de materiales lipofílicos	7
2.3.1 Oxidación de aceite esencial de bergamota	7
2.3.2 Oxidación de ácidos grasos omega 3	9
2.4 Microencapsulación	10
2.5 Coacervación	12
2.5.1 Coacervación simple	12
2.5.2 Coacervación compleja	12
2.5.2.1 Reticulación	14
2.6 Estado del arte	16
2.7 Liofilización	21
2.8 Secado por aspersion	21
3 JUSTIFICACIÓN	23
4 HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	24

5	OBJETIVOS	25
6	MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1	Materiales	26
6.2	Desarrollo experimental	30
6.3	Métodos	31
6.3.1	Caracterización de la coacervación compleja	31
6.3.1.1	Determinación de potencial Z a distintos valores de pH	31
6.3.1.2	Rendimiento de coacervación	32
6.3.2	Microencapsulación por coacervación compleja	32
6.3.3	Agentes reticulantes	33
6.3.3.1	Ácido tánico (AT)	34
6.3.3.2	Tripolifosfato de sodio (TPF)	34
6.3.3.3	Ácido tánico oxidado (ATO)	35
6.3.3.4	Enzima transglutaminasa (TG)	35
6.3.3.5	Glutaraldehído al 25% en agua (GLU)	36
6.3.4	Caracterización de la emulsión aceite esencial:APS	36
6.3.4.1	Estabilidad de las emulsiones de aceite:APS	36
6.3.4.2	Tamaño y distribución de tamaño del glóbulo de aceite en la emulsión de APS	36
6.3.5	Curva de calibración de aceite esencial	37
6.3.6	Eficiencia de encapsulación de las microcápsulas coacervadas en suspensión	37
6.3.7	Morfología de las microcápsulas coacervadas por microscopía óptica	38
6.3.8	Secado por aspersion de las microcápsulas coacervadas	38
6.3.9	Liofilización de las microcápsulas coacervadas	38
6.3.10	Caracterización del producto encapsulado seco	39
6.3.10.1	Contenido de aceite total	39
6.3.10.2	Contenido de aceite encapsulado	40
6.3.10.3	Eficiencia de retención y encapsulación de aceite esencial y ácidos grasos omega 3	40

6.3.10.4	Tamaño y distribución de tamaño de partícula	41
6.3.10.5	Contenido de humedad	41
6.3.10.6	Morfología por microscopía electrónica de barrido	42
6.3.11	Fluido gastrointestinal simulado	42
6.3.11.1	Liberación del agente lipofílico en el fluido gastrointestinal simulado	43
6.3.12	Estabilidad durante el almacenamiento	44
6.3.12.1	Contenido de aceite volátil encapsulado	44
6.3.12.2	Caracterización cromatográfica	44
6.3.12.3	Índice de peróxido (Karaca <i>et al.</i> , 2013)	45
6.3.12.4	Índice de yodo (NMX-F-152-S-1981)	46
6.3.13	Análisis estadístico	46
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
7.1	Caracterización de la coacervación compleja	47
7.1.1	Evaluación del potencial Z	47
7.1.2	Rendimiento de coacervación	50
7.2	Microencapsulación de aceite esencial de naranja por coacervación compleja	55
7.2.1	Estabilidad de la emulsión aceite esencial de naranja:APS, tamaño y distribución del glóbulo de aceite en la emulsión con APS	55
7.2.2	Eficiencia de encapsulación de aceite esencial de naranja de las microcápsulas coacervadas en suspensión	58
7.3	Efecto del agente reticulante en la eficiencia de encapsulación de microcápsulas secadas de aceite esencial de naranja	60
7.3.1	Ácido tánico (AT) como reticulante	65
7.3.2	Tripolifosfato de sodio (TPF) como reticulante	67
7.3.3	Ácido tánico oxidado (ATO) como reticulante	68
7.3.4	Enzima transglutaminasa (TG) como reticulante	70
7.3.5	Glutaraldehído como reticulante de comparación	71
7.3.6	Características de las microcápsulas secas de aceite esencial de	

naranja	73
7.3.6.1    Contenido de humedad de las microcápsulas secas	73
7.3.6.2    Tamaño y distribución de tamaño de partícula	73
7.4 Efecto del tipo de secado en la eficiencia de encapsulación	75
7.4.1    Morfología de las microcápsulas	78
7.5 Encapsulación de agentes bioactivos lipofílicos	80
7.5.1    Aceite esencial de bergamota y pescado (fuente de omega 3)	80
7.5.1.1    Tamaño y distribución del tamaño de partícula	84
7.5.1.2    Morfología de las microcápsulas	87
7.6 Liberación en un fluido gastrointestinal simulado	88
7.7 Estabilidad del material lipofílico durante el almacenamiento	94
7.7.1    Estabilidad de las microcápsulas de aceite esencial de bergamota	95
7.7.1.1    Evaluación de la calidad de aceite esencial de bergamota	98
7.7.2    Estabilidad de las microcápsulas de ácidos grasos omega 3	106
7.7.2.1    Evaluación de la calidad de los ácidos grasos omega 3	108
8 CONCLUSIONES	112
9 BIBLIOGRAFÍA	115
10 APÉNDICE	126

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Degradación química del aceite esencial de bergamota	8
2. Diagrama representativo de los tipos de morfología obtenidos por microencapsulación	11
3. Mecanismo de atracción entre proteína y polisacárido	13
4. Secador por aspersión	22
5. Diagrama de bloques del trabajo experimental para microencapsular agentes bioactivos lipofílicos por coacervación compleja-secado por aspersión	30
6. Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa de sodio (APS:CMC)	48
7. Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche:alginato de sodio (APS:AS)	48
8. Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche:goma arábica (APS:GA)	49
9. Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q)	49
10. Rendimiento de coacervación (RC) en función del pH, relación Pr:Ps y concentración de sólidos al 1(a) y 2% <sub>(w/w)</sub> (b). Sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa de sodio (APS:CMC)	52
11. Rendimiento de coacervación (RC) en función del pH, relación Pr:Ps y concentración de sólidos al 1(a) y 2% <sub>(w/w)</sub> (b). Sistema aislado de proteína de suero de leche:alginato de sodio (APS:AS)	52
12. Rendimiento de coacervación (RC) en función del pH, relación Pr:Ps y concentración de sólidos al 1(a) y 2% <sub>(w/w)</sub> (b). Sistema aislado de proteína de suero de leche:goma arábica (APS:GA)	53
13. Rendimiento de coacervación (RC) en función del pH, relación Pr:Ps y concentración de sólidos al 1(a) y 2% <sub>(w/w)</sub> (b). Sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q)	54

Figura		Pág.
14.	Distribución de tamaño de glóbulo de aceite de la emulsión aceite esencial en la solución de aislado de proteína de suero de leche a 10,000 rpm	56
15.	Distribución de tamaño de glóbulo de aceite de la emulsión aceite esencial en la solución de aislado de proteína de suero de leche a 15,000 rpm	56
16.	Eficiencia de encapsulación de las microcápsulas coacervadas en suspensión para el sistema aislado de proteína de suero de leche (APS):carboximetilcelulosa, APS:alginato de sodio, APS:goma arábica y APS:quitosano, a dos relaciones núcleo:pared	59
17.	Efecto de las condiciones de reticulación y método de secado (a) Aspersión, b) Liofilización) sobre la eficiencia de retención y encapsulación de las microcápsulas coacervadas del sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC)	61
18.	Efecto de las condiciones de reticulación y método de secado (a) Aspersión, b) Liofilización) sobre la eficiencia de retención y encapsulación de las microcápsulas coacervadas del sistema aislado de proteína de suero de leche:alginato de sodio (APS:AS)	62
19.	Efecto de las condiciones de reticulación y método de secado (a) Aspersión, b) Liofilización) sobre la eficiencia de retención y encapsulación de las microcápsulas coacervadas del sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q)	63
20.	Distribución del tamaño de partícula de microcápsulas de aceite esencial de naranja secadas por aspersión para el sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) sin agente reticulante y reticulados con ácido tánico (AT), tripolifosfato de sodio (TPF), ácido tánico oxidado (ATO) y glutaraldehído (GLU)	74

Figura		Pág.
21.	Distribución del tamaño microcápsulas de aceite esencial de naranja secadas por aspersion para el sistema aislado de proteína de suero de leche:alginato de sodio (APS:AS) sin agente reticulante y reticulados con ácido tánico (AT), tripolifosfato de sodio (TPF), ácido tánico oxidado (ATO) y glutaraldehído (GLU)	74
22.	Distribución del tamaño de microcápsulas de aceite esencial de naranja secadas por aspersion para el sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q) sin agente reticulante y reticulados con ácido tánico (AT), tripolifosfato de sodio (TPF), ácido tánico oxidado (ATO), transglutaminasa (TG) y glutaraldehído (GLU)	75
23.	Distribución del tamaño de microcápsulas de aceite esencial de naranja secadas por aspersion y liofilización. Ej. Sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q) reticuladas con la enzima transglutaminasa (15U, 12 h)	78
24.	Morfología de las microcápsulas coacervadas del sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). Morfología por microscopía óptica de contraste de fases de las microcápsulas coacervadas en suspensión: (a) sin reticulante y (b) reticuladas con la enzima transglutaminasa (TG). Morfología por SEM de las muestras secadas por aspersion: (c) sin reticulante y (d) reticuladas con TG; liofilización: (e) sin reticulante y (f) reticuladas con TG.	79
25.	Efecto de las condiciones de reticulación y método de secado (a) Aspersion, b) Liofilización) sobre la eficiencia de retención y encapsulación de las microcápsulas de aceite esencial de bergamota; para el sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q)	82

Figura		Pág.
26.	Efecto de las condiciones de reticulación y método de secado (a) Aspersión, b) Liofilización) sobre la eficiencia de retención y encapsulación de las microcápsulas de ácidos grasos omega 3; para el sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q).	83
27.	Distribución del tamaño de microcápsulas de aceite esencial de bergamota secadas por aspersión: a) sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). S/Ret: sin reticulante; AT: ácido tánico; TG: transglutaminasa; GLU: glutaraldehído	85
28.	Distribución del tamaño de microcápsulas de ácidos grasos omega 3 secadas por aspersión para el sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC). S/Ret: sin reticulante; AT: ácido tánico; GLU: glutaraldehído	85
29.	Distribución del tamaño de microcápsulas de ácidos grasos omega 3 secadas por aspersión para el sistema aislado de proteína de suero de leche:Quitosano (APS:Q). S/Ret: sin reticulante; TG: transglutaminasa; GLU: glutaraldehído	86
30.	Distribución del tamaño de microcápsulas de aceite esencial de bergamota y ácidos grasos omega 3 obtenidas por liofilización, Sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). reticuladas con glutaraldehído	87
31.	Morfología de las microcápsulas coacervadas con el sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q) reticuladas con transglutaminasa: aceite esencial de bergamota a) Secado por aspersión y b) Liofilización; ácidos grasos omega 3 c) Secado por aspersión y d) Liofilización	88



Figura		Pág.
32.	Perfil de liberación de acumulativa de aceite esencial de bergamota de microcápsulas: a) Aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) Aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). S/Ret: sin reticulante; AT: ácido tánico; TG: Transglutaminasa; GLU: glutaraldehído	90
33.	Perfil de liberación de acumulativa de ácidos grasos omega 3 de microcápsulas: a) Aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) Aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). S/Ret: sin reticulante; AT: ácido tánico; TG: Transglutaminasa; GLU: glutaraldehído	91
34.	Variación de la eficiencia de retención y encapsulación durante el almacenamiento de microcápsulas de aceite esencial de bergamota: a) Aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) Aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). AT: ácido tánico; TG: Transglutaminasa; GLU: glutaraldehído	95
35.	Cromatograma de aceite esencial de bergamota destilado	99
36.	Variación del porcentaje de abundancia de los principales componentes del aceite esencial de bergamota encapsulado (d-limoneo, linalool y acetato de linalilo) y de sus productos de oxidación ( $\alpha$ -terpineol y carvona) a los 2 (2M) y 4 (4M) meses de almacenamiento: a) Aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) Aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). AEB: aceite esencial de bergamota (referencia); AT: ácido tánico; TG: transglutaminasa; GLU: glutaraldehído; LIO: muestra liofilizada y reticulada con GLU	102

Figura		Pág.
37.	Perfiles de aceite esencial de bergamota encapsulado con el sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q) reticulado con glutaraldehído a los 4 meses de almacenamiento: a) secado por aspersión y b) liofilización	105
38.	Variación de la eficiencia de retención y encapsulación durante el almacenamiento de microcápsulas de ácidos grasos omega 3: a) Aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) Aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). AT: ácido tánico; TG: Transglutaminasa; GLU: glutaraldehído	107

**ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro		Pág.
1.	Agentes reticulantes	33
2.	Condiciones del AT como agente reticulante	34
3.	Condiciones del TPF como agente reticulante	34
4.	Condiciones del ATO como agente reticulante	35
5.	Condiciones del TG como agente reticulante	35
6.	Composición del fluido gastrointestinal simulado (Flores <i>et al.</i> , 2014)	42
7.	Cromatografía de gases para caracterizar el aceite esencial de bergamota (Velázquez <i>et al.</i> , 2014)	45
8.	Condiciones de trabajo para la elaboración de microcápsulas por coacervación compleja	55
9.	Propiedades de las microcápsulas coacervadas secadas de las mejores condiciones de reticulación comparadas con microcápsulas coacervadas liofilizadas (molidas y tamizadas)	77
10.	Agentes reticulantes para microcápsulas de agentes bioactivos lipofílicos	80
11.	Porcentaje de abundancia de los principales componentes del aceite esencial de bergamota	99
12.	Variación del % de abundancia de los principales componentes del aceite esencial de bergamota encapsulado durante almacenamiento	101
13.	Estabilidad química de las microcápsulas de ácidos grasos omega 3	109

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>Abs:</b> Absorbancia	<b>ALA:</b> $\alpha$ -linolenic Acid
<b>AEB:</b> Aceite Esencial de Bergamota	<b>ANOVA:</b> Analysis of Variance
<b>APS:</b> Aislado de Proteína de Suero de leche	<b>CH:</b> Chitosan
<b>AS:</b> Alginato de Sodio	<b>CMC:</b> Carboxymethylcellulose
<b>AT:</b> Ácido Tánico	<b>DHA:</b> Docosahexaenoic Acid
<b>ATO:</b> Ácido Tánico Oxidado	<b>EE:</b> Encapsulation Efficiency
<b>C:</b> concentración de aceite (g/mL)	<b>EPA:</b> Eicosapentaenoic Acid
<b>CMC:</b> Carboximetilcelulosa de Sodio	<b>FID:</b> Flame Ionization Detector
<b>CS:</b> Caseinato de Sodio	<b>GA:</b> Gum Arabic
<b>DL<sub>50</sub>:</b> Dosis letal media	<b>GRAS:</b> Generally Recognized as Safe
<b>Ec:</b> Ecuación	<b>LCPUFA:</b> Long-chain Polyunsaturated Fatty Acid
<b>EE:</b> Eficiencia de Encapsulación	<b>OTA:</b> Oxidized Tannic Acid
<b>ER:</b> Eficiencia de Retención	<b>RE:</b> Retention Efficiency
<b>FGS:</b> Fluido Gástrico Simulado	<b>SA:</b> Sodium Alginate
<b>FIS:</b> Fluido Intestinal Simulado	<b>SEM:</b> Scanning Electron Microscope
<b>G:</b> Gelatina	<b>TA:</b> Tannic Acid
<b>GA:</b> Goma Arábica	<b>TG:</b> Transglutaminase enzyme
<b>GLU:</b> Glutaraldehído	<b>TPP:</b> Sodium Tripolyphosphate
<b>IA:</b> Isotiocianato de Alilo	<b>USP:</b> United States Pharmacopoeia
<b>IP:</b> Índice de Peróxido	<b>v/v:</b> volume/volume
<b>IY:</b> Índice de Yodo	<b>WPI:</b> Whey Protein Isolate
<b>LIO-2M:</b> muestra liofilizada y reticulada con GLU con 2 meses de almacenamiento	<b>w/v:</b> weigh/volume
<b>LIO-4M:</b> muestra liofilizada y reticulada con GLU con 4 meses de almacenamiento	<b>w/w:</b> weigh/weigh
<b>MP:</b> Megapíxeles	
<b>N:</b> Normalidad	
<b>p:</b> probabilidad	
<b>Pr:</b> Proteína	
<b>Ps:</b> Polisacárido	
<b>Q:</b> Quitosano	
<b>RC:</b> Rendimiento de Coacervación	
<b>S/Ret:</b> Sin Reticulante	
<b>TG:</b> Enzima Transglutaminasa	
<b>TPF:</b> Tripolifosfato de sodio	
<b>U:</b> Unidades de enzima	
<b>UV-VIS:</b> Ultravioleta-Visible	
<b>2M:</b> 2 meses de almacenamiento	
<b>4M:</b> 4 meses de almacenamiento	

## Unidades de medida

**°C:** grado centígrado  
**cm<sup>2</sup>:** centímetro cuadrado  
**cps:** centipoise  
**g:** gramos  
**h:** horas  
**Kg:** kilogramos  
**Kg<sub>f</sub>:** Kilogramo fuerza  
**L:** litro  
**m:** metros  
**m<sup>2</sup>:** metros cuadrados  
**meq:** miliequivalentes  
**mg:** miligramos  
**mL:** mililitro  
**mm:** milímetros  
**mV:** milivolts  
**N<sub>2</sub>:** gas nitrógeno  
**nm:** nanómetros  
**rpm:** revolución por minuto  
**μL:** microlitro  
**μV:** microvolts  
**λ<sub>máx</sub>:** longitud de onda máxima

## Reactivos químicos

**CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O:** cloruro de calcio dihidratado  
**HCl:** ácido clorhídrico  
**KCl:** cloruro de potasio  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** fosfato monopotásico  
**MgCl<sub>2</sub>:** cloruro de magnesio  
**NaCl:** cloruro de sodio  
**NaHCO<sub>3</sub>:** bicarbonato de sodio  
**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** fosfato sódico dihidrogenado  
**NaOH:** hidróxido de sodio  
**NH<sub>4</sub>Cl:** cloruro de amonio  
**CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O:** cloruro de calcio dihidratado  
**HCl:** ácido clorhídrico

## RESUMEN

Se evaluó el efecto del agente reticulante sobre la eficiencia de encapsulación de agentes bioactivos lipofílicos mediante coacervación compleja usando los sistemas: aislado de proteína de suero de leche (APS):carboximetilcelulosa (CMC), APS:alginato de sodio (AG), APS:goma arábica (GA) y APS:quitosano (Q). Se determinó el efecto del pH, la relación proteína:polisacárido y la concentración de sólidos sobre la eficiencia de coacervación para seleccionar las mejores condiciones de coacervación. Se utilizaron como agentes reticulantes ácido tánico (AT), tripolifosfato de sodio (TPF), ácido tánico oxidado (ATO), enzima transglutaminasa (TG) y glutaraldehído (GLU) para el endurecimiento de la pared de las microcápsulas. La mayor eficiencia de encapsulación (EE) obtenida en las microcápsulas coacervadas en suspensión varió de 88 – 94%. Las microcápsulas coacervadas fueron secadas por aspersion y por liofilización para evaluar el efecto del tipo de secado sobre su integridad. La EE fue mayor al 80% en microcápsulas coacervadas liofilizadas con o sin agente reticulante, pero formaron un bloque sólido. Las microcápsulas coacervadas secadas por aspersion formaron un polvo fluido (10 – 20  $\mu\text{m}$ ), en donde los sistemas de APS:CMC y APS:Q reticulados con AT y TG respectivamente, obtuvieron la mayor EE (47 y 50% respectivamente), lo cual representó una mejora del 400% en la EE con respecto a las muestras sin reticulante. Con estos sistemas y agentes reticulantes se encapsuló aceite esencial de bergamota y aceite de pescado rico en ácidos grasos omega 3. Se llevó a cabo la digestión *in vitro* de las microcápsulas obtenidas, encontrando que en aquellas sin reticulante, así como en la reticulada mediante AT, la pared se degradó rápidamente por efecto del pH y la actividad enzimática, liberando el 100% del agente lipofílico encapsulado. Las microcápsulas de APS:Q reticuladas mediante TG liberaron gradualmente el material lipofílico, alcanzando una liberación del 47% al concluir las 5 h de digestión; mientras que en las microcápsulas reticuladas mediante glutaraldehído, la liberación del material lipofílico fue más lenta. Se llevó a cabo también la evaluación de la estabilidad del material lipofílico durante el almacenamiento de las microcápsulas a 30°C. Para las microcápsulas de aceite esencial de bergamota se tuvo pérdida de eficiencia de retención (ER) y EE con respecto al tiempo, obteniendo al final del almacenamiento (4 meses) una EE de 38% y 33% para los sistemas APS:CMC y APS:Q, reticulados

mediante AT y TG comparado con 10 y 14% de las microcápsulas sin reticulante, respectivamente. Para las microcápsulas liofilizadas de APS:Q reticuladas con GLU, se tuvo una disminución de aceite de 38% comparada con 22% de las microcápsulas secadas por aspersión, debido a su estructura más porosa. Respecto a la calidad del aceite esencial encapsulado durante el almacenamiento, se encontró que fue menos degradado en las microcápsulas reticuladas que en aquellas sin reticulante. Por último, la ER de las microcápsulas de ácidos grasos omega 3 se mantuvo constante durante el almacenamiento, sin embargo, el aceite superficial incrementó entre 2.5-3.5 veces, debido a que los ácidos grasos omega 3 pasaron de estar encapsulados a depositarse como aceite superficial; no obstante, la EE fue mayor en las muestras reticuladas mediante AT y TG de los sistemas APS:CMC y APS:Q (25 y 36% respectivamente) en comparación con las muestras sin reticular (7%). En cuanto a la calidad de las microcápsulas de ácidos grasos omega 3, se pudo observar un grado importante de oxidación, tanto en las microcápsulas reticuladas como en aquellas no reticuladas, siendo mayor la oxidación en las microcápsulas sin reticulante. El método de microencapsulación por coacervación compleja con reticulación ofrece mejor protección contra el deterioro oxidativo, sin embargo, no es suficiente para mantener intacta la calidad del material lipofílico.

**ABSTRACT**

The effect of crosslinking agents on encapsulation efficiency of lipophilic bioactive agents by complex coacervation was evaluated using the systems: whey protein isolate (WPI)-carboxymethylcellulose (CMC), WPI-sodium alginate (SA), WPI-gum arabic (GA) and WPI-chitosan (CH). Effect of pH, protein:polysaccharide ratio and solid concentration was determined on coacervation efficiency in order to select the best coacervation conditions. Tannic acid (TA), sodium tripolyphosphate (TPP), oxidized tannic acid (OTA), transglutaminase enzyme (TG) and glutaraldehyde (GLU) were used as cross-linking agents, for the hardening of the microcapsule's wall. Highest encapsulation efficiency (EE) for wet coacervated microcapsules ranged from 88-94%. Microcapsules were freeze and spray dried to evaluate the effect of these processes on microcapsule integrity. EE was higher than 80% in freeze dried coacervated microcapsules with or without cross-linking agent, but they formed a solid cake. Spray-dried samples formed a free fluid powder (10-20  $\mu\text{m}$ ), where the systems WPI:CMC and WPI:CH cross-linked by tannic acid and transglutaminase enzyme respectively showed the highest EE (47 and 50% respectively), representing a 400% improvement compared to the samples without cross-linking. With these systems and crosslinking agents, bergamot essential oil and fish oil, rich in omega-3 fatty acids, were encapsulated. *In vitro* digestion of the obtained microcapsules was carried out, finding that in those without crosslinking agent, as well as in the one crosslinked by AT, the wall was rapidly degraded by the effect of pH and enzymatic activity, releasing 100% of the encapsulated lipophilic agent. The WPI:CH microcapsules crosslinked by TG gradually released the lipophilic material, reaching a release of 47% after 5 h of digestion, while in the microcapsules crosslinked by GLU, the release of the lipophilic material was slower. Stability evaluation of the lipophilic material during storage at 30°C was also carried out. For bergamot essential oil microcapsules there was a decrease of retention efficiency (RE) and EE, obtaining at the end of storage (4 months) 38 and 33% for the systems WPI:CMC and WPI:CH crosslinked by TA and TG, compared with 10 and 14% for the microcapsules without crosslinker, respectively. Freeze dried microcapsules of the system WPI:CH crosslinked by GLU, there was an oil decrease of 38% compared with



22% in the sample obtained by spray drying; due to its more porous structure. Regarding the quality of the encapsulated essential oil during storage, it was found that oil was less degraded in the crosslinked microcapsules than in these without crosslinker. The RE of the omega-3 fatty acids microcapsules remained constant during storage, but, the superficial oil increased, 2.5-3.5 times, because omega-3 fatty acids changed from being encapsulated to being exposed as surface oil; nevertheless, the EE was higher in samples crosslinked by TA and TG of the systems WPI:CMC and WPI:CH (25 and 36% respectively), in comparison with microcapsules without crosslinker (7%). Regarding the quality of the omega-3 fatty acids microcapsules, a remarkable oxidation process was observed, in both the crosslinked and the non-crosslinked microcapsules, and oxidation was more intense in the microcapsules without crosslinker. The method of microencapsulation through complex coacervation with crosslinking offers protection against oxidative deterioration; however, such method is not enough to keep intact the quality of the lipophilic material.

## 1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado el interés por usar agentes lipofílicos para preservar el bienestar humano, previniendo o incluso tratando un gran número de condiciones patológicas (Ilyasoglu & Nehir, 2014). Entre los productos lipofílicos se encuentran los aceites esenciales y el aceite de pescado (ácidos grasos omega 3).

Los aceites esenciales tienen una gran variedad de efectos farmacológicos, incluyendo efectos antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios y analgésicos (Russo *et al.*, 2013). Por otra parte, un gran número de investigaciones indican que los ácidos grasos omega 3 son esenciales, no sólo para el desarrollo y crecimiento normal sino por sus efectos positivos para el corazón, cerebro, ojos, articulaciones, piel, estado de ánimo y el comportamiento en general (Kaushik *et al.*, 2014).

Los materiales lipofílicos pueden ser utilizados como compuestos bioactivos; sin embargo, la incorporación en otros productos, está limitada por la alta susceptibilidad a oxidarse por la exposición al aire, la luz y las temperaturas elevadas (Wang *et al.*, 2014), siendo una alternativa para protegerlos el proceso de encapsulación (Serfert *et al.*, 2009).

La microencapsulación es una tecnología que tiene como principal ventaja proporcionar a los ingredientes líquidos y sólidos una barrera efectiva contra el medio ambiente y/o interacciones químicas hasta la liberación del material encapsulado (Reineccius, 1994). La encapsulación por coacervación compleja se ha considerado como el verdadero proceso de encapsulación porque el material de revestimiento rodea completamente al núcleo y forma una capa continua; genera alta eficiencia de encapsulación (>85%) (Kaushik *et al.*, 2014) y las microesferas obtenidas tienen buena protección contra la oxidación, además de promover la liberación controlada (Comunian *et al.*, 2013).

Durante este proceso es necesario endurecer la pared de las microcápsulas, para estabilizar la estructura (Dong *et al.*, 2008), ya que son muy inestables y tienen poca

resistencia mecánica (coalescen lo que provoca pérdida del material encapsulado), debido a que la pared se forma por interacción electrostática entre polímeros con cargas opuestas (Prata *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012).

Usualmente el endurecimiento o reticulado se lleva a cabo por la adición de agentes químicos, como el glutaraldehído o formaldehído (Bigi *et al.*, 2002; Fuguet *et al.*, 2007; Shenvi *et al.*, 2014)), sin embargo, estos agentes químicos son considerados altamente tóxicos para el cuerpo humano (Peng *et al.*, 2014; Shenvi *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014), siendo ésta la mayor limitante que restringe su uso en un gran número de aplicaciones. Por lo anterior, el principal desafío en coacervación compleja, es poder desarrollar sistemas alternativos para el reticulado de las cápsulas, que no sean tóxicos y que sean amigables con el medio ambiente (Peng *et al.*, 2014).

Por lo anterior el presente trabajo tiene por objetivo evaluar el efecto de diferentes tipos de agentes reticulantes no tóxicos, en la eficiencia de encapsulación de agentes bioactivos lipofílicos para obtener microcápsulas con paredes rígidas, por la técnica de coacervación compleja y comparar dos tipos de secado de las microcápsulas coacervadas, secado por aspersion y liofilización.

## 2 ANTECEDENTES

Los compuestos bioactivos lipofílicos, como el aceite de pescado, aceites esenciales y aceites vegetales, han recibido gran atención en investigaciones por los beneficios a la salud que pueden aportar (Chen *et al.*, 2013).

### 2.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son productos volátiles y aromáticos del metabolismo secundario de las plantas (Fernandes *et al.*, 2008), sus principales componentes son mono y sesquiterpenos hidrogenados, sus derivados oxigenados y compuestos aromáticos (Adamiec & Kalemba, 2006; Bakkali *et al.*, 2008). Estos compuestos han sido utilizados principalmente como aromas naturales en la industria de alimentos, perfumería, cosmética, industria sanitaria y farmacéutica (Adamiec & Kalemba, 2006).

En años recientes, los aceites esenciales y sus constituyentes han recibido una considerable atención debido a sus diversas propiedades farmacológicas, químicas y terapéuticas (Fernandes *et al.*, 2008; Victoria *et al.*, 2013). El interés que se ha observado en la evaluación de los aceites esenciales es por sus beneficios a la salud, entre las principales propiedades incluyen actividad antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, analgésica, sedativa, ansiolítica y regenerativa del tejido (Russo *et al.*, 2013; Celia *et al.*, 2013; Victoria *et al.*, 2013).

Algunos aceites esenciales contienen varias moléculas bioactivas que sinérgicamente proporcionan eficacia terapéutica como el aceite esencial de bergamota.

#### 2.1.1 Aceite esencial de bergamota

La bergamota (*Citrus bergamia* Risso) es una fruta híbrida derivada de la naranja dulce y el limón. El aceite esencial de bergamota es muy utilizado en la industria farmacéutica por sus propiedades antisépticas y antibacteriales (Pernice *et al.*, 2009). Está formado

por más de 345 compuestos, divididos en dos fracciones. La fracción volátil (93-96%) contiene mono y sesquiterpenos, como limoneno,  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\gamma$ -terpineno, linalool y acetato de linalilo, mientras que la fracción no volátil (4-7%) tiene flavonas y cumarinas, como bergamotín y bergapteno (Celia *et al.*, 2013; Bagetta *et al.*, 2010).

Durante la última década se ha investigado el uso de plantas cítricas como recursos naturales en la terapia contra cáncer. El aceite esencial de bergamota recientemente ha mostrado tener actividad antiproliferativa contra células de neuroblastoma humano *in vitro*. Los compuestos derivados del aceite esencial de bergamota, como el limoneno, linalool, acetato de linalilo han demostrado inhibir la proliferación de células cancerígenas y proporcionan un efecto quimiopreventivo y quimioterapéutico en modelos de tumor mamario (Celia *et al.*, 2013; Russo *et al.*, 2013).

## 2.2 Ácidos grasos omega 3

Los ácidos grasos omega 3, son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ( $\omega$ -3 LCPUFA por sus siglas en inglés) (Kralovec *et al.*, 2012). La nomenclatura omega (“ $\omega$ ”) considera como carbono principal, al carbono del grupo metilo terminal del ácido graso e identifica el primer doble enlace, a partir del tercer átomo de carbono de este grupo químico (Valenzuela *et al.*, 2011).

El primer miembro de la familia de omega 3 es el ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3, ALA por sus siglas en inglés), el cual no puede ser sintetizado por el cuerpo humano. Sin embargo, como el ALA juega un importante papel en varias funciones fisiológicas en el cuerpo humano, se ha reconocido como nutricionalmente esencial en la dieta (Kaushik *et al.*, 2014). El ser humano puede transformar el ALA (vía desaturasas y elongasas) en ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA por sus siglas en inglés) con una eficiencia del 5 - 10% y posteriormente en ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA por sus siglas en inglés) con una eficiencia del 1 - 5% (Sontrop & Campbell, 2006; Kralovec *et al.*, 2012). Como la biosíntesis de los ácidos grasos es regulada por cambios en la dieta y por procesos hormonales, no es particularmente eficiente, por lo que es importante tener fuentes

proveedoras de ácidos grasos omega 3 (Coronado *et al.*, 2006). Los recursos ricos en ALA son los aceites vegetales (chía, linaza) y los frutos secos (almendra, nuez, maní) (Valenzuela *et al.*, 2011). El EPA y el DHA se encuentran tanto en animales (atún, jaurel, salmón) como en vegetales marinos (fitoplancton, algas) (Ilyasoglu & Nehir, 2014). Se recomienda consumir menos de 500 mg de EPA y DHA diariamente (Barrow *et al.*, 2007).

Los LCPUFA han adquirido gran relevancia en diversos estudios médicos, desde que fueron descubiertos en 1982 por el investigador Ralph Holman, como consecuencia de un estudio sobre la dieta de los esquimales, al relacionar y comprobar que la baja incidencia de infartos y enfermedades cardiovasculares entre los esquimales estaba estrechamente relacionada con su dieta, muy rica en grasa animal marina (Kralovec *et al.*, 2012).

### **2.2.1 Propiedades de los ácidos grasos omega 3**

Los LCPUFA han demostrado ser muy importantes para el mantenimiento de la buena salud y la prevención de una gran variedad de enfermedades y desordenes humanos (Klinkesorn *et al.*, 2006). A continuación, se citan algunos de los beneficios más importantes asociados al consumo de los LCPUFA:

- ❖ Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, arritmias cardiacas, previenen la formación de coágulos sanguíneos. Tienden a disminuir la inflamación en enfermedades como la artritis o alergias. Son precursores de las prostaglandinas que intervienen en la agregación plaquetaria impidiendo la trombosis y la arteriosclerosis (Chen *et al.*, 2013).
- ❖ Bajan el nivel de triglicéridos y colesterol en sangre (Barrow *et al.*, 2009).
- ❖ Reducen la presión sanguínea en personas hipertensas y ayudan en el control glucémico de individuos diabéticos (Karaca *et al.*, 2013).

- ❖ Previenen enfermedades del tracto digestivo (Karaca *et al.*, 2013).
- ❖ Previenen disfunciones inmunológicas (Zimet & Livney, 2009).
- ❖ Ejercen efectos pleiotrópicos sobre los sistemas cardiovascular y nervioso central, que pueden ser de protección contra el deterioro cognitivo relacionado con la edad, donde las causas son demencia vascular, Alzheimer o la mezcla de ambos (Cole *et al.*, 2009).
- ❖ Mantienen la fluidez de la membrana celular y las funciones receptoras enzimáticas (Coronado *et al.*, 2006).
- ❖ Estimulan la secreción de neurotransmisores por lo que tienen efectos antidepresivos (Coronado *et al.*, 2006).
- ❖ Tienen actividad anticancerígena, previenen la osteoporosis y disminuyen la probabilidad de recaída en la enfermedad de Crohn (inflamación crónica del intestino) (Costa de Conto *et al.*, 2013).
- ❖ Tienen un efecto positivo en el desarrollo del cerebro, ojos y sistema nervioso en fetos e infantes (Arab-Tehrany *et al.*, 2012).

Actualmente estudios de nutrición han demostrado que existe un mayor consumo de ácidos grasos omega 6 (ácidos grasos insaturados con el primer enlace doble en el carbono 6, contando los carbonos desde el final de la cadena del ácido graso) que de ácidos grasos omega 3 (Etherton *et al.*, 2002). Las dietas modernas usualmente tienen una proporción 15:1 de ácidos grasos omega 6 a omega 3, cuando la proporción recomendada es 1:1. Algunos investigadores sugieren que este desbalance ha contribuido a aumentar la incidencia de diferentes enfermedades (Sontrop & Campbell, 2006). El elevado consumo de omega 6 está asociado con ataques al corazón, artritis, inflamación, depresión, obesidad y cáncer (Smith & William, 2008). Los ácidos grasos

omega 3 (aceites principalmente) se han usado como ingredientes en suplementos dietarios, alimentos saludables y productos farmacéuticos (Kralovec *et al.*, 2012).

## **2.3 Inestabilidad oxidativa de materiales lipofílicos**

Entre las limitaciones que presentan los compuestos lipofílicos es que son materiales que pueden sufrir degradación fácilmente bajo la acción de la luz, oxígeno, humedad y temperaturas moderadas (Martín *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2008; Adamiec & Kalemba, 2006). Por lo que es importante desarrollar procedimientos que puedan proteger al compuesto lipofílico de la degradación (ácidos grasos omega 3 y aceites esenciales) (Martín *et al.*, 2010).

### **2.3.1 Oxidación de aceite esencial de bergamota**

Todos los materiales orgánicos están sujetos a degradación química, en el caso de los aceites esenciales, la degradación por oxidación puede afectar su eficacia debido al cambio en sus constituyentes, lo cual puede hacer que un aceite esencial sea más peligroso (Tisserand & Yooung, 2014).

La desventaja del aceite esencial de bergamota es su alto contenido de monoterpenos particularmente linalool, acetato de linalilo y d-limoneno, los cuales disminuyen su resistencia a la oxidación durante el almacenamiento (Pudil *et al.*, 1998). En la figura 1, se muestra la degradación química del aceite esencial de bergamota.

El acetato de linalilo es el éster que se encuentra en mayor proporción en este aceite esencial, es un constituyente importante que determina su calidad, al ser degradado por efecto de la temperatura y el oxígeno, se transforma a su correspondiente alcohol: linalool (Kiran & Singh, 2012). A medida que comienza la degradación, varias reacciones secundarias crean productos de oxidación típicos, como la descomposición de linalool a su correspondiente hidroperóxido (Pudil *et al.*, 1998), el cual al ser oxidado se transforma rápidamente en  $\alpha$ -terpineol, aunque tiene un agradable aroma a lila, su



alto contenido en el aceite esencial de bergamota indica deterioro de su calidad (Kiran & Singh, 2012).

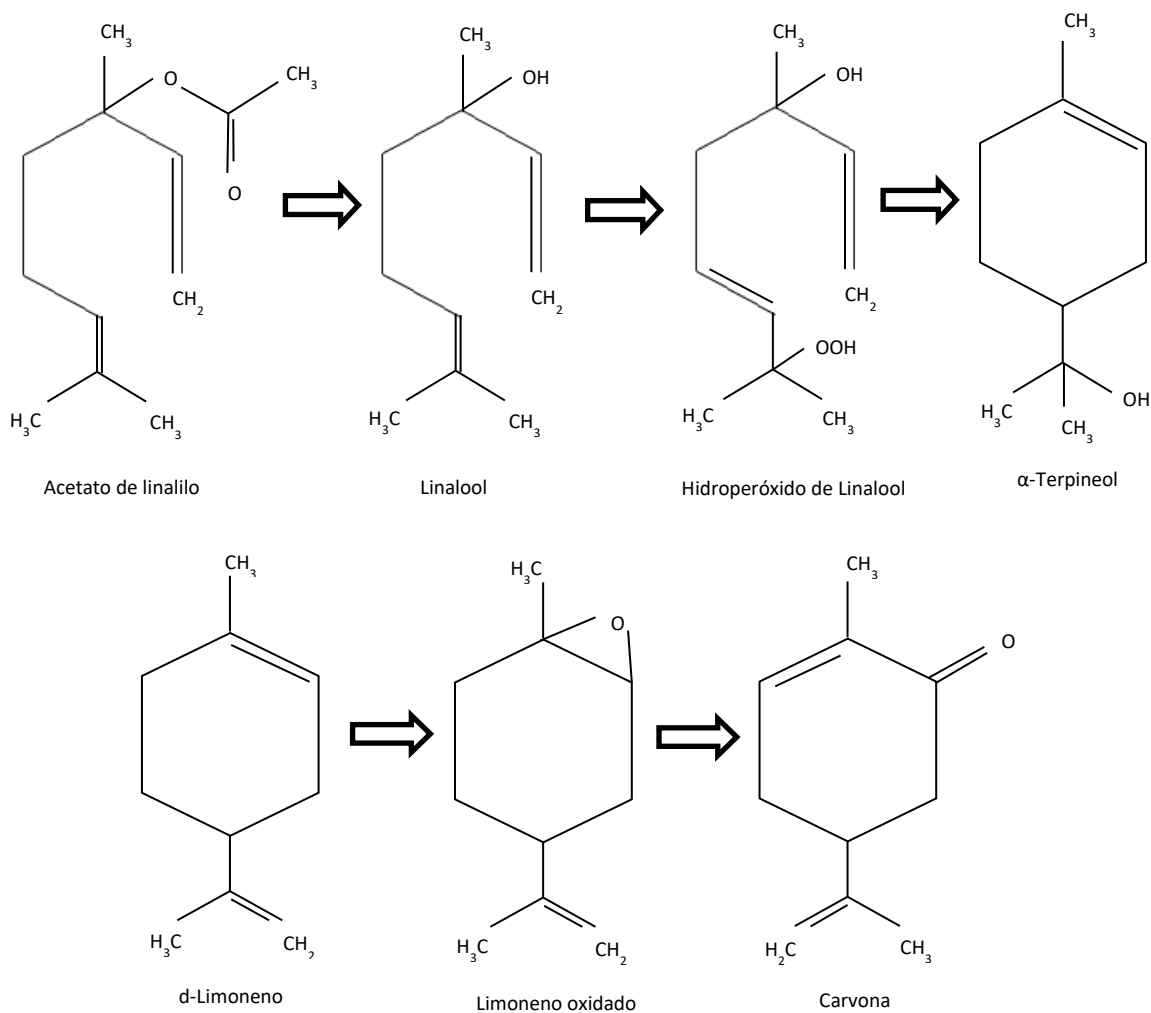


Figura 1. Degradación química del aceite esencial de bergamota

Por otra parte, el d-limoneno, compuesto abundante en los aceites esenciales de cítricos como la bergamota, forma carvona como producto de su oxidación, el cual se considera como precursor de los principales componentes de la esencia de las mentas (Rojas *et al.*, 2018).

El porcentaje de abundancia de carvona, así como de  $\alpha$ -Terpineol pueden utilizarse como indicadores de la estabilidad química del aceite esencial de bergamota (Pudil *et al.*, 1998; Kiran & Singh, 2012).

### 2.3.2 Oxidación de ácidos grasos omega 3

Los ácidos grasos omega 3 son inherentemente inestables. Estos compuestos reaccionan rápidamente con el oxígeno y producen radicales libre (auto-oxidación) e hidroperóxidos (el DHA reacciona más rápidamente que el EPA porque contiene más dobles enlaces) (Barrow *et al.*, 2007).

La oxidación de los ácidos grasos ocurre en dos etapas: en la primera se producen radicales de ácidos grasos libres, los que a su vez reaccionan con oxígeno molecular para producir los peróxidos, razón por la cual se evalúa el índice de peróxido como indicador del deterioro (Karaca *et al.*, 2013).

Los hidroperóxidos no son directamente responsables del deterioro oxidativo, pero son moléculas inestables que se descomponen rápidamente en productos volátiles como aldehídos y cetonas (Barrow *et al.*, 2007; Arab-Tehrany *et al.*, 2012). Los aldehídos han sido implicados en problemas de envejecimiento, mutagénesis y carcinogénesis (Arab-Tehrany *et al.*, 2012).

La oxidación de aceites de LCPUFA afecta la calidad, al generar sabores y olores desagradables (aldehídos y cetonas), así como el valor nutricional de los mismos. Además, la formación de radicales libres durante la oxidación, pueden participar en afecciones a la salud (Arab-Tehrany *et al.*, 2012).

El índice de yodo (IY) es una propiedad química que determina la insaturación de los aceites; existe relación entre el grado de insaturación de un aceite y el grado de enranciamiento, por lo que, su determinación puede ser utilizada como una medida de calidad (Serfert *et al.*, 2009). El IY muestra una tendencia decreciente por los procesos

oxidativos que tienen lugar precisamente sobre los dobles enlaces, característicos en los ácidos grasos omega 3, saturando la molécula y provocando, por consiguiente, una disminución de este índice. Por lo tanto, mientras más bajo es el IY más alto es el grado de saturación del aceite (Liu *et al.*, 2010).

La estabilidad de estos materiales se puede incrementar mediante el uso de un proceso de microencapsulación. Este proceso no solo protege contra la pérdida y los cambios químicos durante el proceso y almacenamiento, sino también permite transformar líquidos a polvos (productos con nuevas propiedades) facilitando su incorporación en diversos productos, así como liberarlo gradualmente durante su consumo (Adamiec & Kalembe, 2006).

## **2.4 Microencapsulación**

El origen de la microencapsulación data del año 1931, investigada por Bungenberg de Jong (Weinbreck *et al.*, 2004; Butstraen & Salaün, 2014; Strauss & Gibson, 2004), quien publicó un trabajo que describía la formación de microcápsulas con un complejo de gelatina-goma arábica, al cual llamo coacervación, para la elaboración de papel calca (Butstraen & Salaün, 2014).

La microencapsulación se define como el proceso en donde una fina capa continua se forma alrededor de partículas sólidas, líquidas y gaseosas (ingrediente activo) que son totalmente contenidas por la pared de la cápsula (Deveci & Basal, 2009; Jafari *et al.*, 2008; Klaypradit & Huang, 2008), para dar origen a partículas de tamaño micrométrico, 1–1000  $\mu\text{m}$  (Kumar, 2006).

El producto resultante de la microencapsulación ha recibido diferentes denominaciones que atienden a su morfología y estructura interna; microesferas y micropartículas (figura 2). En las microesferas el principio activo (núcleo) se encuentra incluido en una especie de reservorio (líquido o sólido), envuelto por una fina película del material de recubrimiento (pared) (Kashappa & Park, 2005). Entre los diferentes tipos de

microesferas con núcleos hidrofóbicos se encuentran: las simples rodeadas por un revestimiento uniforme; las que contienen un núcleo de forma irregular; aquellas con múltiples núcleos en el material de pared y las que tienen múltiples paredes (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2013). En las micropartículas el principio activo se encuentra altamente disperso en el material de recubrimiento, puede ser de naturaleza hidrofóbica o hidrofílica; en las primeras se forman diminutos núcleos en todo el material de pared y en las segundas puede formar una matriz (no se diferencia el núcleo del material de pared) (Kashappa & Park, 2005; Aguilera & Lillford, 2007; Wille, 2006). El tipo de microcápsula obtenida dependerá de las propiedades fisicoquímicas del material activo (núcleo), la composición del material de pared y el método de microencapsulación usado (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2013).

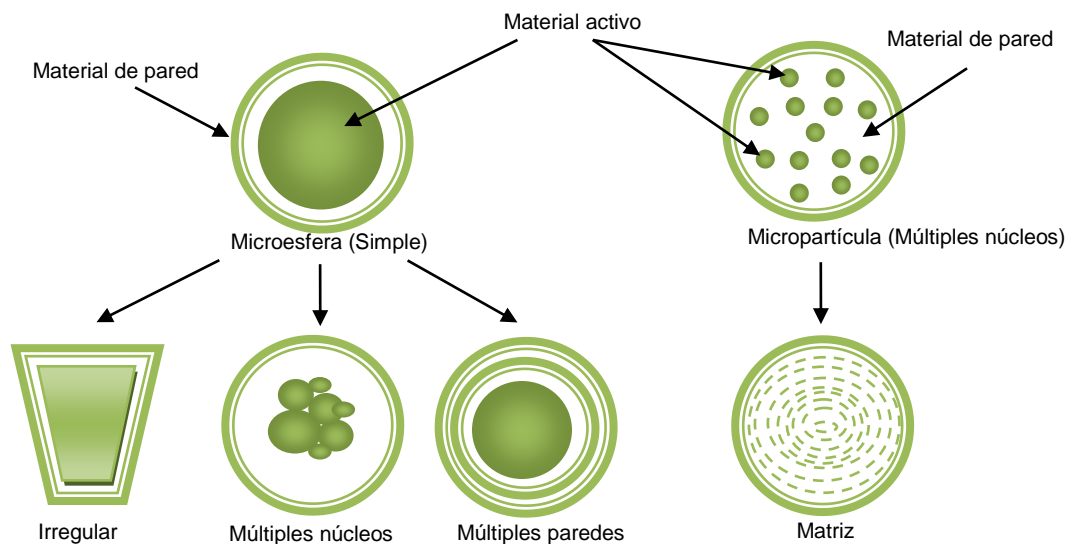


Figura 2. Diagrama representativo de los tipos de morfología obtenidos en microencapsulación

La microencapsulación ayuda a estabilizar ingredientes volátiles o sensibles al calor, la luz, la oxidación, la irradiación o la elevación de temperatura (aceites esenciales, aceites vegetales, aceite de pescado) (Jafari *et al.*, 2008). Este proceso permite convertir líquidos a sólidos, para facilitar su manejo, almacenamiento y alargar su vida de anaquel, ya que reduce las interacciones químicas indeseables con otros ingredientes, además de hacer una liberación gradual de los mismos (Lv *et al.*, 2014; Kralovec *et al.*, 2012; Comunian *et al.*, 2013).

## 2.5 Coacervación

El término coacervación se deriva del latín *acervus*, que significa “cúmulo o agrupamiento” y del prefijo *co* (juntos) para indicar partículas coloidales juntas (Kumar, 2006).

La coacervación es una técnica usada para encapsular materiales lipofílicos (Santos *et al.*, 2015, Comunian *et al.*, 2013) como sabores (Imeson, 2009), aceite de pescado, aceites esenciales, aceites vegetales (Berger, 2007) y activos farmacéuticos para la liberación controlada (Zhang *et al.*, 2011). Aunque es una técnica un poco complicada, su ventaja es la alta eficiencia de encapsulación que genera (>85%) (Kaushik *et al.*, 2014) así como poder encapsular mayor cantidad de núcleo con menor cantidad de material de pared (Kralovec *et al.*, 2012). El proceso de coacervación puede ser simple o complejo.

### 2.5.1 Coacervación simple

La coacervación simple emplea un sólo polímero de recubrimiento. La encapsulación se inicia como una emulsión regular con el polímero adsorbido entre la fase de emulsión y el disolvente. La temperatura o el pH de la solución se modifican y el polímero se convierte en insoluble en el disolvente y forma una fase separada del disolvente (Smith & Charter, 2010; Strauss & Gibson, 2004).

### 2.5.2 Coacervación compleja

La coacervación compleja es un proceso basado en la desolvatación simultánea de dos polielectrolitos inducida por modificaciones en el medio (Jun-xia *et al.*, 2011). La coacervación compleja ocurre cuando dos polímeros (en solución acuosa) con carga eléctrica de signo opuesto y mezclados en proporciones casi estequiométricas, se atraen por fuerzas electrostáticas (figura 3) y se separan en dos fases: una fase coacervada densa y una fase líquida en equilibrio (Kruif *et al.*, 2004; Strauss & Gibson,

2004; Prata *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). La fase coacervada forma la pared de la cápsula, la cual envuelve en forma de una capa continua al material activo (Zhang *et al.*, 2012) por lo que este proceso produce una cápsula verdadera (Santos *et al.*, 2015). El coacervado o precipitado (agregado esférico denso) puede permitir la coalescencia y la formación de estructuras multivesiculares (Turgeon & Laneuville, 2009).

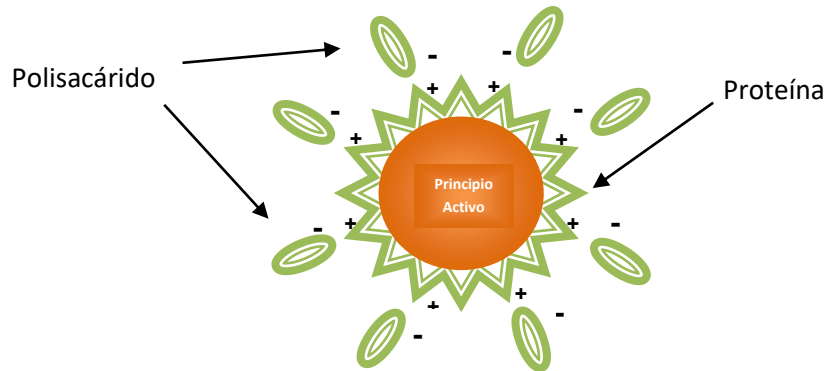


Figura 3. Mecanismo de atracción entre proteína y polisacárido presentes en coacervación compleja (Turgeon & Laneuville, 2009)

En coacervación compleja se utilizan generalmente combinaciones de proteínas y polisacáridos, dando el acomplejamiento entre ambas especies debido a la interacción electrostática atractiva entre las cargas positivas de las proteínas y las cargas negativas del polisacárido (Schmitt & Turgeon, 2010; Lv *et al.*, 2014); este proceso es afectado por el pH, la fuerza iónica, la temperatura, el peso molecular y la concentración de los polímeros (Kruif *et al.*, 2004; Schmitt & Turgeon, 2010; Huang *et al.*, 2012). El sistema más utilizado es gelatina (G) – goma arábiga (GA) (Aguilera & Lillford, 2007), en donde la G es el polielectrolito positivo y la GA el negativo (Mendanha *et al.*, 2009).

Una vez que se forman los coacervados, usualmente son muy inestables y tienen poca resistencia mecánica debido a la naturaleza iónica de la interacción electrostática entre los polímeros (Prata *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012), por lo que es necesario realizar la estabilización de estas estructuras a través del endurecimiento de la cápsula o pared conocido como cross-linker o reticulado (Zhang *et al.*, 2012; Butstraen & Salaün, 2014, Dong *et al.*, 2008).

### 2.5.2.1 Reticulación

El reticulado o endurecimiento, puede transformar la membrana del coacervado en una membrana rígida (Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Prata *et al.*, 2008). Con el reticulado los coacervados se vuelven insolubles en agua, adquieren mayor resistencia termomecánica y poseen excelentes características para la liberación controlada (Yang *et al.*, 2014; Butstraen & Salaûn, 2014; Zhang *et al.*, 2012; Fuguet *et al.*, 2007).

Usualmente el reticulado involucra solo a la proteína (Costa de Conto *et al.*, 2013), se lleva a cabo por la adición de agentes químicos, como el glutaraldehído o formaldehído que reaccionan con los grupos amino libres de las proteínas y forman enlaces covalentes (Bigi *et al.*, 2002; Fuguet *et al.*, 2007; Shenvi *et al.*, 2014). Sin embargo, estos reticulantes químicos son considerados altamente tóxicos para el cuerpo humano, afectan las membranas mucosas de los ojos, nariz y el tracto respiratorio (Bigi *et al.*, 2002; Strauss & Gibson, 2004; Huang *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2008; Prata *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Butstraen & Salaûn, 2014; Peng *et al.*, 2014; Shenvi *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014), por lo que se restringe su uso en un gran número de aplicaciones (Peng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). De acuerdo con la hoja de seguridad, el glutaraldehído tiene una DL<sub>50</sub> oral (rata) de 134 mg/Kg.

Algunos de los agentes reticulantes no tóxicos que han sido estudiados se citan a continuación:

- ❖ **Ácido tánico:** es un tanino hidrolizable, el cual tiene un centro de glucosa esterificado con 9-10 residuos de ácido gálico. Puede ser usado como una alternativa segura de agente reticulante debido a su capacidad para formar complejos con proteína conformacionalmente abiertas, a través de enlaces de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Zhang *et al.*, 2011). De acuerdo con la hoja de seguridad, el ácido tánico tiene una DL<sub>50</sub> oral (rata) de 2260 mg/Kg.

- ❖ Tripolifosfato de sodio: un polianión soluble en agua que puede interactuar con grupos amino cargados positivamente por fuerzas electrostáticas y formar enlaces iónicos para crear un reticulado estable (Butstraen & Salaún, 2014; Shenvi *et al.*, 2014). De acuerdo con la hoja de seguridad, el tripolifosfato de sodio tiene una DL<sub>50</sub> oral (rata) de 2000 mg/Kg.
  
- ❖ Genipina: es un agente reticulante natural, es producto de los frutos de la gardenia. Se ha reportado como una alternativa segura a los aldehídos y puede polimerizar aminoácidos libres o proteínas mediante un ataque nucleofílico a los grupos amino activos (Peng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Bigi *et al.*, 2002). De acuerdo con la hoja de seguridad, la genipina tiene una DL<sub>50</sub> oral (rata) de 382 mg/Kg.
  
- ❖ Polifenoles: estos compuestos tienen un orto-difenol como estructura; pueden reaccionar bajo condiciones de oxidación (se generan ortoquinonas) y formar reticulados covalentes con los grupos amino de las proteínas (Strauss & Gibson, 2004; Balange & Benjakul, 2009). Se ha reportado que los polifenoles pueden alcanzar concentraciones tóxicas si su ingesta se encuentra entre el 1 y 5% total de la dieta diaria, lo habitual en una persona es ingerir, aproximadamente entre 25 mg y 1 g por día (Valencia *et al.*, 2017).
  
- ❖ Transglutaminasa: es una enzima reticulante permitida para su uso en alimentos (procesamiento de carnes) cataliza reacciones aciltransferasas, formando enlaces inter e intramoleculares con las proteínas, genera enlaces covalentes entre el grupo  $\gamma$ -carboxiamida de residuos de glutamina y el grupo  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina (Dong *et al.*, 2008; Costa de Conto *et al.*, 2013; Prata *et al.*, 2008; Motoki & Seguro, 1998). La enzima no presenta problemas de toxicidad, es un aditivo que se encuentra en la categoría: generalmente reconocido como seguro (GRAS por sus siglas en inglés).



Las microcápsulas coacervadas son obtenidas en forma húmeda pero pueden secarse para expandir las posibilidades de incorporarse en diversos productos (Prata & Grosso, 2015 a; Alvim & Grosso, 2010). Los métodos de secado que se han utilizado son la liofilización, remoción de agua con disolventes, secado en horno convencional (pueden causar la desintegración de la pared durante el secado) (Thies, 1995) y el secado por aspersion (se producen partículas individuales pero la baja resistencia mecánica de la pared podría limitar su uso) (Alvim & Grosso, 2010; Dong *et al.*, 2011; Jun-xia *et al.*, 2011, Prata & Grosso, 2015 a; Yang *et al.*, 2015). Los mecanismos de liberación del material encapsulado se pueden llevar a cabo por esfuerzos de corte, extracción con disolventes, temperatura o reacciones químicas y enzimáticas (Barbosa, 2005).

## 2.6 Estado del arte

La coacervación compleja es un método exitoso para la microencapsulación de materiales lipofílicos (Comunian *et al.*, 2013) como aceites esenciales, vegetales y ácidos grasos omega-3 (Kaushik *et al.*, 2014), tal como lo reportan los trabajos de Wu *et al.* (2005), Zimet & Livney (2009), Liu *et al.* (2010) y Wang *et al.* (2014) en los cuales se obtuvo eficiencias de encapsulación de 98, 64, 84 y 99.8% para aceite de pescado, omega-3, linaza y atún respectivamente; además, encontraron que estos materiales fueron más estables a la oxidación, durante el tiempo de almacenamiento o al ser sometidos a corrientes controladas de aire, por lo que la coacervación les ofrece un efecto protector contra la degradación oxidativa.

Aun cuando existen diversas investigaciones acerca del uso de reticulantes para fortalecer la pared de los coacervados, sin embargo, la gran mayoría se han aplicado para el sistema Gelatina-Goma Arábica (G:GA). Por ejemplo, Dong *et al.* (2008) y Zhang *et al.* (2012) encapsularon aceite esencial de menta y aceite de microalga respectivamente, ambas investigaciones están enfocadas en optimizar los parámetros de la reticulación como el pH, temperatura, concentración y tiempo de reticulación para la enzima transglutaminasa, y evaluaron de qué manera influyen éstos en las tasas de liberación del núcleo, también demostraron que las mejores condiciones para formar un

endurecimiento efectivo son pH 6 a 15°C con 15 U de enzima por 6 h y argumentan que las tasas de liberación pueden ser reguladas por cambios en los parámetros de reticulación. Por su parte Peng *et al.* (2014) optimizaron las condiciones de pH, concentración y tiempo de reticulación, para un efectivo reticulado con genipina en microcápsulas de aceite de mostaza, encontraron como óptimos pH 10, 0.075 g genipina/ g proteína por 8 h de reticulación para formar microcápsulas resistente a altas temperaturas, también demostraron que el aceite de mostaza microencapsulado era más estable durante almacenamiento a pesar de modificar la humedad relativa y la temperatura del medio.

Zhang *et al.* (2011) evaluaron todos los parámetros que influyen en la formación de microcápsulas de isotiocianato de alilo (IA) reticuladas con ácido tánico (AT), para maximizar la eficiencia de encapsulación; se encontró que a medida que incrementa la concentración de AT disminuye la eficiencia de encapsulación pero se retarda la liberación de IA; indican que al usar más AT podría llevar a la creación de una estructura de membrana más compacta, la cual es más resistente a la desintegración bajo condiciones gastrointestinales. Otra investigación que sustenta el hecho de que la eficiencia de encapsulación está relacionada con la cantidad de reticulante es la realizada por Ocak (2012), quien probó diferentes concentraciones de glutaraldehído sobre coacervados de colágeno hidrolizado, en donde éste puede reaccionar fácilmente con los sitios activos del glutaraldehído y la microcápsula tendría mayor capacidad de retención de aceite, incluso se determinó que a mayor reticulante la membrana se vuelve más compacta y la liberación del núcleo fue difícil. Por su parte Leclercq *et al.* (2009), comentan que si bien el reticulante puede ayudar a modificar la estructura del coacervado, indican que no hay influencia importante al reticular la pared del coacervado con glutaraldehído ya que la liberación del núcleo tanto de partículas reticuladas como sin reticular es muy similar.

Por otra parte, para evaluar la resistencia térmica de microcápsulas reticuladas se ha medido la liberación del núcleo en diferentes medios bajo diferentes condiciones de temperatura; Dong *et al.* (2011) indican que con la enzima transglutaminasa se pueden

crear cápsulas termorresistentes con liberación lenta del núcleo, sin embargo, Lv *et al.* (2014) & Prata *et al.* (2008) afirman que el reticulado con la enzima es débil y tiene una tasa de liberación mayor que con glutaraldehído.

Otra característica que se ha evaluado es la resistencia mecánica de las cápsulas reticuladas, mediante el tipo de secado al cual son sometidas. Se ha probado la liofilización, secado en horno convencional, remoción de agua con disolventes y el secado por aspersion. La liofilización ha sido el método más utilizado y con el que se ha obtenido menor pérdida del material del núcleo incluso en microcápsulas que no son reticuladas (Leclercq *et al.*, 2009; Alvim & Grosso, 2010), caso contrario al usar el secado por aspersion en donde la pared de los coacervados es fracturada y hay pérdida excesiva del núcleo por lo que se afecta la eficiencia de encapsulación (Rojas *et al.*, 2018). Sin embargo, aunque existen pocos trabajos con este tipo de secado, se han llegado a obtener partículas completas que son capaces de resistir la aspersion durante el secado sí éstas tienen un reticulado efectivo (Prata & Grosso, 2015 a; Dong *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015).

Una limitación del proceso de coacervación compleja, es que la proteína de mayor uso es la gelatina, es la única con la cual se obtiene una pared gruesa, ya que puede formar un gel a bajas temperaturas (5°C), por lo que, si este método no se optimiza, difícilmente puede permitir el uso de otras proteínas como materiales de pared (Wang *et al.*, 2014).

Por otra parte, son pocos los estudios existentes acerca del uso de reticulantes en otros sistemas como: aislado de proteína de suero de leche (APS)-goma arábica GA, proteína de soya-GA, proteína de canola-quitosano (Q) o Q-GA en donde las microcápsulas fueron endurecidas con glutaraldehído, transglutaminasa, genipina y tripolifosfato de sodio, respectivamente (Weinbreck *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2015; Costa de Conto *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2015, Butstraen & Salaún, 2014). Estos trabajos se han enfocado en mejorar la resistencia de la pared para hacer uso de la liberación controlada del núcleo, que se puede obtener cuando las partículas son

reticuladas. Por otra parte, en el trabajo realizado Koupantsis *et al.* (2016) se evaluó el efecto que tiene el agente reticulante sobre la eficiencia de encapsulación para los sistemas APS-carboximetilcelulosa (CMC), Caseinato de sodio (CS)-CMC reticulados con glicerol y ácido tánico, en donde concluyen no solo el tipo de reticulante influye en la cantidad de material encapsulado, sino también el sistema en el cual se aplica el reticulante, ya que se obtuvieron eficiencias de encapsulación mayores al 80% para CS-CMC reticuladas con glicerol comparadas con un 30% para APS-CMC con el mismo reticulante.

Como puede observarse de lo anterior, el reticulante juega un papel muy importante en el proceso de coacervación, sin embargo, muy pocos trabajos han evaluado su influencia en la eficiencia de encapsulación; la gran mayoría ha sido en las características de las microcápsulas. La reticulación de la pared de la microcápsula es necesaria ya que los materiales que forman la pared no garantizan una estructura firme en las microcápsulas resultantes (Koupantsis *et al.*, 2016); además, aunque con este método se puede obtener una alta eficiencia de encapsulación, si la pared no ayuda a resguardar el núcleo, esta ventaja podría perderse.

De acuerdo con la revisión bibliográfica, se puede concluir que es factible realizar la encapsulación de agentes lipofílicos mediante coacervación compleja con el fin de usar los coacervados como ingredientes bioactivos. Incluso, es factible utilizar agentes reticulantes para formar coacervados con pared estable que no ocasionan un efecto nocivo, como es el caso del glutaraldehído, sin embargo, hay pocos trabajos que muestran el efecto del reticulante sobre la eficiencia de encapsulación del material coacervado. No hay estudios que evalúen comparaciones entre ellos, para conocer cuál ofrece mejores características a los coacervados: como la rigidez de la cápsula, la estabilidad a la oxidación e incluso la facilidad para liberar el aceite. Por lo que en el presente trabajo se plantea evaluar el uso del ácido tánico, tripolifostato de sodio, ácido tánico oxidado y la enzima transglutaminasa como reticulantes no tóxicos en la encapsulación por coacervación compleja de aceite esencial de bergamota y ácidos grasos omega 3.

Adicionalmente, ya que se ha reportado que las partículas reticuladas son resistentes al calor, las microcápsulas coacervadas obtenidas serán sometidas a secado por aspersión para obtener las microcápsulas en polvo y evaluar la resistencia mecánica y térmica, al observar la integridad de la pared y compararlas con la liofilización que es el método de secado comúnmente utilizado para secar microcápsulas coacervadas. Se desconoce cómo puede afectar el secado por aspersión al aceite encapsulado, y qué estabilidad tendría durante el almacenamiento una vez reticulado el material de pared, medida por la generación o no de compuestos derivados de su oxidación.

Aunque el sistema más utilizado en coacervación compleja es el de G:GA (Gelatina:Goma árabiga), los materiales elegidos para este trabajo son las proteínas de suero de leche y 3 polisacáridos aniónicos: goma árabiga, alginato de sodio y carboximetilcelulosa de sodio. Se descartó el sistema gelatina–goma árabiga porque la solución de gelatina debe someterse a calentamiento (50°C) y los compuestos sensibles como los aceites esenciales o el de pescado se pueden dañar a estas temperaturas, alterando la calidad del aceite en la encapsulación. Por lo que se usaron sistemas que pueden ser manipulados a temperatura ambiente, además de aprovechar las características nutricionales y funcionales que ofrecen las proteínas de suero de leche.

Otro de los sistemas que se propone utilizar es el de las proteínas de suero y quitosano (Q). El quitosano es un polisacárido catiónico, el tipo de polisacárido altera el pH de coacervación (con polisacáridos aniónicos es ácido y con catiónicos es neutro) es interesante conocer cómo influye el tipo de polisacárido en el coacervado y el uso de los diferentes agentes reticulantes en la pared del mismo.

Dado que se propone secar los coacervados por liofilización y secado por aspersión, a continuación, se hace una breve descripción de estos métodos de secado.

## 2.7 Liofilización

La liofilización es un proceso de secado que se basa en sublimar el hielo de un producto congelado en condiciones de vacío. La liofilización consiste en tres fases: congelación, secado primario y secado secundario (Tang & Pikal, 2004). En la primera etapa se enfría el líquido y a medida que se congela, los sólidos se concentran más en el líquido remanente. El secado primario comienza cuando la presión se reduce a valores por debajo de la presión de vapor del hielo y la temperatura incrementa para suministrar calor latente y eliminar el hielo por sublimación. A partir de ese momento se forma una red abierta de poros debido a la sublimación de los cristales de hielo, que proporciona un camino para la desorción del agua de la muestra. Durante el secado secundario se incrementa nuevamente la temperatura y la presión se reduce para eliminar el agua líquida (Morais *et al.*, 2016). La etapa del secado primario es muy larga y en ella se elimina la mayor cantidad de agua (75 – 90%) lo cual tiene un gran impacto en el costo del proceso (Wang *et al.*, 2012).

La liofilización es adecuada para secar materiales sensibles al calor. Como el proceso se lleva a cabo a bajas temperaturas, esto representa un menor riesgo para los productos lábiles (Morais *et al.*, 2016). Sin embargo, es un proceso muy costoso (30 a 50 veces más costoso que el secado por aspersion), tiene bajo rendimiento, y un largo tiempo de secado, necesitando un considerable consumo de energía (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Morais *et al.*, 2016).

## 2.8 Secado por aspersion

Esta operación convierte, una solución, emulsión, suspensión o pasta en partículas sólidas (Jafari *et al.*, 2008). En este método, el material a secar se atomiza con una boquilla o disco centrífugo, en forma de diminutas gotas, dentro del secador y se somete a una corriente controlada de aire caliente (figura 4) (Gibbs *et al.*, 1999). El contacto entre las gotas y el aire se lleva a cabo durante la atomización; la rápida evaporación del disolvente (normalmente agua) mantiene la temperatura de la gota

debajo de 60°C (Gharsallaoui *et al.*, 2007); las partículas sólidas obtenidas son recogidas en el fondo del secador y los finos en un separador ciclónico (Gibbs *et al.*, 1999).

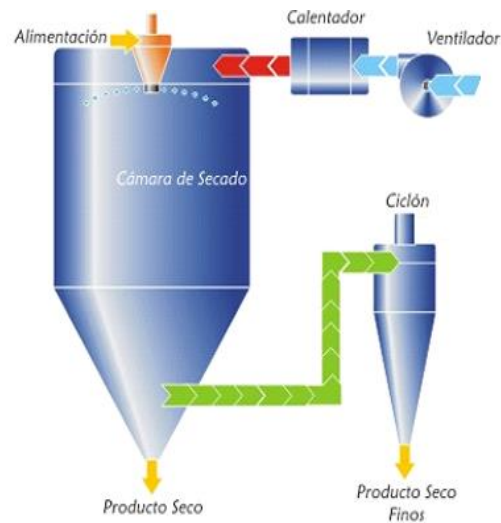


Figura 4. Secador por aspersión (Gibbs *et al.*, 1999)

Aunque el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 - 30 seg), puede provocar la pérdida de cantidades significativas de materiales que son sensibles a degradarse a temperaturas elevadas (Berger, 2007). Este proceso es económico, flexible, produce partículas en polvo de buena calidad y se ha aplicado grandemente a procesos de microencapsulación (Gibbs *et al.*, 1999).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Los compuestos bioactivos lipofílicos han recibido una creciente atención en diferentes trabajos de investigación debido a que han demostrado ser capaces de poseer importantes propiedades biofuncionales en beneficio de la salud; desafortunadamente se ha limitado su uso por la alta susceptibilidad que tienen a la degradación.

La degradación puede ser reducida por un proceso de microencapsulación como la coacervación compleja con la cual se puede obtener una alta eficiencia de encapsulación del material activo con menor cantidad de material de pared, sin embargo, las microcápsulas coacervadas son susceptibles a daño mecánico y coalescencia debido a la delgada pared formada, la cual puede ser endurecida para reducir este problema.

El endurecimiento de la pared aún sigue siendo el mayor desafío en coacervación compleja. Ya que la pared de los coacervados es muy débil debido a la naturaleza iónica del acomplejamiento electrostático. Usualmente el reticulado se lleva a cabo por la adición de agentes químicos, como el glutaraldehído o formaldehído. Sin embargo, estos reticulantes químicos son considerados tóxicos para el cuerpo humano, por lo que ha surgido la necesidad de emplear agentes capaces de formar el reticulado de los coacervados sin acarrear problemas de toxicidad, que generen cápsulas resistentes para no tener restricciones en su incorporación como ingredientes bioactivos en diversos productos.

Hasta el momento, no hay estudios que evalúen el efecto de diferentes agentes reticulantes y su influencia en la eficiencia de encapsulación, así como el grado de protección que se le confiere al agente lipofílico encapsulado por coacervación compleja después de ser sometidos a un proceso de secado ya sea por liofilización o secado por aspersion, por lo que se plantea la realización de este trabajo.



#### **4 HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN**

Debido a que la pared de las microcápsulas obtenidas por coacervación compleja es muy débil, el uso de agentes reticulantes con probada inocuidad le dará mayor resistencia mecánica para soportar la etapa de secado por aspersion favoreciendo la eficiencia de encapsulación.

## 5 OBJETIVOS

### ❖ GENERAL

Evaluar el efecto de diferentes agentes reticulantes en la eficiencia de encapsulación de agentes bioactivos lipofílicos mediante las técnicas combinadas coacervación compleja-secado por aspersion y coacervación compleja-liofilización.

### ❖ ESPECIFICOS

- Caracterizar la coacervación compleja de agentes bioactivos lipofílicos, con base en la concentración y proporción de polímeros, pH, relación núcleo:pared y eficiencia de encapsulación.
- Evaluar el efecto de diferentes agentes reticulantes en la eficiencia de encapsulación, con base en la concentración del agente reticulante y el tiempo de reticulado.
- Realizar el secado de las microcápsulas coacervadas con y sin agente reticulante utilizando el secado por aspersion y liofilización. Caracterizar las microcápsulas secas, con base a la eficiencia de encapsulación, contenido de humedad, morfología, tamaño y distribución de tamaño de partícula.
- Evaluar la liberación del agente bioactivo lipofílico en un fluido gastrointestinal simulado de las microcápsulas que obtengan la mejor eficiencia de encapsulación.
- Evaluar el deterioro de las microcápsulas de agentes bioactivos lipofílicos durante almacenamiento a 30°C y determinar los productos de oxidación.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 MATERIALES

#### Material

Aislado de proteína de suero de leche con un contenido de proteína mayor al 90%, fue obtenido de Hilmar Ingredients (California, USA). Goma arábica fue adquirida de la empresa Gomas Naturales (Ciudad de México). Alginato de sodio grado farmacéutico proporcionado por Alquimia Mexicana (Ciudad de México). Carboximetilcelulosa Gelycel F1 2000 grado farmacéutico fue adquirida de Química Amtex S. A. de C. V. (Ciudad de México). Aceite esencial de naranja adquirido de Adytec Food (Ciudad de México) con una densidad de 0.843 g/mL. Aceite esencial de bergamota proporcionado por MANE México (Ciudad de México) con una densidad de 0.875 g/mL. Aceite de pescado 40/20 (contenido de ácidos grasos omega 3 mínimo 60%) adquirido de América Alimentos (Ciudad de México). Glutaraldehído 25% fue obtenido de J. T. Baker (TM Avantor Performance Materials, Edo. México, México). Quitosano (bajo peso molecular), ácido tánico, tripolifosfato de sodio, pepsina de la mucosa gástrica porcina (3200 – 4500 unidades de actividad/ mg de proteína), pancreatina del páncreas porcino 4x USP (proteasa 104 unidades USP/ mg, amilasa 132 unidades USP/ mg, lipasa 17.8x unidades USP/ mg), y estándares externos para cromatografía ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, d-limoneno, linalool, mirceno, acetato de linalilo,  $\gamma$ -terpineno, carvona y  $\alpha$ -terpineol) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., St. Louis Mo., USA). Enzima transglutaminasa Activa GS (actividad nominal de 100 U/ g polvo) fue adquirida de Ajinomoto México (Ciudad de México). Todos los reactivos fueron de grado analítico.

## Equipo Experimental

1. Agitador nivel laboratorio Stir Pak® Mod 5554 10 Cole Parmer con una turbina de seis paletas equidistantes de 5 cm de diámetro
2. Agitador de acción dual (orbital/recíproco) Mod 3508 Lab-Line Instruments, con velocidad de 50 a 400 rpm
3. Balanza analítica modelo SA 210D marca Scientech
4. Bomba de desplazamiento positivo modelo 714-05 y cabezal modelo 020-000 marca MICRO PUMP
5. Centrífuga modelo VS-3400 Cole Parmer
6. Homogenizador digital Ultraturrax® T25
7. Horno convencional
8. Parrilla con agitación magnética GLHPS-6 Global Lab
9. Potenciómetro Conductronic pH120
10. Tamiz No. 200
11. Termobalanza marca OHAUS M35
12. Analizador de tamaño de partícula Malvern IM 026 serie 2600 (Worcestershire, UK)

La determinación del tamaño de partícula, se basa en la difracción de un rayo láser por las partículas, que es medido por el equipo y traducido en una gráfica de tamaños y distribución de tamaño de partícula. Se utilizaron los lentes de 63, 100 y 300 mm.

13. Cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus (Ciudad de México, México)

El cromatógrafo de gases cuenta con un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar At-1 Heliflex de 30 m de largo, a través de la cual el gas portador (N<sub>2</sub>) arrastra la muestra y los componentes de ésta se separan a medida que pasan por la columna, para generar los picos que constituyen un cromatograma. Este equipo se utiliza para la evaluación de la estabilidad del aceite encapsulado durante el almacenamiento.

#### 14. Espectrofotómetro UV-VIS JENWAY 7305 (Staffordshire, UK).

El espectrofotómetro UV-VIS tiene un intervalo de longitud de onda de 198 – 1000 nm, resolución de 1 nm y cuenta con una lámpara de xenón. Este instrumento tiene modos de medición para absorbancia, % de transmitancia y concentración. Utiliza un software impulsado por iconos y un sistema de navegación para su fácil manejo.

#### 15. Liofilizador SMH50 USIFROID (Francia)

El equipo tiene una cámara circular con dos bandejas, cada una con una superficie de enfriamiento de 0.15 m<sup>2</sup> y una capacidad nominal de hielo de 4 kg. La temperatura del condensador es de -60 a 25° C, cuya capacidad de evaporación de agua es de 84 mL/h a una presión de vacío de 1 a 2 mTorr. Tiene un sistema para programar rampas de temperatura y vacío para optimizar el proceso de liofilización.

#### 16. Microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5800IV (Tokyo, Japón)

El Microscopio electrónico de barrido o SEM (*Scanning Electron Microscope*), utiliza un haz de electrones para formar una imagen de alta resolución. Las muestras son recubiertas con una capa delgada de oro para darle propiedades conductoras. Posteriormente es barrida con los electrones acelerados que viajan a través del cañón a 15 kV.

#### 17. Microscopio óptico de contraste de fases Zeiss Axiophot (Jena, Alemania)

El microscopio óptico de contraste de fases equipado con una cámara digital AxioCam HRC de 15 MP y el software Zenblue edition.

18. Secador por aspersión Niro atomizer modelo Mobile Minor (Soeborg, Denmark).

El secador consta de una cámara de secado cilíndrico cónica cuyo diámetro es de 0.80 m, la zona cilíndrica de 0.75 m de alto y la zona cónica de 0.67 m de diámetro, tiene un aspersor de disco centrífugo que opera de manera neumática; con una presión de aire de 6 kg/cm<sup>2</sup>, que genera una velocidad del disco de 32000 rpm. En el ciclón separador se colecta el producto seco.

19. Zetómetro zetaplus 21471 (Brookhaven Instruments Co., Holtsville, USA)

El zetómetro es un instrumento que ayuda a determinar la carga eléctrica de suspensiones coloidales al cual se le denomina potencial zeta; emplea la técnica de escaneo de luz electroforética la cual se basa en un haz de referencia óptico (modulado) y la inmersión del sistema de electrodos. Tiene un software para el control del instrumento y análisis de datos.

## 6.2 Desarrollo Experimental

El desarrollo experimental para lograr los objetivos planteados en este trabajo, se resume en el diagrama de bloques de la figura 5.

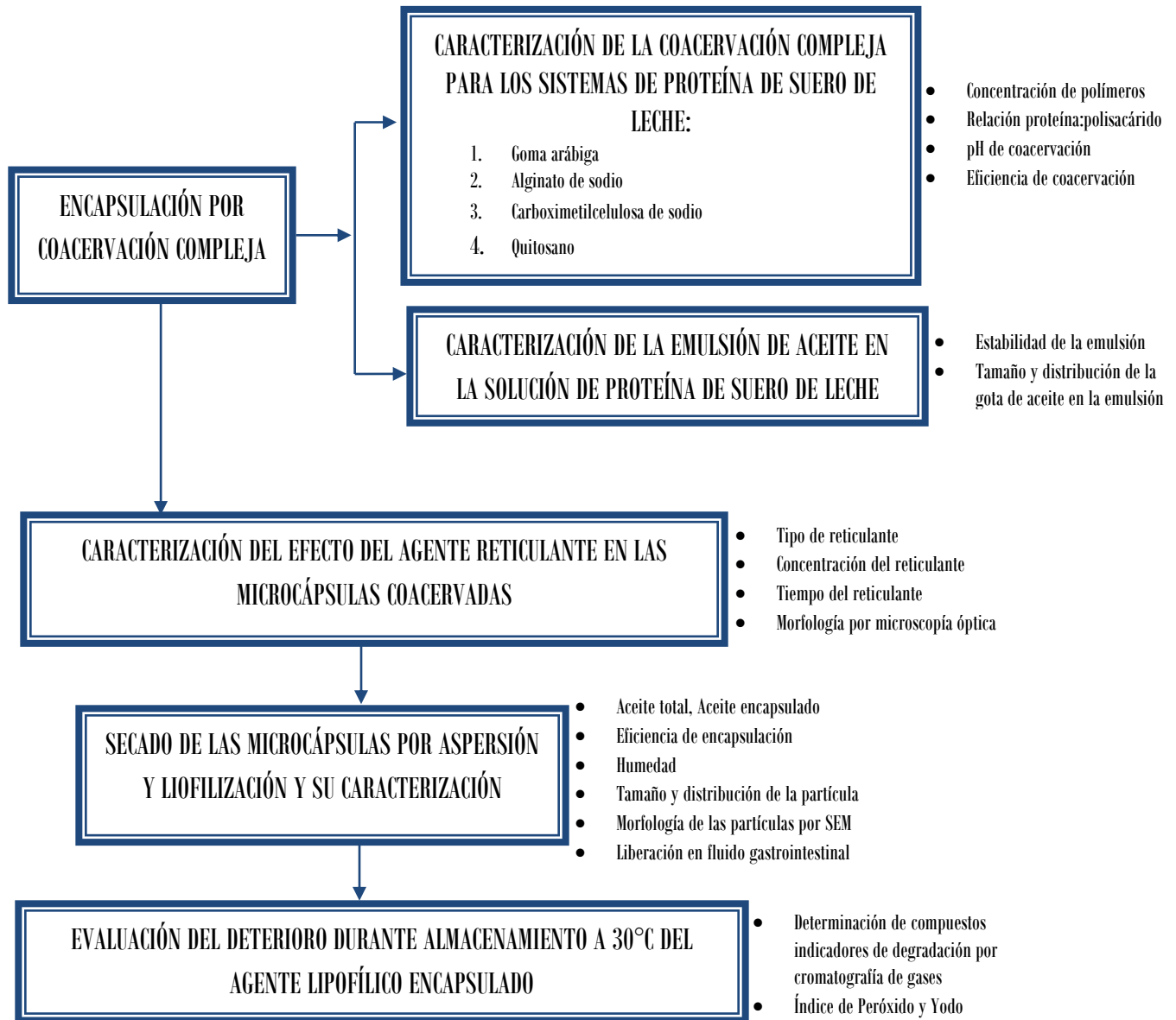


Figura 5. Diagrama de bloques del trabajo experimental para microencapsular agentes bioactivos lipofílicos por coacervación compleja

Los métodos analíticos para realizar la caracterización de las muestras antes y después de los procesos de secado se describen a continuación.

## 6.3 MÉTODOS

### 6.3.1 Caracterización de la coacervación compleja

#### 6.3.1.1 Determinación de potencial Z a distintos valores de pH

**Soluciones de los polímeros.** Se prepararon las soluciones acuosas de aislado de proteína de suero de leche (APS), goma arábiga (GA), alginato de sodio (AS), carboximetilcelulosa de sodio (CMC) y quitosano (Q) a una concentración de 0.1% (w/w). El Q se disolvió en ácido acético al 2% (v/v) (Butstraen & Salaûn, 2014). Todas las soluciones se hidrataron 24 h a  $3\pm 1^\circ\text{C}$ . El pH para los polímeros APS, CMC y AS se ajustó con HCl 0.1 N para valores de pH entre 4-6.5; HCl 1 N para valores de pH de 2-4 y para valores de pH arriba de 6 se utilizó NaOH 0.1 N. Los valores de pH (2 – 8) de la solución de Q fueron ajustados únicamente con NaOH 0.1 N. Se determinó el potencial zeta (mV) de los polímeros solos a los diferentes valores de pH, por triplicado, en un Zetómetro zetaplus 21471 para conocer el perfil de las cargas eléctricas.

**Relaciones proteína:polisacárido (Pr:Ps).** Se prepararon soluciones acuosas a una concentración de 0.1% (w/w) con las siguientes relaciones Pr:Ps 1:1, 2:1 y 3:1 para los sistemas APS:GA, APS:AS y APS:CMC; para el sistema APS:Q se utilizaron las relaciones Pr:Ps 5:1, 10:1 y 15:1. Se dejaron hidratar 24 h a  $3\pm 1^\circ\text{C}$ . El pH de las mezclas se ajustó con HCl 0.1 N para valores de pH de 4-6; HCl 1 N para valores de pH de 2-4 y para valores de pH arriba de 6 con NaOH 0.1 N. La formación del complejo se observó visualmente por la presencia de un precipitado. Estas muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 15 min y se determinó por triplicado el potencial zeta (mV) en el sobrenadante con un Zetómetro zetaplus 21471, en el resto de las muestras que no presentaron formación de precipitado, el potencial zeta se midió directamente; los resultados fueron reportados con respecto al pH para determinar el pH de coacervación que es el punto en el que el potencial zeta de las mezclas es cero o muy cercano a cero y es conocido como el pH de máxima equivalencia eléctrica entre el APS y los polisacáridos.



### 6.3.1.2 Rendimiento de coacervación

Se evaluó el rendimiento de coacervación para las relaciones Pr:Ps 1:1, 2:1 y 3:1 para los sistemas APS:GA, APS:AS, APS:CMC, y de 5:1, 10:1 y 15:1 para APS:Q a los valores de pH donde se observó presencia de precipitado utilizando una concentración de 1 y 2% (w/w) de contenido de sólidos totales. Al formarse los coacervados las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min, el sobrenadante se desechó y el precipitado se recuperó, el cual se secó en un horno convencional a 50°C a peso constante, las muestras se analizaron por duplicado, el rendimiento de coacervación fue estimado de acuerdo a la ecuación 1 (Wang *et al.*, 2014).

$$\% \text{ Rendimiento de Coacervación} = \frac{\text{Peso de coacervado seco}}{\text{Peso total de los polimeros en solución}} \quad (\text{Ec. 1})$$

### 6.3.2 Microencapsulación por coacervación compleja

Para establecer las mejores condiciones de coacervación compleja, se utilizó aceite esencial de naranja, posteriormente fue sustituido por aceite esencial de bergamota o ácidos grasos omega 3, esto es debido al menor costo del aceite esencial de naranja.

La microencapsulación del agente lipofílico (aceite esencial de naranja) por coacervación compleja se realizó para cada uno de los sistemas APS:CMC, APS:AS, APS:GA y APS:Q, con la relación Pr:Ps, pH y concentración de sólidos donde se obtuvo el máximo rendimiento de coacervación.

En la primera etapa se realizó la emulsión de aceite esencial en la solución de proteína (APS) con un homogeneizador Ultraturrax T25 por 5 min a 10000 rpm en cantidad tal que permitiera obtener una relación final aceite:material de pared 1:1 y 1:2 (w/w); posteriormente se adicionó lentamente la solución del polisacárido correspondiente (GA, AS, CMC o Q) a la emulsión aceite:APS bajo agitación constante (360 rpm), usando un agitador mecánico Stir Park Model 4554-10. Se ajustó lentamente el pH a 3,

3.5 y 2.5 (pH de coacervación) para el sistema APS:CMC, APS:GA y APS:AS con HCl 0.1 N respectivamente, y a pH 6 con NaOH 1 N para el sistema APS:Q. Se mantuvo la agitación a 360 rpm por 30 min para formar las microcápsulas coacervadas. Se evaluó el aceite encapsulado tanto en las microcápsulas coacervadas en suspensión como en las que se secaron por aspersión y liofilización, sin adición de agente reticulante (Weinbreck *et al.*, 2004).

En experimentos paralelos a las microcápsulas coacervadas se les adicionó el agente reticulante propuesto para endurecer la pared de los coacervados y se llevó a cabo el secado de los mismos a través del secado por aspersión y por liofilización.

### 6.3.3 Agentes reticulantes

Como el parámetro de interés es la eficiencia de encapsulación, los reticulantes propuestos fueron seleccionados en base a investigaciones en donde ya han sido aplicados y obtuvieron eficiencias de encapsulación mayores al 85% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Agentes reticulantes reportados en la literatura

Sistema	Reticulante	Concentración	Tiempo	Autor
G:GA	Ácido tánico	0.7 – 1.5%	5 min	Zhang <i>et al.</i> (2011)
G:Q	Tripolifosfato de sodio	6%	3 h	Prata & Grosso (2015a)
G:GA	E.Transglutaminasa	15U, 30 U	3, 6, 12 h	Zhang <i>et al.</i> (2012)
G:GA	Polifenol oxidado	2%	24 h	Strauss & Gibson (2004)
G:GA	Glutaraldehído	8.33%	12 h	Leclercq <i>et al.</i> (2009)

Para cada reticulante empleado (excepto glutaraldehído) se planteó un diseño factorial completo  $2^2$  (2 factores: concentración de agente reticulante y tiempo de reticulado con dos niveles cada uno), considerando como parámetro de respuesta la eficiencia de encapsulación del agente lipofílico. La concentración de reticulante fue calculada con base a la concentración de APS utilizada en cada sistema.

### 6.3.3.1 Ácido tánico (AT)

Se utilizó como base el método propuesto por Zhang *et al.* (2011) modificando el tiempo de reticulación. En pruebas preliminares, se utilizó como tiempo de reticulación 5 min, sin embargo, no se observó ningún efecto sobre la eficiencia de encapsulación por lo que, se incrementó a 3 y 6 h. Se evaluaron las concentraciones mostradas en el cuadro 2. El AT se disolvió en 50 mL de agua (se ajustó previamente la solución al pH de coacervación para cada sistema) se adicionó a las microcápsulas coacervadas formadas bajo agitación constante a 360 rpm a temperatura ambiente.

Cuadro 2. Condiciones del AT como agente reticulante

Variable	Valor
Concentración de AT (% w/w)	1 y 2
Tiempo de reticulado (h)	3 y 6

### 6.3.3.2 Tripolifosfato de sodio (TPF)

Se utilizó como base el método descrito por Prata & Grosso (2015 a), se prepararon las soluciones de tripolifosfato de sodio (TPF) que se muestran en el cuadro 3. Se preparó la solución acuosa de TPF, se ajustó el pH de la solución al pH de coacervación de cada sistema y se adicionó a las microcápsulas coacervadas formadas con agitación constante a 360 rpm a temperatura ambiente.

Cuadro 3. Condiciones del TPF como agente reticulante

Variable	Valor
Concentración de TPF (% w/w)	6 y 12
Tiempo de reticulado (h)	2 y 4

### 6.3.3.3 Ácido tánico oxidado (ATO)

Se utilizó como base el método propuesto por Strauss & Gibson (2004). Para esto se preparó la solución de ácido tánico al 5% (w/v) el pH se ajustó a 8 con NaOH 1N, se mantuvo en agitación constante a  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  y se sometió a un burbujeo de aire por 5 h para convertir el compuesto fenólico a quinona. De esta solución se tomó una cantidad tal para tener las concentraciones planteadas en el cuadro 4; el pH de la solución se ajustó al pH de coacervación de cada uno de los sistemas y se adicionó a las microcápsulas coacervadas bajo agitación constante a 360 rpm.

Cuadro 4. Condiciones del ATO como agente reticulante

Variable	Valor
Concentración de ATO (% w/w)	1 y 2
Tiempo de reticulado (h)	3 y 6

### 6.3.3.4 Enzima transglutaminasa (TG)

Se utilizó como base el método descrito por Zhang *et al.* (2012). Este reticulante únicamente se probó en el sistema APS:Q, debido a que el pH de coacervación es similar al de mayor actividad de la enzima. Se preparó la solución de transglutaminasa (TG) de acuerdo a las concentraciones planteadas en el cuadro 5. Se preparó una solución acuosa de enzima a  $42 \pm 2^\circ\text{C}$  en agitación suave, el pH de la solución se ajustó a 6 y se adicionó a las microcápsulas coacervadas formadas a temperatura ambiente bajo agitación constante (360 rpm).

Cuadro 5. Condiciones de TG como agente reticulante

Variable	Valor
Concentración de TG (U)	15 y 30
Tiempo de reticulado (h)	3 y 6

### **6.3.3.5 Glutaraldehído al 25% en agua (GLU)**

Se usó glutaraldehído al 25% en agua como reticulante de comparación, ya que, aunque es tóxico para el humano, se ha utilizado por varios autores (Weinbreck *et al.*, 2004; Prata *et al.*, 2008; Prata & Grosso, 2015 a; Saravanan & Rao, 2010; Jain *et al.*, 2015). Se tomó como base el método descrito por Leclercq *et al.*, (2009). Se adicionó 8.33% (w/w) de glutaraldehído/ g de proteína a las microcápsulas coacervadas y se dejó reaccionar por 6 h, con agitación constante a 360 rpm a temperatura ambiente.

### **6.3.4 Caracterización de la emulsión aceite:APS**

Se caracterizó la emulsión de aceite esencial de naranja en la solución de proteína, con base a las siguientes determinaciones:

#### **6.3.4.1 Estabilidad de la emulsión aceite:APS**

Para determinar la estabilidad de las emulsiones, se usaron muestras por duplicado de 10 mL cada una, fueron colocadas en tubos de ensaye y almacenadas durante 2 días a temperatura ambiente. Se evaluó visualmente la aparición de una zona en la superficie de diferente coloración que la emulsión o hasta la completa separación de aceite de la solución del material de pared, para determinar durante qué tiempo la emulsión es estable (Velázquez *et al.*, 2014).

#### **6.3.4.2 Tamaño y distribución de tamaño del glóbulo de aceite en la emulsión de APS**

La distribución del tamaño de las gotas de aceite en la solución de APS, se determinó por duplicado con el analizador de tamaño de partícula Malvern IM 026 serie 2600 usando agua como dispersante, la cual se colocó en la bomba de alimentación, se adicionó la emulsión en la cantidad indicada por el equipo como óptima y se circuló la muestra a través de la celda para ser medida mediante la difracción láser. Se determinó

la distribución de tamaño de partícula y el diámetro de esfera equivalente que es el diámetro de la esfera con el mismo volumen de la partícula (diámetro  $[D_{4,3}]$ ).

### 6.3.5 Curva de calibración de aceite esencial (Prata & Grosso, 2015 a)

Una concentración conocida de aceite esencial (naranja o bergamota) en hexano fue escaneada en el intervalo de 200 – 400 nm usando un espectrofotómetro UV-VIS JENWAY 7305. Se registró la máxima absorbancia ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) a 313 y 304 nm para aceite de naranja y bergamota respectivamente, a éstas longitudes se midieron concentraciones secuenciales de cada aceite esencial. Se realizaron las curvas de calibración (apéndice 1 y 2) graficando la concentración conocida de aceite esencial contra su correspondiente valor de absorbancia, obteniendo las siguientes ecuaciones:

- Aceite esencial de naranja ( $R^2 = 0.9994$ )

$$Abs = 664.45 [C] - 0.0156 \quad (\text{Ec. 2})$$

- Aceite esencial de bergamota ( $R^2 = 0.9977$ )

$$Abs = 225.26 [C] + 0.0595 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde: Abs es el valor de absorbancia y C es la concentración de aceite (g/mL).

### 6.3.6 Eficiencia de encapsulación de las microcápsulas coacervadas en suspensión

Las microcápsulas coacervadas húmedas, sin reticulante, se separaron por decantación del sobrenadante. Se tomó una alícuota de 10 mL del sobrenadante y se aforó con hexano a 25 mL. Se agitó ligeramente y se colocó en un matraz de separación para recuperar la fase orgánica que contiene el aceite libre en el sobrenadante. Se determinó la absorbancia y se interpoló en la curva de calibración para conocer la concentración

de aceite en el sobrenadante (aceite no encapsulado). El aceite encapsulado se determinó por diferencia entre el aceite originalmente adicionado en el proceso de coacervación y el aceite sin encapsular (sobrenadante). La eficiencia de encapsulación (EE) fue calculada (ecuación 4) por la relación entre el aceite encapsulado y el aceite originalmente adicionado:

$$EE = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:  $W_1$  es el aceite esencial originalmente adicionado al proceso de coacervación (g);  $W_2$  es el aceite esencial no encapsulado (sobrenadante) (g).

### **6.3.7 Morfología de las microcápsulas coacervadas por microscopía óptica**

Una gota de las microcápsulas coacervadas fue colocada en un portaobjetos y cubiertas con cubreobjetos. Los coacervados fueron observados usando un microscopio óptico de contraste de fases y una cámara digital AxioCam HRC de 15 MP a una magnificación de 400x.

### **6.3.8 Secado por aspersión de las microcápsulas coacervadas**

Las microcápsulas coacervadas con y sin agente reticulante fueron secadas por aspersión. La solución se mantuvo en agitación constante para evitar aglomeración, fue alimentada dentro de la cámara usando una bomba peristáltica, las condiciones de secado fueron 160°C como temperatura de entrada y 90°C como temperatura de salida de aire (Rojas *et al.*, 2018).

### **6.3.9 Liofilización de las microcápsulas coacervadas**

Una vez formadas las microcápsulas coacervadas con y sin reticulante, se almacenaron por 24 h a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  para promover la separación de fases y remover la mayor parte de la fase acuosa por decantación. Las microcápsulas coacervadas fueron liofilizadas con las

siguientes condiciones de operación: tiempo del proceso de 24 h, presión 2 mTorr, temperatura del condensador de -50°C y temperatura de sublimación de 35°C, usando el liofilizador Usifroid SMH-50 (Francia).

### **6.3.10 Caracterización del producto encapsulado seco**

Las siguientes determinaciones se realizaron para caracterizar al producto encapsulado seco tanto el obtenido por aspersion como por liofilización:

#### **6.3.10.1 Contenido de aceite total**

Para las muestras de aceite esencial de naranja/bergamota se siguió el método descrito por Koupantsis *et al.* (2016) con ligeras modificaciones. Para las muestras reticuladas con AT y TPF, se pesó 1g de la microcápsula liofilizada o secada por aspersion en un vaso de precipitado, se adicionaron 50 mL de buffer pH 7 para las muestras de APS:CMC y APS:AS y buffer pH 2 para muestras de APS:Q. las muestras fueron agitadas hasta disgregar la pared de la cápsula, para permitir la liberación de aceite esencial, posteriormente se adicionaron 50 mL de hexano se agitó por 3 h para extraer el aceite en la fase orgánica, que se recuperó en un embudo de separación y el contenido de aceite esencial (naranja o bergamota) fue determinado con base en la curva de calibración (apéndice 1 y 2) para cuantificar el aceite total por g de sólido seco. Para las muestras reticuladas con TG, ATO y GLU, se trituró 1 g de polvo en un mortero de agata para fracturar la pared de la cápsula y liberar el aceite encapsulado (Ocak 2012), posteriormente se adicionaron 50 mL de hexano y se dejó agitar por 3 h para extraer el aceite en el disolvente, la muestra se filtró y se recuperó la fase orgánica para cuantificar el contenido de aceite total con la curva de calibración. Para las microcápsulas de ácidos grasos omega 3 se siguió el método descrito por Wang *et al.* (2014), después de hacer la extracción por 3 h el hexano se evaporó a 70°C hasta sequedad. Se cuantificó el aceite extraído por diferencia de peso respecto al peso del vaso de precipitado vacío y se expresó por g de sólido seco. El mismo procedimiento fue usado para las muestras sin reticulante.



### **6.3.10.2 Contenido de aceite encapsulado**

El contenido de aceite superficial y encapsulado solo se determinó en las muestras secadas por aspersión, ya que las muestras liofilizadas formaron un bloque sólido, por lo que, no fue posible tomar una muestra pues requería romper el bloque, lo que liberaría el aceite encapsulado. Para las muestras de aceite esencial se tomó 1 g de la microcápsula con o sin reticulante se colocó en un tubo falcon® y se adicionaron 5 mL de hexano. La mezcla resultante fue agitada en vortex por 1 min (eliminar aceite superficial), se filtró y se dejó secar por 24 h para evaporar todo el hexano. El aceite encapsulado fue cuantificado con la metodología descrita anteriormente 6.3.10.1; expresados como g de aceite encapsulado por g de sólido seco. Para las muestras de ácidos grasos omega 3, el filtrado se colocó en un vaso de precipitado previamente pesado, lavando la muestra retenida en el papel filtró dos veces más con 5 mL de hexano y se colectó en el vaso de precipitado. El hexano se evaporó a 70°C hasta sequedad. El aceite extraído se cuantificó por diferencia de peso respecto al peso del vaso de precipitado vacío y se expresó por g de sólido seco (Klinkesorn *et al.*, 2006).

### **6.3.10.3 Eficiencia de retención y encapsulación de aceite esencial y de ácidos grasos omega 3**

Para las microcápsulas secadas por aspersión, la eficiencia de retención se calculó como el porcentaje del contenido de aceite total con respecto al aceite originalmente adicionado al proceso de coacervación. La eficiencia de encapsulación se calculó como el porcentaje de aceite encapsulado (la diferencia entre el contenido de aceite total y el aceite superficial) con respecto al aceite originalmente adicionado al proceso de coacervación. Para las muestras liofilizadas, la eficiencia de encapsulación se calculó como el porcentaje del contenido de aceite total con respecto al aceite originalmente adicionado al proceso de coacervación. La eficiencia de retención (ER) y la eficiencia de encapsulación (EE) fueron calculadas siguiendo las ecuaciones 5 y 6, respectivamente:

$$ER = \frac{W_1}{W_2} \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

$$EE = \frac{W_1 - W_{so}}{W_2} \times 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde:  $W_1$  es el contenido de aceite total por g de sólido seco;  $W_{so}$  es el contenido de aceite superficial por g de sólido seco;  $W_2$  es el aceite originalmente adicionado al proceso de coacervación compleja por g de sólido seco.

#### **6.3.10.4 Tamaño y distribución de tamaño de partícula**

La distribución del tamaño de partícula del producto encapsulado secado por aspersión, se determinó utilizando un analizador Malvern IM 026 serie 2600 con un lente de 63 mm. Para las muestras liofilizadas, el bloque sólido obtenido fue pulverizado en un mortero de agata y tamizado (tamiz 200), para obtener un polvo fluido con un tamaño de partícula cercano al de secado por aspersión. Para estas muestras un lente de 100 y 300 mm fue usado. Se utilizó hexano como dispersante, el cual se colocó en la bomba de alimentación, se adicionó el polvo en la cantidad indicada por el equipo como óptima y se circuló la muestra a través de la celda para ser medido por el rayo láser. Se determinó la distribución de tamaño de partícula y el diámetro Sauter que es el diámetro de la esfera que tiene la misma área superficial que la partícula verdadera (diámetro  $[D_{3,2}]$ ).

#### **6.3.10.5 Contenido de humedad**

Inicialmente se utilizó el método de destilación por tolueno (Bidwell-Sterling, AOAC, 2000), usado para muestras con un alto contenido de compuestos volátiles que no pueden tratarse en estufa. Sin embargo, para seguir éste método se requiere una mayor cantidad de muestra (10 g) por lo que se realizaron pruebas en una termobalanza Ohaus M35, hasta encontrar las mejores condiciones para determinar una humedad similar a la obtenida por el método de destilación de las microcápsulas

secas sin tener pérdida del material lipofílico. El contenido de humedad de las microcápsulas secas se determinó a 50°C/0.01g/90s en el programa autody.

### 6.3.10.6 Morfología por microscopía electrónica de barrido

La morfología de las partículas secadas por aspersión se analizó en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-58001V. Una pequeña muestra del producto encapsulado seco se fijó con cinta de cobre para ser bañada con oro y se colocó en el microscopio electrónico de barrido al vacío a 5 kV de aceleración. Las imágenes fueron tomadas con el software Honestech TVR 2.5.

Las microcápsulas liofilizadas, formaron un bloque sólido que tuvo que molerse y tamizarse (tamiz 200) para poder determinar la morfología por microscopía electrónica.

### 6.3.11 Fluido gastrointestinal simulado

Para evaluar el proceso de liberación del agente lipofílico se prepararon tanto el fluido gástrico como intestinal con base a lo descrito en el cuadro 6:

Cuadro 6. Composición del fluido gastrointestinal simulado (Flores *et al.*, 2014)

Fluido gástrico simulado (FGS)	Fluido intestinal simulado (FIS)
500 mL agua destilada	500 mL agua destilada
2.752 g NaCl	7.012 g NaCl
0.824 g KCl	0.564 g KCl
0.266 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.388 g NaHCO <sub>3</sub>
0.399 g CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	80 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.306 g NH <sub>4</sub> Cl	50 mg MgCl <sub>2</sub>
0.085 g urea	0.1 g urea
6.5 mL HCl concentrado	0.18 mL HCl concentrado
0.063 g Pepsina	5 g Pancreatina
pH 1.3 ± 0.02	pH 6.8 ± 0.2

Hay una diversidad importante en el uso de los parámetros de la digestión *in vitro* entre los modelos individuales descritos en la literatura, lo que dificulta la posibilidad para comparar los resultados entre diferentes investigaciones (Minekus *et al.*, 2014). Al alterar estos parámetros se puede tener un alto impacto sobre la matriz de liberación, así como en la digestión de algunos compuestos, por lo que, en el presente trabajo se seleccionó la cantidad de enzimas digestivas con base en las siguientes investigaciones:

La adición de pepsina se realizó con base a lo descrito por Luo *et al.* (2015), quien utilizó 1 g/L de pepsina con una actividad de  $\geq 400$  U/mg proteína, para la digestión de geles hechos con 15% (w/w) de aislado de proteína de suero de leche.

La adición de pancreatina se realizó con base a lo descrito por Zhang *et al.* (2011), en la digestión de coacervados de gelatina:goma arábica, al utilizar 10 g de pancreatina en 1 L de fluido intestinal.

#### **6.3.11.1 Liberación del agente lipofílico en el fluido gastrointestinal simulado**

Se siguió el método descrito por Karaca *et al.* (2013) con ligeras modificaciones. 4 g de las microcápsulas secas (aceite esencial de bergamota o ácidos grasos omega 3) fueron mezcladas con 50 mL de FGS e incubadas por 2 h a 37°C en un agitador orbital a 150 rpm. Al concluir el tiempo de digestión gástrica, se desactivó la enzima al elevar el pH a 6.8. Para la exposición intestinal, se adicionaron 50 mL de FIS e incubó por 3 h a 37°C en un agitador orbital a 150 rpm.

Tanto de la solución obtenida de la digestión con el FGS como del FIS, se tomó una alícuota de 10 mL cada hora y se llevó al aforo con hexano (25 mL), la cuantificación del aceite liberado se determinó con el método descrito en el apartado 6.3.10.1 para el aceite esencial y ácidos grasos omega 3. Las muestras secadas por aspersion fueron previamente lavadas con hexano, para retirar el aceite superficial antes del proceso de digestión.

### **6.3.12 Estabilidad durante el almacenamiento**

El producto encapsulado seco obtenido en las mejores condiciones de coacervación compleja-secado por aspersión y coacervación compleja-liofilización, se colocó en frascos de plástico con tapa de rosca. El almacenamiento se llevó a cabo a 30°C en obscuridad por un periodo de 4 meses. Cada 15 días se analizó la humedad, el contenido de aceite total y el contenido de aceite encapsulado para monitorear la variación en la eficiencia de retención y encapsulación.

El deterioro del aceite esencial de bergamota se evaluó por cromatografía de gases, determinando la disminución de sus principales componentes y la aparición de los productos de oxidación de los mismos. Para ácidos grasos omega 3 se evaluó el índice de peróxido y yodo. La degradación fue analizada a los 2 y 4 meses de almacenamiento. Los métodos analíticos utilizados para la evaluación de la estabilidad de los productos encapsulados durante el almacenamiento se describen a continuación.

#### **6.3.12.1 Contenido de aceite volátil encapsulado**

Para la recolección del aceite encapsulado tanto en muestras secadas por aspersión como liofilizadas, se utilizó la destilación de Clevenger (AOAC, 2000). En un matraz de 250 mL, se colocaron 5 g del producto encapsulado seco y se adicionaron 150 mL de agua destilada, cuerpos de ebullición y gotas de aceite de silicón, se inició la destilación en el equipo correspondiente (se usaron trampas de Clevenger) que se operó durante 3 h. El aceite se colectó en la trampa por arrastre de vapor. Las muestras secadas por aspersión fueron previamente lavadas con hexano, para retirar el aceite superficial.

#### **6.3.12.2 Caracterización cromatográfica**

El aceite esencial a analizar se inyectó al equipo de cromatografía en fase gaseosa bajo las condiciones indicadas en el cuadro 7.

Cuadro 7. Cromatografía de gases para caracterizar el aceite esencial de bergamota (Velázquez *et al.*, 2014)

Característica	Medición
- Columna	AT – 1 Heliflex 30 m * 0.32 mm diámetro interior 0.1 micras de espesor de película
- Detector	FID: Ionización de Flama
- Temperatura de inyector	200°C
- Temperatura del detector	250°C
- Programa de trabajo	Temperatura Inicial 60°C Tiempo de sostenimiento: 3 min Incremento: 2°C/min hasta 120°C Incremento: 10°C/min hasta 170°C Sosteniendo 5 min
- Gas/Flujo de columna	Nitrógeno 1 mL/min
- Volumen de muestra	0.4 µL
- Split	100 mL/min

Se usaron como estándares externos para la identificación de los principales terpenos presentes en el aceite esencial:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, d-limoneno, linalool, mirceno, acetato de linalilo,  $\gamma$ -terpineno. Carvona y  $\alpha$ -terpineol como indicadores de oxidación del d-limoneno y acetato de linalilo respectivamente.

### 6.3.12.3 Índice de peróxido (Karaca *et al.*, 2013)

Una muestra de 0.2 g del aceite rico en ácidos grasos omega 3 extraído como se indicó en el apartado 6.3.10.2, fue colocado en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, seguido por la adición de 30 mL de una solución ácido acético:cloroformo 3:2 (v/v) y 0.5 mL de yoduro de potasio. Se agitó vigorosamente por 1 min y se adicionaron 30 mL de agua destilada a la mezcla. Una alícuota de 0.5 mL de solución indicadora de almidón al 1% (w/v) fue adicionada a la mezcla, y la solución resultante fue titulada usando tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0.01 N hasta la desaparición del color púrpura. Se preparó un blanco en las mismas condiciones. El índice de peróxido (IP) fue calculado siguiendo la ecuación 7:

$$IP = \frac{(V_m - V_b) \times N}{W_m} \times 1000 \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:  $V_m$  es el volumen de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  adicionado a la muestra,  $V_b$  es el volumen  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  del blanco,  $N$  es la normalidad de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , y  $W_m$  es el peso de la muestra (g).

#### 6.3.12.4 Índice de yodo (NMX-F-152-S-1981)

Una muestra de 0.2 g de aceite rico en ácidos grasos omega 3 extraído, fue colocado en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, seguido por la adición de 20 mL de ciclohexano, 25 mL de la solución de Wijs, el matraz se guardó en obscuridad por 30 min a temperatura ambiente, al cabo de los mismos se adicionó 20 mL de la solución de yoduro de potasio al 15% (w/v), se mezcló y adicionó 100 mL de agua destilada. La solución resultante fue titulada con tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0.1 N, se adicionó gradualmente y con agitación vigorosa. La titulación continuó hasta que el color amarillo casi desapareció, posteriormente 2 mL de solución indicadora de almidón al 1% (w/v) fue adicionada a la mezcla, y prosiguió la titulación hasta la desaparición del color azul. Se preparó un blanco en las mismas condiciones. El índice de yodo (IY) fue calculado siguiendo la ecuación 8:

$$IY = \frac{(V_b - V_m) \times N \times 12.69}{W_m} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde:  $V_m$  es el volumen de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastados en la muestra,  $V_b$  es el volumen  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  del blanco,  $N$  es la normalidad de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 12.69 es el equivalente del yodo y  $W_m$  es el peso de la muestra (g).

#### 6.3.13 Análisis estadístico

Todas las mediciones fueron realizadas por duplicado de un duplicado de secados independientes y los resultados son reportados como el valor medio  $\pm$  la desviación estándar. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA,) y la comparación de medias con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para evaluar la diferencia entre muestras a un nivel de significancia de 95%. El programa MINITAB 17 fue utilizado (Minitab Inc. 1829 Pine Hall Rd., State College PA 16801-3210, USA).

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización de la coacervación compleja

#### 7.1.1 Evaluación del potencial Z

La coacervación compleja entre proteínas y polisacáridos es principalmente conducida por interacción electrostática (Lv *et al.*, 2012). El depósito de los complejos alrededor de núcleos hidrofóbicos crea una barrera permitiendo su encapsulación (Alvim & Grosso, 2009). La selección de las condiciones óptimas para la microencapsulación por coacervación compleja es determinada por la disponibilidad de cargas de los polímeros la cual está en función del pH del medio, y de la relación proteína:polisacárido (Pr:Ps).

A través de la determinación de potencial zeta se cuantificó el perfil de cargas de los polímeros solos (aislado de proteína de suero de leche (APS), Carboximetilcelulosa (CMC), Alginato de sodio (AS), Goma arábiga (GA) y Quitosano (Q), así como de diferentes mezclas Pr:Ps como una función del pH. El punto de máxima equivalencia eléctrica, es el pH al cual ocurre la coacervación compleja y está dado por un potencial zeta igual a cero (neutralidad en las cargas; por lo que los polímeros precipitan) (Rojas *et al.*, 2018; Prata & Grosso, 2015 b).

En las figuras 6 a 9 se puede observar que el potencial zeta del APS depende del pH debido a su naturaleza anfotérica, ya que contiene tanto grupos funcionales amino (NH<sub>2</sub>) (carga positiva) como carboxilo (-COOH) (carga negativa), su punto isoeléctrico (PI) se presenta a un pH de 4.3. De acuerdo a lo reportado por Koupantsis *et al.* (2014) éste varía de 4.1-5.2. Por otra parte, los polisacáridos aniónicos de la CMC (figura 6), el AS (figura 7) y de la GA (figura 8), presentan carga negativa en la mayor parte del intervalo de pH estudiado, estos tienen la capacidad de ionizar sus grupos carboxilos, la cual se pierde a valores cercanos a pH 2 (Weinbreck *et al.*, 2004; Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009).



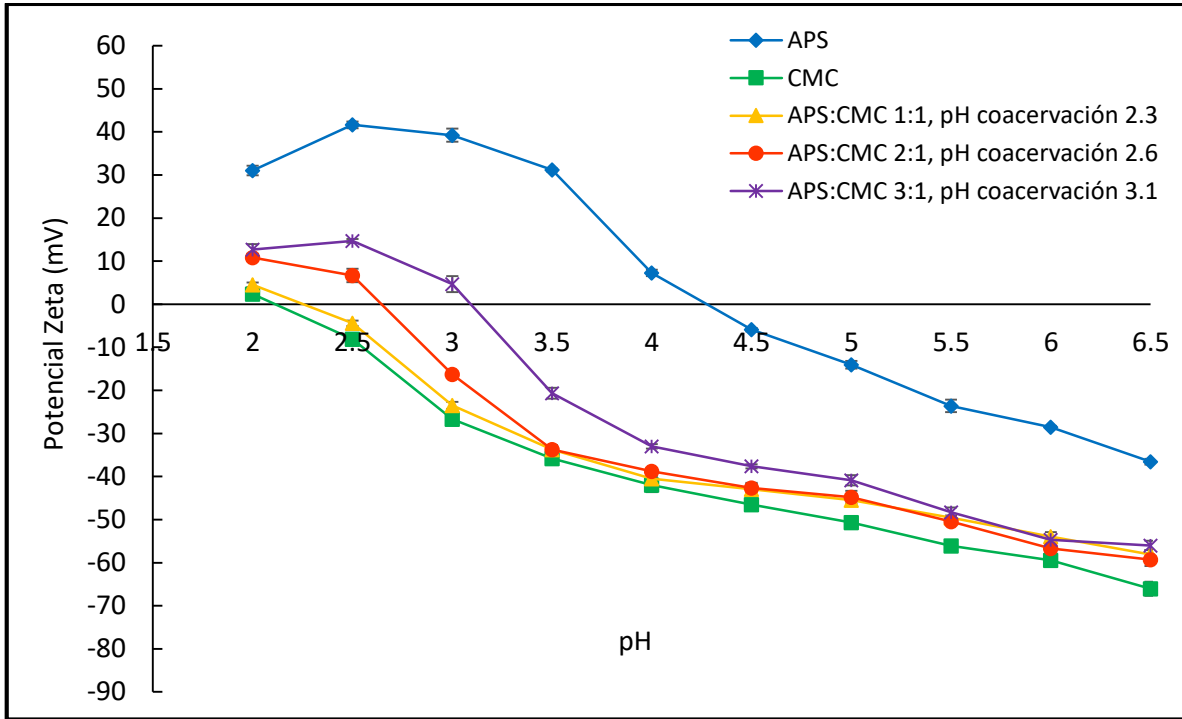


Figura 6. Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa de sodio (APS:CMC)

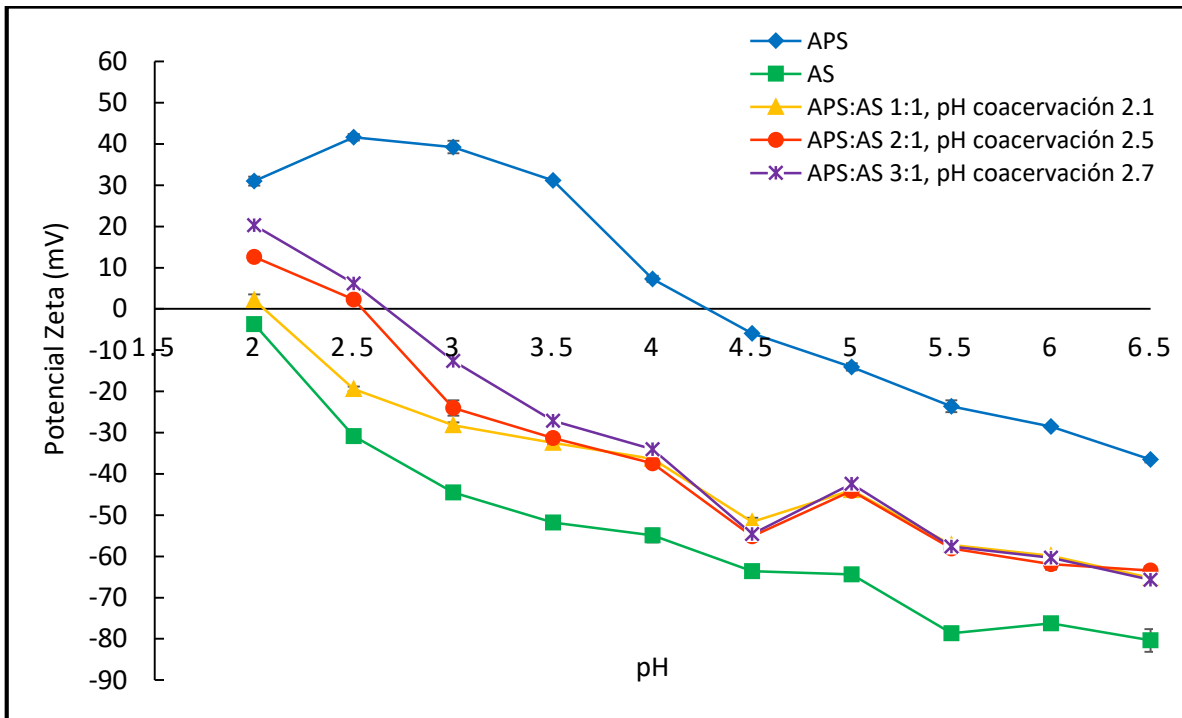


Figura 7. Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche:alginate de sodio (APS:AS)

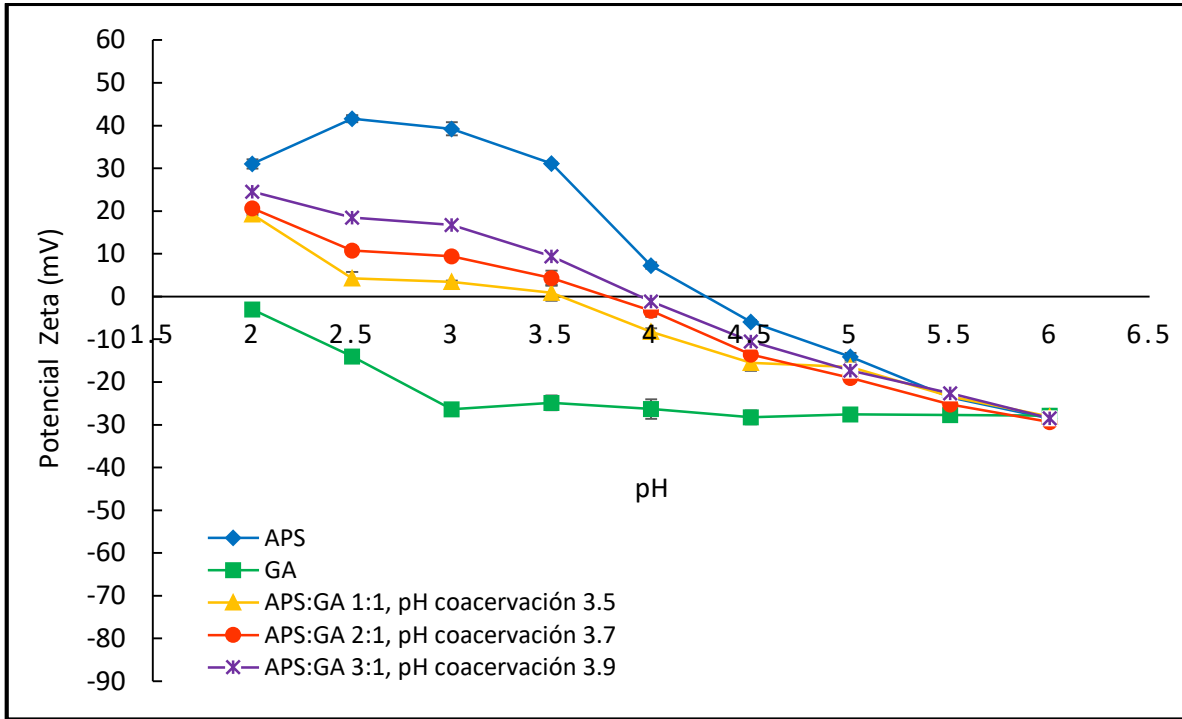


Figura 8. Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche:goma arábica (APS:GA)

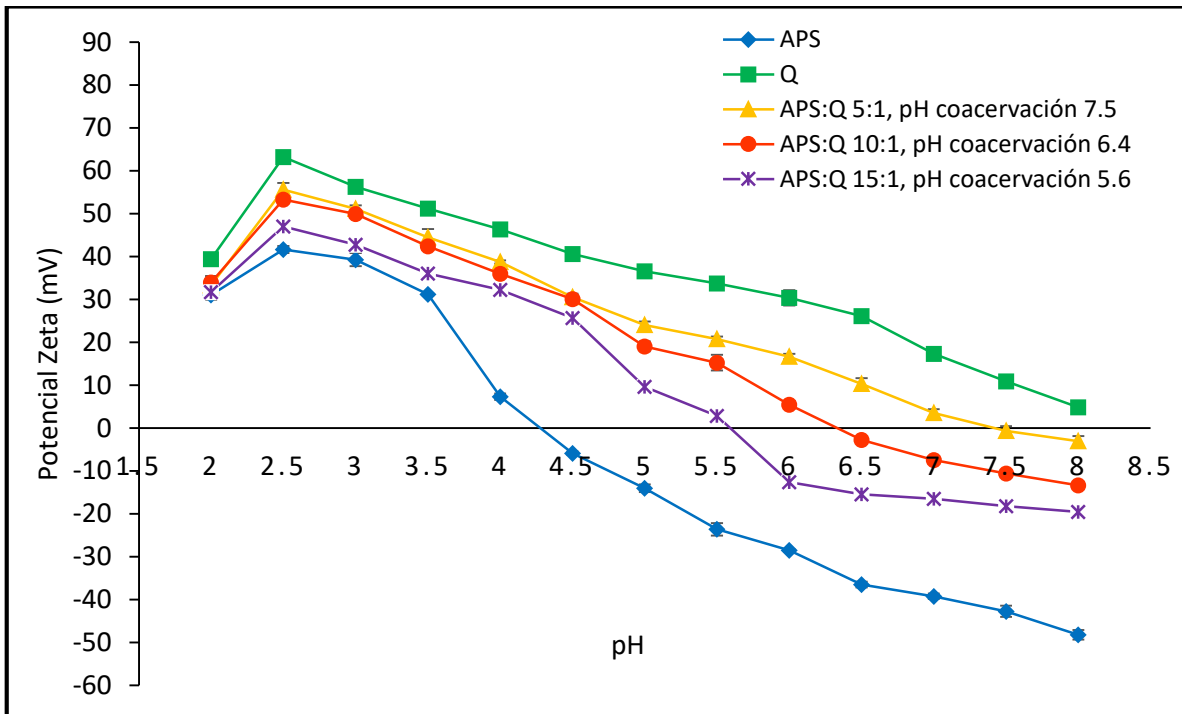


Figura 9. Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q)

Respecto al Q (figura 9), éste presenta un potencial positivo en el intervalo de pH estudiado, debido a su solubilización en medio ácido por la protonación de grupos amino (Prata & Grosso, 2015 a).

Como puede observarse en las figuras 6-9, el pH donde se presenta la máxima equivalencia eléctrica (pH de coacervación) cuyo potencial  $Z = 0$ , se encontró dependiente de la relación Pr:Ps; además, al incrementar la proporción de proteína en las mezclas, el pH de coacervación se acerca al PI del APS.

De acuerdo a estos resultados se puede determinar la región de pH en donde se da la formación de los complejos electrostáticos entre el APS y los polisacáridos seleccionados, la cual se encuentra entre 2 – 4 para los sistemas APS:CMC, APS:AS y APS:GA y de 5.5 – 6.5 para APS:Q, en estos intervalos los polímeros tienen las máximas cargas eléctricas opuestas. Para la relación 5:1 APS:Q se obtuvo un potencial  $Z = 0$  a pH 7.5, pero no se puede considerar cómo pH de coacervación, ya que a pH arriba de 6.5 el 50% de los grupos amino del quitosano están desprotonados y se vuelve insoluble (Prata & Grosso, 2015 a) por lo que se obtiene un precipitado que no corresponde a la interacción Pr:Ps sino a la falta de solubilidad del Q.

### 7.1.2 Rendimiento de coacervación

El rendimiento de coacervación (RC) para cualquier sistema, depende de la concentración de los materiales de pared, así como de la relación Pr:Ps al pH de coacervación (Jun-xia *et al.*, 2011). Se recomiendan concentraciones menores al 3 o 4% (w/w) de sólidos (Turgeon & Laneuville, 2009), ya que a mayor concentración (>8% (w/w)) se provoca la autosupresión de la coacervación compleja (Weinbreck *et al.*, 2004).

La proporción Pr:Ps es crítica en el balance de cargas eléctricas y determina la intensidad en la interacción electrostática (Wang *et al.*, 2014) para formar el

coacervado. Con la finalidad de equilibrar las cargas negativas y positivas, los polisacáridos se manejaron en menor proporción para compensar las cargas eléctricas de la proteína, ya que los polisacáridos utilizados tienen mayor peso molecular y densidad de carga eléctrica que el APS (Bouyer *et al.*, 2011, Prata & Grosso, 2015 b).

Como se observó en los resultados de potencial zeta, cada relación Pr:Ps tiene su propio pH de coacervación, por lo que es importante evaluar el porcentaje de coacervados que se forman en cada relación, y así determinar las mejores condiciones de producción. La cantidad de coacervado formado está altamente relacionado con la cantidad de material que puede ser encapsulado, sí se tienen bajos RC traerá como consecuencia baja eficiencia de encapsulación (Rojas *et al.*, 2018).

Como se observa en las figuras 10 – 13, el RC varía dependiendo del pH y de la relación Pr:Ps. Para las relaciones 1:1 (APS:CMC, APS:AS y APS:GA) y 5:1 (APS:Q) hay un considerable descenso en el RC, debido a la mayor densidad de carga eléctrica de los polisacáridos, la cual no es neutralizada adecuadamente por la cantidad de proteína utilizada a cualquier valor de pH. Por otra parte, al incrementar la relación Pr:Ps a 2:1 y 3:1 en los sistemas APS:CMC, APS:AS y APS:GA, y a 10:1 y 15:1 con el sistema APS:Q, mayor RC fue obtenido, lo cual implica que existe un mejor balance en las cargas eléctricas entre los polímeros y bajo las condiciones de pH adecuada la intensidad de la interacción electrostática es más fuerte, esto indica que la mayor cantidad de material de pared se atraen para formar coacervados.

Para una concentración de sólidos totales de 1% (w/w), como se muestra en la figura 10 (a), el máximo RC para el sistema de APS:CMC fue con la relación 2:1 y 3:1 a pH 3, sin embargo, aun cuando no existe diferencia significativa entre ellas ( $p < 0.05$ ), sólo la relación 3:1 Pr:Ps con un RC de 86%, fue seleccionada para llevar a cabo la encapsulación de aceite esencial, siendo ligeramente mayor a lo obtenido con la relación 2:1. Este resultado es comparable a lo reportado en el sistema de

Gelatina:CMC con un RC>80% (Thimma & Tammishetti, 2003), lo cual implica que estos polímeros tienen una fuerte atracción electrostática, siendo más altas comparadas con los otros sistemas utilizados en este trabajo.

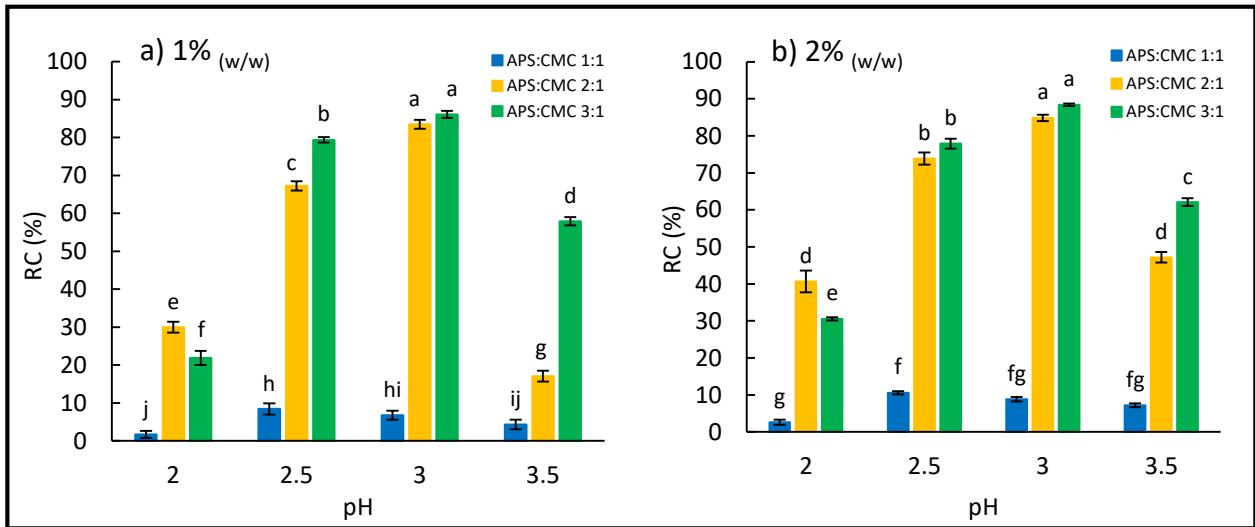


Figura 10. Rendimiento de coacervación (RC) en función del pH, relación Pr:Ps y concentración de sólidos al 1(a) y 2% (w/w) (b). Sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa de sodio (APS:CMC). Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes para cada concentración de sólidos (Tukey,  $p<0.05$ ).

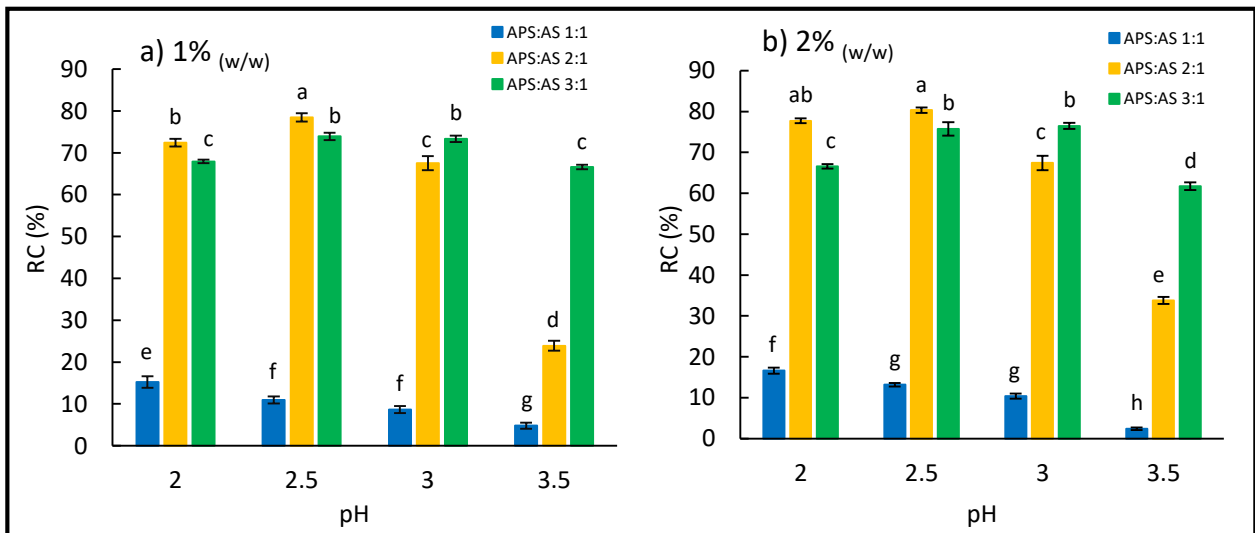


Figura 11. Rendimiento de coacervación (RC) en función del pH, relación Pr:Ps y concentración de sólidos al 1 (a) y 2%(w/w) (b). Sistema aislado de proteína de suero de leche:alginate de sodio (APS:AS). Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes para cada concentración de sólidos (Tukey,  $p<0.05$ ).

Para el sistema APS:AS (figura 11 a), el máximo RC (79%) fue obtenido a la relación 2:1 Pr:Ps a pH 2.5, para este sistema se han reportado RC mayores al 78% al utilizar las relaciones 2:1 y 3:1 Pr:Ps en el intervalo de pH 2.5-3 (Cárdenas-Bailón *et al.*, 2014).

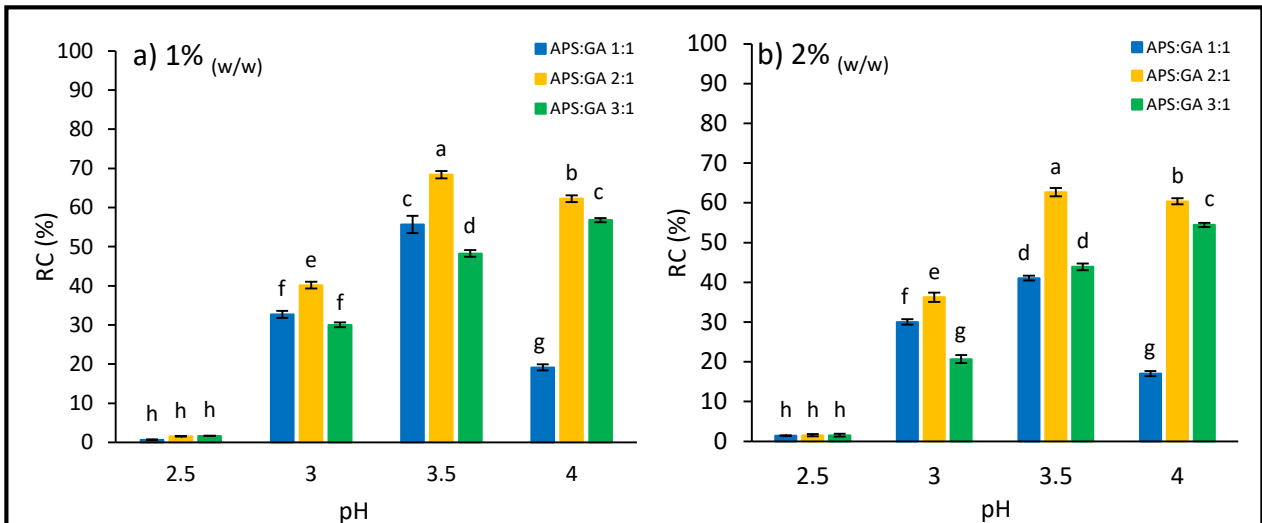


Figura 12. Rendimiento de coacervación (RC) en función del pH, relación Pr:Ps y concentración de sólidos de 1 (a) y 2% (w/w) (b). Sistema aislado de proteína de suero de leche:goma arábica (APS:GA). Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes para cada concentración de sólidos (Tukey,  $p < 0.05$ ).

Para el sistema APS:GA (figura 12 a) se obtuvo un RC del 68 % en relación 2:1 Pr:Ps a pH 3.5. En este sistema las relaciones Pr:Ps utilizadas no permiten un mejor acomplejamiento electrostático, ya que más del 30% de los polímeros quedan en suspensión (al separar la fase coacervada del sobrenadante, este último presentó turbidez), y aunque es el sistema que puede manipularse con mayor facilidad, porque no presenta altas viscosidades incluso a mayores concentraciones comparado con los otros sistemas, tiene la desventaja de crear efectos de enmascaramiento electrostático cuando aumenta la fuerza iónica (provocado por el incremento en la concentración de sales de la goma arábica), de acuerdo con Bouyer *et al.* (2011), la fuerza iónica influye en la formación del coacervado, a altas fuerzas iónicas las cargas se ocultan y la interacción electrostática es débil entre los dos polímeros; por lo que al incrementar a 2%<sub>(w/w)</sub> la concentración de sólidos, el RC disminuyó, hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones.

Finalmente, el sistema APS:Q (figura 13), obtuvo como máximo RC 71% en la relación 10:1 Pr:Ps a pH 6 y 6.5. Para este polisacárido se requiere una alta proporción de proteína para poder neutralizar el exceso de cargas positivas del quitosano. Aunque no hay diferencia significativa entre pH 6 y 6.5, el pH 6 fue seleccionado para la encapsulación, porque el Q está completamente protonado y soluble. Para este sistema se ha reportado un RC del 57% para el sistema Gelatina:Q a pH 6 y relación 10:1 Pr:Ps (Prata & Grosso, 2015 a), siendo menor a lo obtenido en este trabajo.

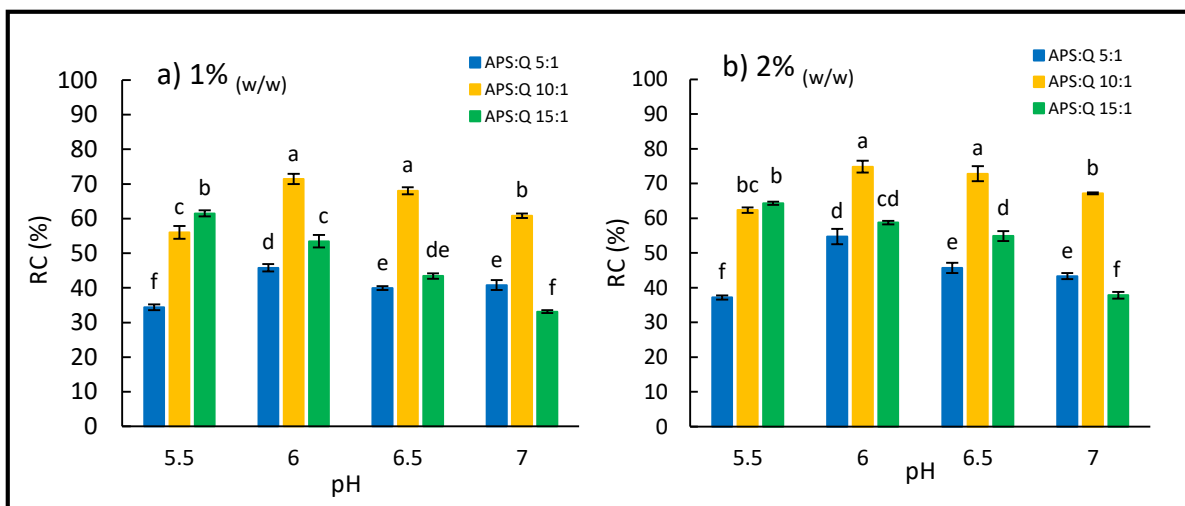


Figura 13. Rendimiento de coacervación (RC) en función del pH, relación Pr:Ps y concentración de sólidos al 1 (a) y 2% (w/w) (b). Sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes para cada concentración de sólidos (Tukey,  $p < 0.05$ ).

El RC también se determinó a la concentración del 2% (w/w) de sólidos, para hacer más eficiente la etapa de secado por aspersion y no utilizar soluciones tan diluidas (1% (w/w)). Como se puede observar en las figuras 10b, 11b y 13b, se encontró que los valores de RC no fueron significativamente diferentes a los de 1% (w/w) ( $p < 0.05$ ) para los sistemas APS:CMC, APS:AS y APS:Q, por lo que a mayor concentración las microcápsulas podrían ser más estables (Yang *et al.*, 2015), sin embargo, la formación de coacervados al 2% (w/w) de sólidos mostró aglomeración y la solución no pudo dispersarse homogéneamente, ocasionando problemas de operación en el secador, por lo tanto se descartó la concentración del 2% (w/w) para la elaboración de los coacervados.

## 7.2 Microencapsulación de aceite esencial de naranja por coacervación compleja

Las condiciones más adecuadas para la producción de microcápsulas por coacervación compleja se resumen en el cuadro 8.

Cuadro 8. Condiciones de trabajo para la elaboración de microcápsulas por coacervación compleja

Sistema	pH	Relación Pr:Ps	Concentración de sólidos (% (w/w))	RC (%)
APS:CMC	3	3:1	1	86.10 ±0.93
APS:AS	2.5	2:1		79.26 ±0.99
APS:GA	3.5	2:1		68.39 ±0.10
APS:Q	6	10:1		71.45 ±1.46

Con estas condiciones se realizó la encapsulación del material lipofílico (aceite esencial de naranja) como modelo, en una relación 1:1 y 1:2 núcleo:pared (aceite esencial:(Pr:Ps)).

### 7.2.1 Estabilidad de la emulsión aceite esencial de naranja:APS, tamaño y distribución del glóbulo de aceite en la emulsión con APS

Para llevar a cabo el proceso de coacervación primero se debe emulsificar el aceite esencial en la solución de proteína (APS) y posteriormente adicionar el polisacárido (CMC, AS, GA y Q). Se evaluó el efecto de la velocidad de homogenización a 10000 (figura 14) y 15000 rpm (figura 15) por 1, 5 y 10 min, para realizar la emulsión. Los parámetros de la emulsión determinan tanto el tamaño final del coacervado (Leclercq *et al.*, 2009) como la estabilidad de la emulsión (Dickinson, 2008). Durante la emulsificación de aceite en la solución de proteína, ésta se adsorbe sobre las gotas de aceite (interfase aceite-agua) y se orientan hacia él los aminoácidos hidrofóbicos provocando cambio en su estructura secundaria (Bouyer *et al.*, 2011).



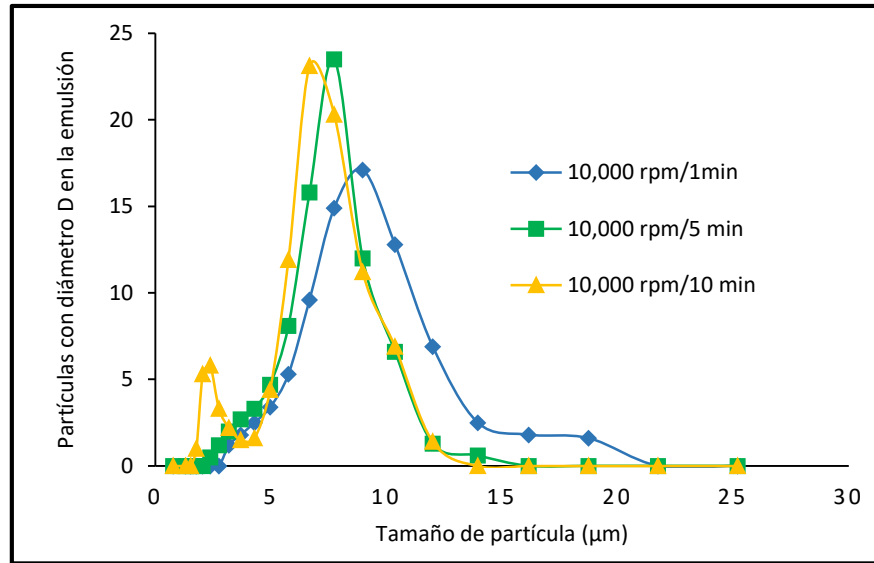


Figura 14. Distribución de tamaño de glóbulo de aceite de la emulsión aceite esencial en la solución de aislado de proteína de suero de leche a 10,000 rpm

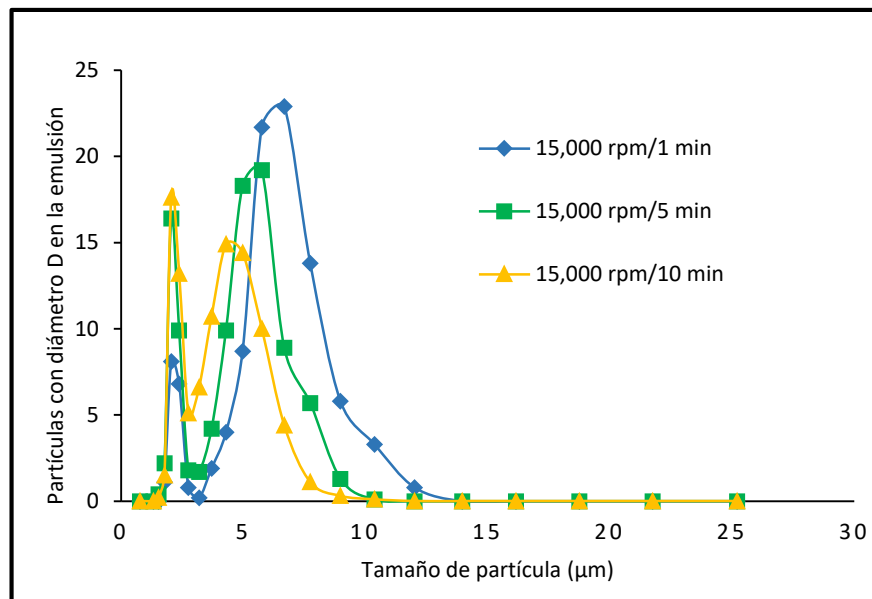


Figura 15. Distribución de tamaño de glóbulo de aceite de la emulsión aceite esencial en la solución de aislado de proteína de suero de leche a 15,000 rpm

Como se puede observar en la figura 14, homogenizar la emulsión a 10,000 rpm por 5 min, genera una distribución de tamaño bastante homogénea y estrecha, cuyo diámetro de esfera equivalente fue de  $6.86 \pm 0.5 \mu\text{m}$  (diámetro de la esfera con el mismo volúmen de la partícula ( $D_{(4,3)}$ )); sin embargo, al incrementar el tiempo de homogeneización a 10 min, comienza a presentarse una dispersión bimodal en la

cual una de las poblaciones tiene un  $D_{(4,3)}$  de  $2.5 \pm 0.45 \mu\text{m}$  y la otra de  $6.55 \pm 0.35 \mu\text{m}$ .

En la figura 15 se muestra que al incrementar la velocidad de homogenización a 15,000 rpm (independientemente del tiempo) se obtuvo una distribución bimodal. Una de las poblaciones tiene un  $D_{(4,3)}$  de  $2.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$  y la otra, depende del tiempo de homogenización, presentando un diámetro de  $7 \mu\text{m}$  con 1 min,  $6 \mu\text{m}$  con 5 min y  $5 \mu\text{m}$  con 10 min de agitación. Esto es debido al hecho, de que el tamaño del glóbulo de aceite está determinado por el equilibrio entre la fuerza turbulenta que tiende a romper la gota y la fuerza de tensión interfacial que tiende a mantener las gotas juntas en el proceso de emulsificación (Butstraen & Salaün, 2014); incrementando el tiempo de homogenización incrementará la fuerza turbulenta, por lo tanto, partículas más pequeñas empezarán a aparecer generando una dispersión bimodal.

Las emulsiones con un diámetro de partícula  $<1 \mu\text{m}$  son más estables que aquellas que presentan un mayor tamaño (Dickinson, 2008). Sin embargo, no se consiguió obtener un tamaño de partícula tan pequeño y se decidió trabajar con 10,000 rpm por 5 min por originar un tamaño de glóbulo de aceite homogéneo con la cual se logró tener mayor estabilidad (hasta por 6 h) para la relación 1:2 núcleo:pared, mientras que para la relación 1:1 núcleo:pared fue de 2 h.

El tamaño de glóbulo de aceite también determina la morfología de los coacervados. Cuando en la emulsión se tiene un  $D_{(4,3)} < 100 \mu\text{m}$ , se forman cápsulas polinucleadas las cuales poseen mejores propiedades para la liberación controlada; emulsiones con un  $D_{(4,3)} > 250 \mu\text{m}$  forman cápsulas mononucleadas y pueden liberar con más facilidad el agente bioactivo (Lemetter *et al.*, 2009; Leclercq *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014).

### **7.2.2 Eficiencia de encapsulación de aceite esencial de naranja de las microcápsulas coacervadas en suspensión**

El principal requerimiento de un buen material de pared es la habilidad de mantener y sellar por completo al material núcleo dentro de su estructura, durante el procesamiento y almacenamiento (Jun-xia *et al.*, 2011) es por esto, que uno de los parámetros que influye en la eficiencia de encapsulación es la relación núcleo:pared, en la mayoría de las investigaciones realizadas para coacervación compleja se han manejado las relaciones 1:1 y 1:2 núcleo:pared (Alvim & Grosso, 2010; Saravanan & Rao, 2010; Dong *et al.*, 2011; Costa de Conto *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Prata & Grosso, 2015 a; Yang *et al.*, 2015), por lo que fueron retomadas para este trabajo.

La eficiencia de encapsulación fue evaluada en las microcápsulas coacervadas en suspensión sin agente reticulante antes del secado como referencia para evaluar el efecto del tipo de secado sobre este parámetro. Se cuantificó el aceite libre en el sobrenadante y por diferencia con respecto al aceite inicialmente adicionado a la emulsión se evaluó la eficiencia de encapsulación en las microcápsulas coacervadas para cada sistema propuesto.

En la figura 16 se presentan las eficiencias de encapsulación obtenidas para cada sistema a la relación 1:1 y 1:2 núcleo:pared. Como se puede observar, la eficiencia de encapsulación se ve afectada por la relación núcleo:pared, en donde a mayores cargas de aceite esencial (relación 1:1) menor eficiencia de encapsulación (<75%) en todos los sistemas.

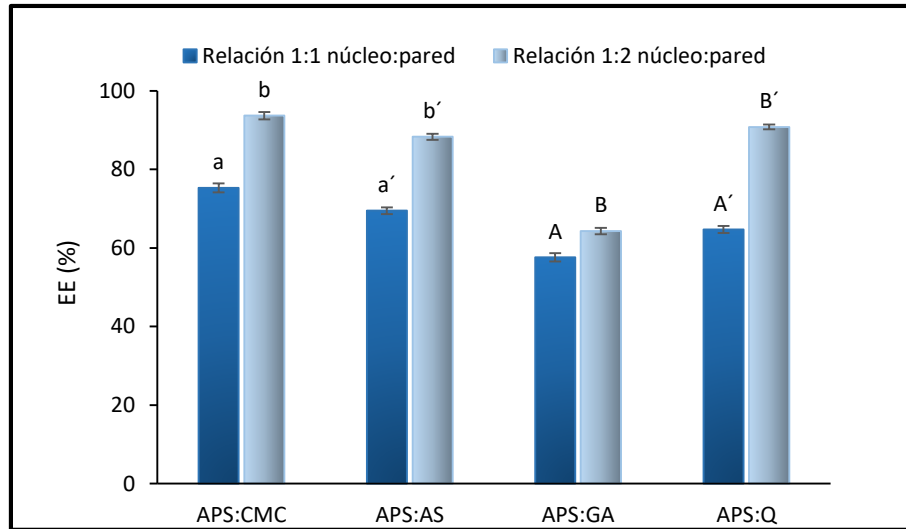


Figura 16. Eficiencia de encapsulación (EE) de las microcápsulas coacervadas en suspensión para el sistema aislado de proteína de suero de leche (APS:carboximetilcelulosa (CMC), APS:alginato de sodio (AS), APS:goma arábica (GA) y APS:quitosano (Q), a dos relaciones núcleo:pared. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ )

Al incrementar la relación núcleo:pared de 1:1 a 1:2 se obtiene mayor material de núcleo embebido, por lo que la eficiencia de encapsulación fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) de 94, 88 y 91% para los sistemas APS:CMC, APS:AS y APS:Q respectivamente, lo cual corrobora la ventaja que ofrece el método de coacervación compleja, su alta eficiencia de encapsulación (Kaushik *et al.*, 2014), razón por la cual, se eligió la relación 1:2 núcleo:pared para la microencapsulación por coacervación compleja con los sistemas anteriormente mencionados. En lo referente al sistema APS:GA, se encontró aceite libre en el sobrenadante por lo que solo se obtuvo un 64% de encapsulación. Esta baja eficiencia de encapsulación está relacionada a la cantidad de polímero que puedo coacervar, es decir, este sistema sólo alcanzó un rendimiento de coacervación del 68% como máximo, por lo que no se puede esperar que alcance mayores eficiencias de encapsulación, ya que más del 30% del polímero no formó interacción electrostática (en el sobrenadante se aprecia turbidez por la presencia de polímero en suspensión), razón por la cual este sistema fue descartado.

### **7.3 Efecto del agente reticulante sobre la eficiencia de encapsulación de microcápsulas secas de aceite esencial de naranja**

Mientras que la mayor parte de la literatura sobre coacervación compleja se ha enfocado generalmente sobre la formación de la cápsula en suspensión, hay pocos detalles sobre el secado de la misma (Weinbreck *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2004; Lee & Hong, 2009; Zimet & Livney, 2009; Saravanan & Rao, 2010; Schmitt & Turgeon, 2010; Huang *et al.*, 2012). Las microcápsulas por coacervación compleja fueron obtenidas en forma húmeda por lo que se emplearon dos métodos de secado, la aspersión y la liofilización, para el secado de las mismas.

Con el secado por aspersión, se obtienen partículas individuales en forma de un polvo fluido, sin embargo, la baja resistencia física de la pared y las condiciones usadas en este proceso pueden fracturar a los coacervados comprometiendo su integridad, lo que puede afectar la eficiencia de encapsulación (Alvim & Grosso, 2009). La liofilización, al no someter a los coacervados a esfuerzos mecánicos como la aspersión, obtiene mejores eficiencias de encapsulación en el producto final. Dado que el proceso se lleva a cabo a baja temperatura, presenta menor riesgo para los productos lábiles, como los agentes lipofílicos (Morais *et al.*, 2016). Debido a la débil resistencia mecánica de la interacción electrostática que forma la pared, es necesario el uso de agentes reticulantes para ofrecerle mayor fortaleza, lo cual puede ayudar a mantener la eficiencia de encapsulación durante el tratamiento de secado. En la figura 17, 18 y 19 se observan las eficiencias de encapsulación obtenidas con cada agente reticulante y ambos métodos de secado. Los agentes reticulantes presentan alguno de los siguientes tipos de interacción:

1. Interacciones débiles: el ácido tánico (AT) forma puentes de hidrógeno y el tripolifosfato de sodio (TPF) interacciones electrostáticas.
2. Enlaces fuertes (covalentes): la enzima transglutaminasa (TG) y el ácido tánico oxidado (ATO). También se probó el glutaraldehído (GLU) como reticulante de comparación.

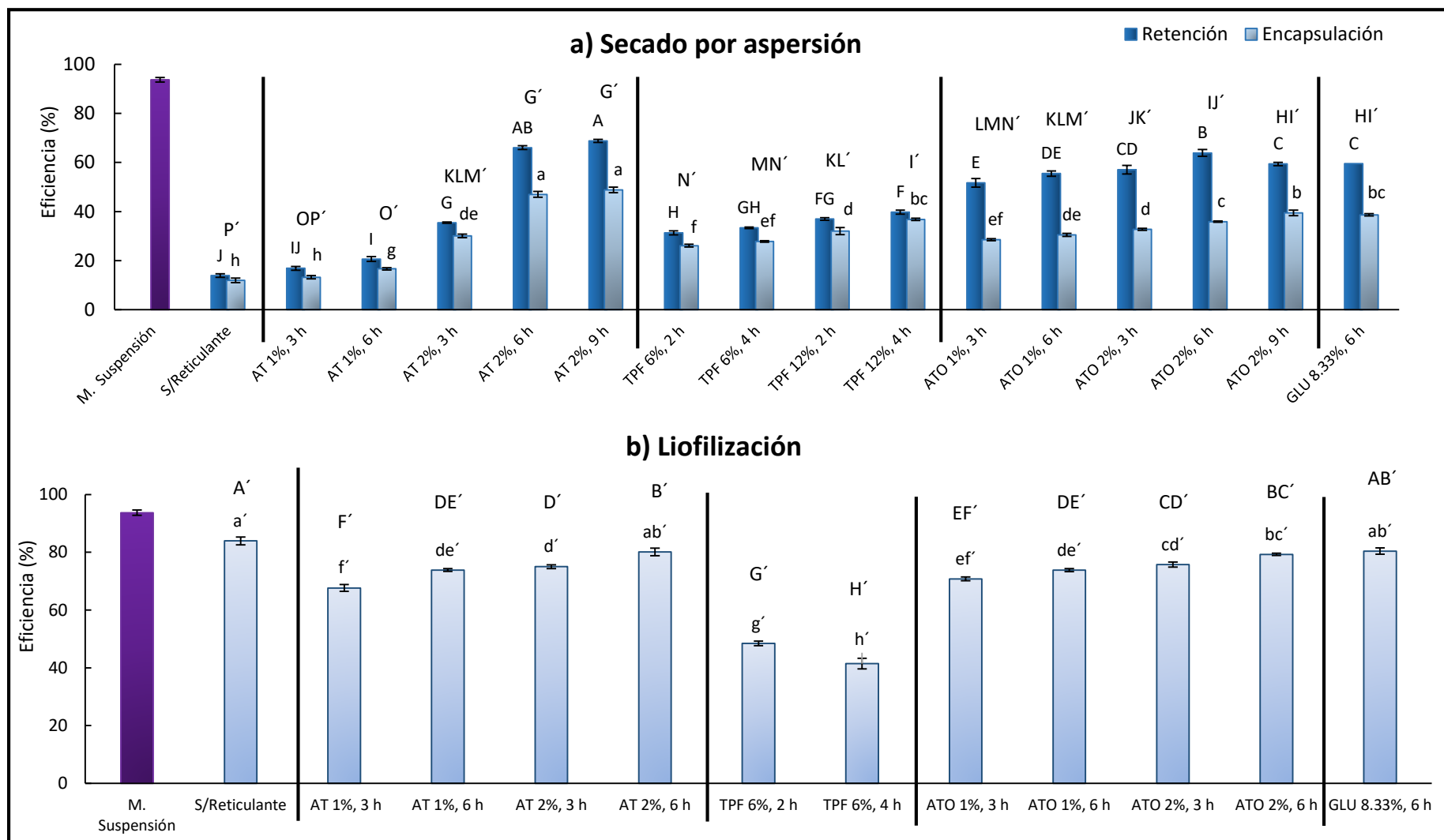


Figura 17. Efecto de las condiciones de reticulación y método de secado (a) Aspersión, b) Liofilización) sobre la eficiencia de retención y encapsulación de las microcápsulas coacervadas del sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC). Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

S/Reticulante: sin reticulante; AT: ácido tánico; TPF: tripolifosfato de sodio; ATO: ácido tánico oxidado; GLU: glutaraldehído.

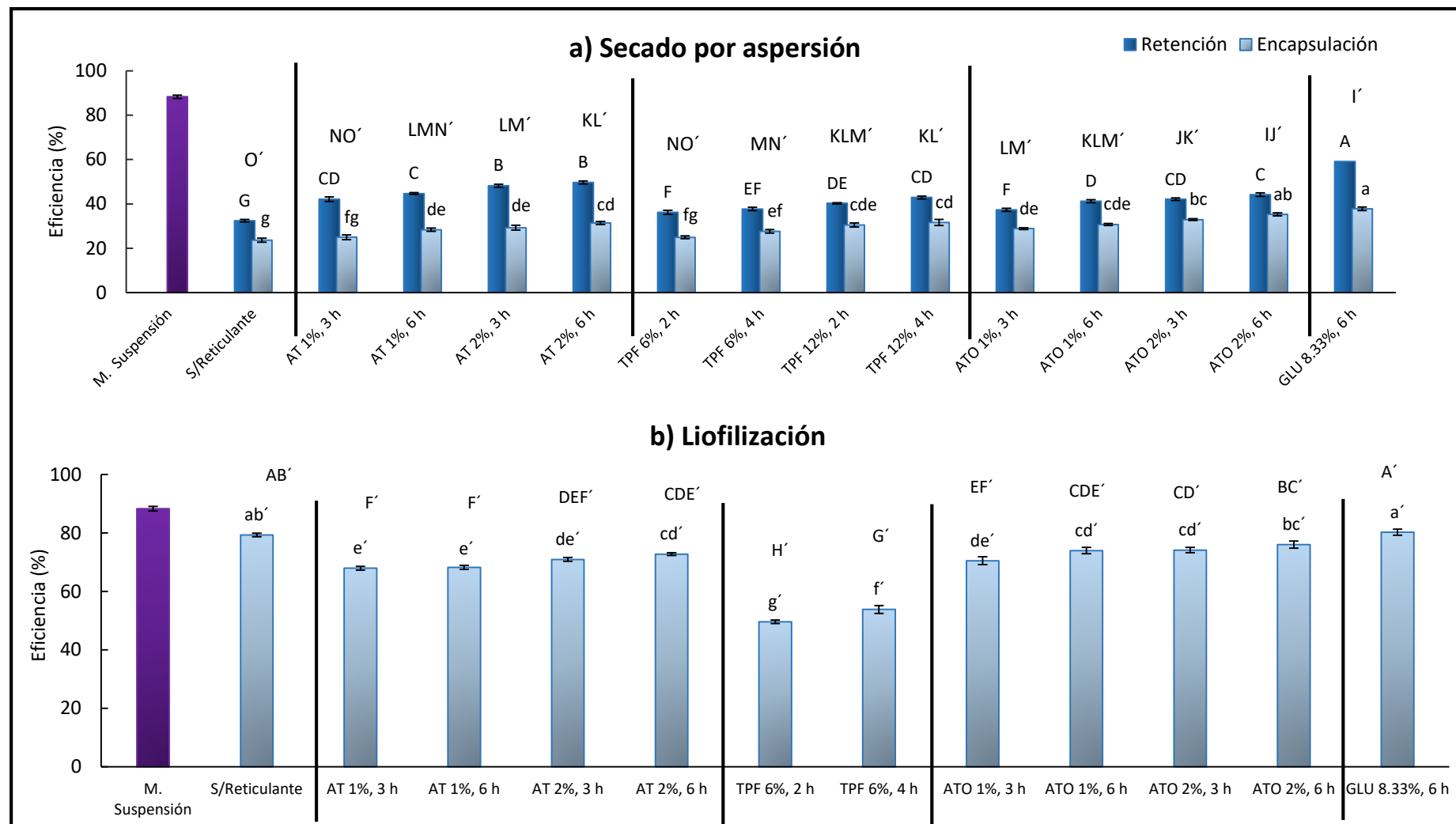


Figura 18. Efecto de las condiciones de reticulación y método de secado (a) Aspersión, b) Liofilización) sobre la eficiencia de retención y encapsulación de las microcápsulas coacervadas del sistema aislado de proteína de suero de leche:alginato de sodio (APS:AS). Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

S/Reticulante: sin reticulante; AT: ácido tánico; TPF: tripolifosfato de sodio; ATO: ácido tánico oxidado; GLU: glutaraldehído.

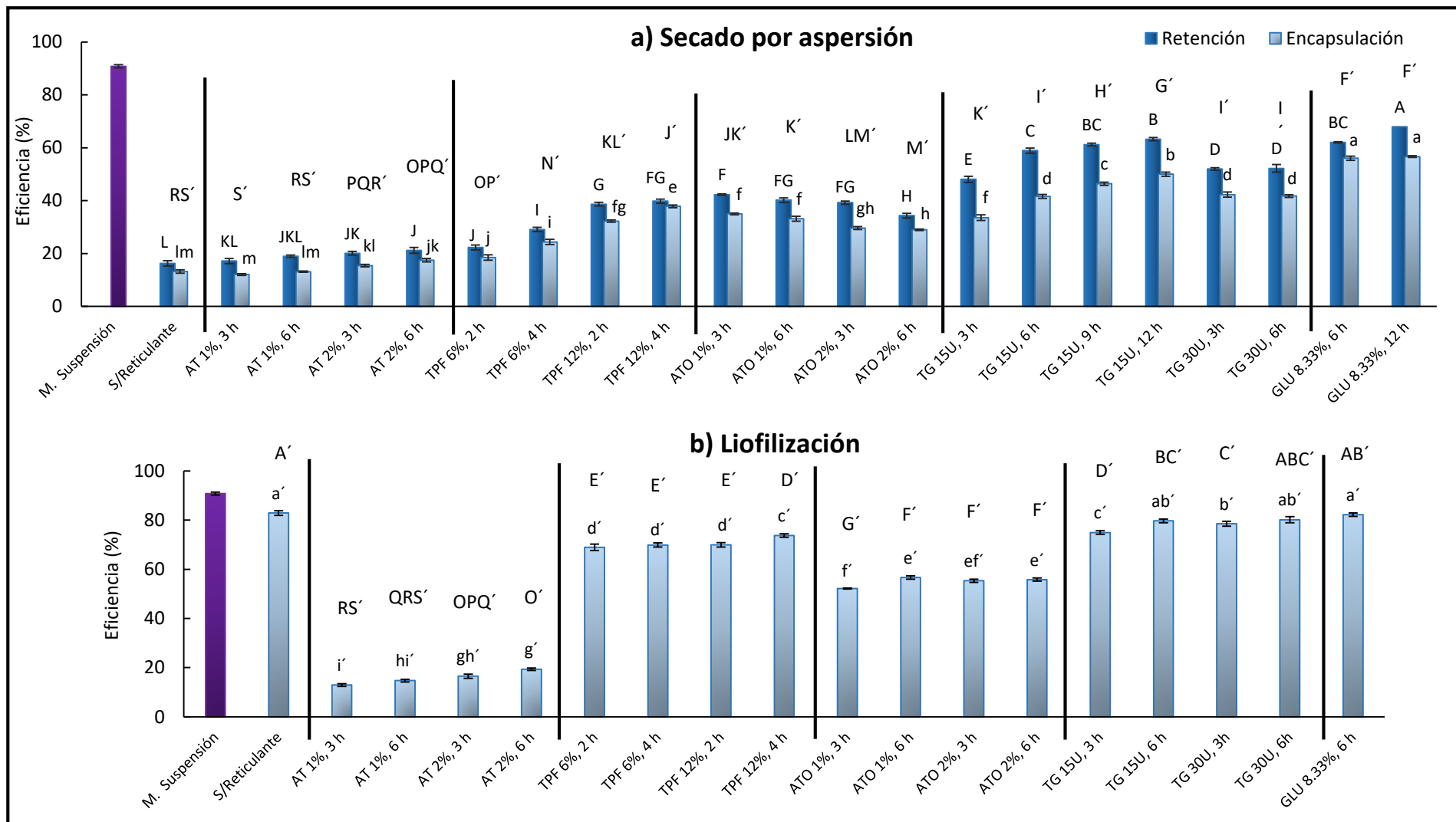


Figura 19. Efecto de las condiciones de reticulación y método de secado (a) Aspersión, b) Liofilización) sobre la eficiencia de retención y encapsulación de las microcápsulas coacervadas del sistema aislado de proteína de leche:quitosano (APS:Q). Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

S/Reticulante: sin reticulante; AT: ácido tánico; TPF: tripolifosfato de sodio; ATO: ácido tánico oxidado; TG: transglutaminasa; GLU: glutaraldehído.



En las muestras que se secaron por aspersión, se evaluó la eficiencia de retención (ER; involucra el aceite encapsulado y el aceite superficial) y la eficiencia de encapsulación (EE) que representa únicamente el aceite protegido dentro del coacervado). Para las muestras liofilizadas solo se evaluó la eficiencia de encapsulación (EE), debido a que se formó un bloque sólido, no fue posible tomar una muestra para evaluar el aceite superficial pues requería romper el bloque, lo que liberaría el aceite encapsulado.

Como se puede observar en la figura 17a, 18a y 19a, la eficiencia de encapsulación se afectó considerablemente después del secado por aspersión en las microcápsulas coacervadas sin agente reticulante, ya que disminuyó a 12, 24 y 13%, lo cual representa una reducción del 82, 65 y 78% de la eficiencia de encapsulación original de las microcápsulas coacervadas antes de secar, para el sistema APS:CMC, APS:AS y APS:Q respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por Leclercq *et al.* (2009) quienes observaron que las cápsulas de gelatina/goma arábiga se rompieron durante el secado por aspersión teniendo una excesiva pérdida del material bioactivo (limoneno). Las microcápsulas coacervadas son destruidas por la fuerza centrífuga y de fricción producida por el disco centrífugo del secador por aspersión (Dong *et al.*, 2011), de aquí la importancia de utilizar agentes reticulantes, que proporcionen mayor resistencia a las microcápsulas.

Por otro lado, estas mismas muestras al ser liofilizadas solo presentan menos del 10% de pérdida de aceite esencial para los sistemas antes mencionados, la pared de la cápsula al no estar sometida al esfuerzo mecánico de la aspersión sufre menor daño lo que genera una eficiencia de encapsulación mayor (80%).

A continuación, se presenta la discusión del efecto que cada agente reticulante tuvo sobre la eficiencia de encapsulación para cada uno de los sistemas utilizados en el presente trabajo:

### 7.3.1 Ácido tánico (AT) como reticulante

El AT es un polifenol vegetal con una glucosa central y 9-10 residuos de ácido gálico por glucosa, es capaz de precipitar proteínas por enlaces de hidrógeno y efectos hidrofóbicos (Koupantsis *et al.*, 2016), por lo que puede ser una alternativa como reticulante.

En las microcápsulas reticuladas con AT para el sistema APS:CMC, se observó (figura 17a) que a baja concentración de reticulante (1% (w/w)) y tiempo de reticulación (3 y 6 h), la eficiencia de encapsulación no presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a las microcápsulas sin reticulante, que fueron obtenidas en el secado por aspersión; sin embargo, a medida que incrementa la concentración (2% (w/w)) y el tiempo de reticulado, la eficiencia de retención y encapsulación mejoró, obteniendo 66 y 47% respectivamente, a la concentración de 2% (w/w) de AT por 6 h de reticulado; lo cual indica que se encapsuló el 71% de aceite retenido. Por otra parte, aun cuando en las gráficas de efectos principales (resultados no mostrados) se observó que el tiempo no es un factor que influye en la eficiencia de encapsulación, se decidió incrementar hasta 9 h de reticulación con el 2% (w/w) de AT, ya que tal vez, el intervalo de 3 y 6 h es corto y es probable que no se observe ningún cambio; sin embargo, aunque hubo un incremento, tanto en la eficiencia de retención como de encapsulación, no fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ), siendo 6 h el tiempo suficiente para alcanzar la mayor reticulación con AT.

En las muestras que fueron liofilizadas (figura 17b) la eficiencia de encapsulación fue superior, alcanzando hasta un 80% a las mismas condiciones de reticulación con AT, sin embargo, las EE obtenidas con el uso del reticulante tienden a ser menores que las obtenidas sin reticulante.

Para el sistema APS:AS se observa (figura 18a), que las microcápsulas reticuladas con AT y secadas por aspersión, aproximadamente el 50% del aceite retenido esta

encapsulado, teniendo una eficiencia máxima del 31 y 50% de encapsulación y retención respectivamente, a la concentración de 2% (w/w) de AT por 6 h, mientras que en las muestras liofilizadas de APS:AS (figura 17b), reticuladas con AT, la EE varió de 68 a 73% al aumentar el tiempo y la concentración de reticulante. Estos resultados coinciden con lo reportado por Zhang *et al.* (2011) quienes obtuvieron eficiencias de encapsulación de 55 – 90% en microcápsulas liofilizadas de G:GA reticuladas con AT.

Zhang *et al.* (2011) argumentan que el AT interactúa a través de la formación de múltiples puentes de hidrógeno con proteínas conformacionalmente abiertas, como la gelatina, sin embargo, pareciera ser que con las proteínas de suero que son globulares no se forma la misma interacción, lo cual provoca que el reticulado no sea el adecuado y por esta razón las EE en las microcápsulas secadas por aspersión sean menores a las microcápsulas liofilizadas. Koupantsis *et al.* (2016) comenta que el AT puede inducir un decremento o incremento en la eficiencia de encapsulación dependiendo del tipo de proteína utilizada para formar coacervados, sin embargo, en este trabajo también se pudo apreciar que el tipo de polisacárido influye en la interacción con AT, ya que las muestras de APS:AS secadas por aspersión mostraron poca mejora con respecto a la concentración y tiempo de reticulación, mientras que las muestras de APS:CMC (figura 17a) se obtuvo una considerablemente mejora en la EE a las mismas condiciones de reticulación. Como el AT forma enlaces por puente hidrógeno (interacción débil); no proporciona suficiente rigidez a la pared de las microcápsulas coacervadas para resistir el secado por aspersión.

Por otro lado, se observó (figura 19a y b) que las microcápsulas coacervadas de APS:Q fueron considerablemente afectados por la adición de ácido tánico, ya que tanto las muestras secadas por aspersión como las liofilizadas tuvieron bajas EE (< 21%). Estadísticamente no tuvieron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos secados. El efecto del AT sobre la disminución de la EE podría ser causado por el tamaño de la molécula de AT y su esfuerzo por interactuar con los polímeros que

forman la pared del coacervado, causando desorden en las moléculas de proteína adsorbidas, lo que trae como consecuencia que la interacción electrostática se interrumpa y el material lipofílico se libere. Lo mismo fue reportado por Koupantsis *et al.* (2016), quienes obtuvieron EE menores al 20% en microcápsulas de APS:CMC y 40% para microcápsulas de caseinato de sodio:CMC reticuladas con AT.

### 7.3.2 Tripolifosfato de sodio (TPF) como reticulante

EL TPP es un polianión y puede interactuar con grupos amino ( $-NH_3^+$ ) cargados positivamente por fuerzas electrostáticas para formar enlaces intermoleculares o redes reticuladas (Butstraen & Salaün, 2014), cabe aclarar que este reticulante solo se ha utilizado en coacervados formados con Quitosano como polisacárido.

Para las microcápsulas coacervadas con los 3 sistemas reticuladas con TPF, se puede observar en las figuras 17 – 19 (a) que la EE mejoró de 25 a 38% aproximadamente, al aumentar tanto el tiempo, como la concentración del reticulante, en las muestras obtenidas por aspersion. La baja eficiencia de encapsulación en los sistemas APS:CMC y APS:AS se debe probablemente a que el TPF causa la interrupción de la atracción electrostática entre la proteína y los polisacáridos, por el fenómeno de enmascaramiento de las cargas eléctricas (Aryee & Nickenson, 2012), debido a la presencia de iones sodio en su formulación, liberando el aceite previamente encapsulado. Para las muestras con 12% (w/w) de TPF, figura 17 y 18 (b), no fue posible obtener separación entre el disolvente y la fase coacervada, los polímeros se mantuvieron dispersos en la solución, por lo que no fue posible liofilizar estas muestras.

Basados en lo anterior, es probable que, para estos sistemas, el aceite presente en las microcápsulas secadas por aspersion, se haya encapsulado durante la aspersion y no por coacervación compleja, teniendo eficiencias de encapsulación similares para ambos sistemas. Para las muestras liofilizadas al utilizar TPF a una

concentración de 6% (w/w) por 2 y 4 h, la EE fue del 50%, lo cual representa un 30% menos de aceite encapsulado comparado con las muestras sin reticulante; por lo que se puede inferir que el TPF afecta la interacción electrostática y causa disminución en la EE.

Con respecto a las microcápsulas formadas con APS:Q (figura 19a), la cantidad de TPF utilizada, no fue suficiente para evitar el fenómeno de mucoadhesividad del Q y provocó dificultad en el secado por aspersión, teniendo bajas EE para este sistema, lo cual es opuesto a lo reportado por Prata & Grosso (2015 a) para microcápsulas de Gelatina:Q reticuladas con TPF, que presentaron resistencia parcial al secado por aspersión con mínima pérdida por adhesión a la pared de la cámara del secador. Respecto a las muestras liofilizadas (figura 19b), se obtuvo una EE aproximadamente del 70% independientemente de la concentración de TPF y el tiempo de reticulación, no existiendo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ellos. Butstraen & Salaûn (2014) observaron que al aumentar la concentración de TPF en microcápsulas de Q:Goma arábica incrementaba el grado de reticulación y la EE (de 91 a 95%), sin embargo, en este trabajo, aún en las microcápsulas liofilizadas y reticuladas con TPF, no se logró mantener la EE (91%) que tenían las microcápsulas coacervadas antes de liofilizar, indicando que la interacción electrostática que ocurre entre este reticulante y el APS no fue suficientemente fuerte para preservar el aceite encapsulado.

### 7.3.3 Ácido tánico oxidado (ATO) como reticulante

Strauss & Gibson (2004), han propuesto el uso de reticulantes a base de polifenoles en su estado oxidado para endurecer la pared de microcápsulas vacías de Gelatina:Goma arábica. Los polifenoles tienen un orto-difenol que al ser sometidos en condiciones de oxidación se transforman en ortoquinonas y estas pueden formar estructuras moleculares rígidas al reaccionar con proteínas (Figuroa-Espinosa *et al.*, 1999).

En este trabajo se utilizó AT sometido a condiciones de oxidación, para transformarlo en ácido tánico oxidado (ATO) y ser empleado como reticulante. Como se puede observar (figuras 17 – 19a) las EE obtenidas con ATO fueron alrededor de 28 a 35% aproximadamente en las microcápsulas de los 3 sistemas usados, secados por aspersión, siendo significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) a las muestras sin reticulante. Para las microcápsulas de APS:CMC y APS:Q la EE mejoró en un 50% con ATO al 1% (w/w) por 3 y 6 h comparadas a las muestras reticuladas con AT a las mismas condiciones. Parece ser que con ATO la reticulación es más fuerte (enlace covalente) para resistir el secado por aspersión.

Por otra parte, en las muestras liofilizadas para los sistemas APS:CMC y APS:AS, (figura 17 y 18b), la EE fue en aumento (de 70 a 75%) al aumentar el tiempo y la concentración de reticulante, sin embargo, para el sistema APS:Q (figura 18b) las EE fueron menores entre el 52 – 57% pero significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) a las muestras reticuladas con AT. Con el sistema APS:Q, las microcápsulas se forman a pH 6, por arriba del punto isoeléctrico (PI) de la proteína, en donde se encuentran cargados los grupos carboxilo. A este pH los grupos amino del Q están protonados, por lo tanto, la unión entre el agente reticulante (ATO) y el quitosano es más fuerte que con la proteína. Al tener una competencia entre las cargas eléctricas, es probablemente que se causará una pérdida parcial de la interacción entre la proteína y el quitosano, reduciendo la EE, comparado con los otros sistemas en donde el pH de coacervación está por debajo PI de la proteína (Rojas *et al.*, 2018).

Aun cuando ya se han empleado polifenoles oxidados para reticular microcápsulas vacías de Gelatina:Goma arábica (Strauss & Gibson, 2004), solo se ha evaluado la resistencia térmica y mecánica, al ser sometidas a calentamiento en agua en ebullición por 30 min y a altas presiones a 200°C por 30 min respectivamente. Se encontró que en ambas condiciones las microcápsulas coacervadas mantienen prácticamente su estructura, debido al enlace covalente entre la Gelatina y los polifenoles oxidados, por lo que, no hay datos de EE con la cual sea posible comparar los resultados obtenidos en este trabajo.

### 7.3.4 Enzima transglutaminasa (TG) como reticulante

La enzima transglutaminasa puede catalizar la formación de enlaces isopeptídicos entre el grupo  $\epsilon$ -amino de lisina y el grupo  $\gamma$ -carboxamida de glutamina (Lv *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2008). La enzima TG solo se aplicó para el sistema APS:Q, ya que las microcápsulas se forman a pH 6 que es el óptimo para la enzima (Lv *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2011 y Dong *et al.*, 2008), mientras que para los sistemas APS:CMC y APS:AS se descartó su uso debido al pH ácido al cual forman la interacción electrostática y en el cual la actividad de la enzima es reducida.

Como se observa en la figura 19a, las microcápsulas de APS:Q reticuladas con TG secadas por aspersión, obtuvieron mayor EE al aumentar el tiempo de reticulación, la variación en la concentración de TG no tuvo efecto la EE cuyo valor máximo fue de 40% aproximadamente. Esto pudo ser debido a que se obtiene una reticulación débil, ocasionando pérdida de aceite esencial en el secado por aspersión, lo cual concuerda con lo reportado por Alvim & Grosso (2010) quienes elaboraron microcápsulas de Gelatina:Goma arábica (G:GA) reticuladas con TG y secadas por aspersión obteniendo una resistencia parcial al secado. Sin embargo, estos resultados contrastan con lo reportado por Dong *et al.* (2011) que secaron microcápsulas de G:GA, mismas que resistieron el secado por aspersión y mantuvieron la integridad de la pared. Este último autor empleó un tiempo de reticulación de 12 h para la enzima y obtuvo microcápsulas con una pared más endurecida, por lo que en este trabajo, se decidió aumentar el tiempo de reticulación a 9 y 12 h con 15 U de enzima. Como se mencionó anteriormente, el tiempo tiene efecto en la EE y no la concentración, ya que estadísticamente no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre 15 y 30 U. En los resultados obtenidos, se observa (figura 19a) que a mayor tiempo de reacción mayor incremento en la EE, obteniendo hasta un 50% con 12 h de reticulado, por lo que EE mejoró considerablemente con respecto a la muestra sin reticulante.

Para las muestras liofilizadas, la EE varió de 75 a 80% (figura 19b), siendo significativamente mejores a las obtenidas en secado por aspersion. Las muestras obtenidas con este sistema mostraron las mejores EE, comparadas con los otros reticulantes para este sistema y solo se presenta una pérdida de aceite esencial de aproximadamente 10% con respecto a las microcápsulas antes de secar. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Costa de Conto *et al.* (2013) con EE de 20 – 70% para microcápsulas de Proteína de soya:GA reticuladas con TG, mientras que para microcápsulas de Gelatina reticuladas con TG fue de 97% (Alvim & Grosso, 2010; Wang *et al.*, 2014). Se considera eficiente el grado de reticulación que se obtiene con la enzima, porque retarda la liberación del núcleo (Dong *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012; Alvim & Grosso, 2010; Dong *et al.*, 2011), sin embargo, se ha observado que la liberación del núcleo es similar en microcápsulas con y sin reticulante (TG) (Prata *et al.*, 2008).

### **7.3.5 Glutaraldehído como reticulante de comparación**

El glutaraldehído (GLU) es un agente químico que promueve enlaces entre grupos amino, creando una reticulación irreversible (Alvim & Grosso, 2010). Se empleó GLU como reticulante control, a pesar de los problemas de toxicidad que se le han atribuido. Las EE obtenidas en las microcápsulas coacervadas reticuladas con GLU y secadas por aspersion (figuras 17 – 19a) fueron de 39, 38 y 56% para APS:CMC, APS:AS y APS:Q respectivamente. Con GLU se obtuvo una resistencia parcial de las microcápsulas, por lo que al ser secadas por aspersion hubo pérdida de aceite esencial y menor EE, comparada con la eficiencia obtenida en las microcápsulas antes de secar. Yang *et al.* (2015) obtuvieron EE de 56 – 70% para microcápsulas de Gelatina:Goma arábica reticuladas con GLU obtenidas por aspersion, sin embargo, la EE no solo está en función del reticulante sino de la concentración de material de pared, la relación núcleo:pared y el pH de coacervación. Un parámetro importante a considerar son las condiciones a las cuales funciona mejor el GLU como reticulante, el cual se ha utilizado a pH alcalino (pH 9) con tiempos superiores a las 10 h (Leclercq *et al.*, 2009), mientras que en el presente trabajo se maneja un



pH ácido para los sistemas APS:CMC y APS:AS, 3 y 2.5 respectivamente, valor al que se forman mejor los coacervados y solo se dejó actuar por 6 h, por lo que es probable que estas condiciones no sean las más adecuadas para el reticulado y ocasionen la baja eficiencia de encapsulación encontrada en estos sistemas, después del secado por aspersión. En lo que respecta al sistema APS:Q, el GLU funciona mejor, porque el pH de coacervación es 6 y la interacción del aldehído con los grupos amino del quitosano es más favorable, pero no suficiente para asegurar una reticulación exitosa. Para determinar si el tiempo es un factor que mejora el reticulado, se evaluó para este sistema la reticulación con GLU hasta por 12 h (figura 19a) y se encontró que no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las EE, sin embargo, la eficiencia de retención si fue ligeramente mayor.

Por otro lado, en las muestras liofilizadas (figuras 17 – 19b) se obtuvo una EE de 80% para APS:CMC y APS:AS y de 82% con APS:Q, que son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) a las obtenidas en secado por aspersión; aun así no se logró mantener la EE que tienen las microcápsulas coacervadas antes de secar. Alvim & Grosso (2010) reportaron una eficiencia de encapsulación superior al 90% para microcápsulas de Gelatina:Goma arábica reticuladas con GLU y liofilizados, ya que con el secado por aspersión presentaron un daño considerable en la pared, siendo un proceso de secado no favorable a pesar de la reticulación.

En resumen, se puede observar, que el tipo de agente reticulante tiene el mayor efecto sobre la EE. Aun cuando solo se consiguió tener una rigidez parcial de la pared de las microcápsulas para resistir el secado por aspersión, los mejores resultados fueron obtenidos con ácido tánico (2% (w/w), 6 h) y con la enzima transglutaminasa (15U, 12 h), para los sistemas proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q) respectivamente, con una eficiencia máxima de encapsulación del 50%.

### **7.3.6 Características de las microcápsulas coacervadas secas de aceite esencial de naranja**

#### **7.3.6.1 Contenido de humedad de las microcápsulas secas**

El contenido de humedad de las microcápsulas coacervadas secadas por aspersión, varió de 1 – 4.5%, característicos de los polvos obtenidos por aspersión (Reineccius, 2004), mientras que las muestras liofilizadas presentan humedades ligeramente mayores (2 – 5.5%), lo cual puede ser debido presencia de gotas de aceite, que reducen la evaporación de agua, actuando como una barrera para el transporte de vapor, incrementando la hidrofobicidad de las microcápsulas y limitando la transferencia de agua (Calderón-Oliver *et al.*, 2017).

#### **7.3.6.2 Tamaño y distribución de tamaño de partícula**

En las figuras 20, 21 y 22 se muestra la distribución de tamaño de las microcápsulas para el sistema APS:CMC, APS:AS y APS:Q, respectivamente, obtenidas en secado por aspersión. En general se observa una distribución bastante homogénea y unimodal. Con respecto al tamaño de partícula (diámetro Sauter [ $D_{3,2}$ ]), este varió desde 6 – 10  $\mu\text{m}$  para las microcápsulas sin reticulante en los tres sistemas. Las microcápsulas reticuladas con AT y TPF presentan un tamaño de partícula que va desde 10 – 17  $\mu\text{m}$ , siendo mayores en los sistemas APS:AS y APS:Q respectivamente. Las muestras de APS:Q reticuladas con TG tiene en promedio un diámetro de 20  $\mu\text{m}$ . Finalmente las microcápsulas reticuladas con GLU presentaron un tamaño de 16 y 19  $\mu\text{m}$  para APS:CMC y APS:AS respectivamente, sin embargo, para las muestras de APS:Q destacan el tamaño de 68  $\mu\text{m}$ , probablemente debido a la formación de aglomerados. Este tamaño de partícula es más pequeño que lo reportado por Alvim & Grosso (2010) y Prata & Grosso (2015 a) para muestras secadas por aspersión de microcápsulas coacervadas de gelatina reticulados con GLU, TG y TPF, quienes obtuvieron 58, 65 y 100  $\mu\text{m}$  respectivamente.

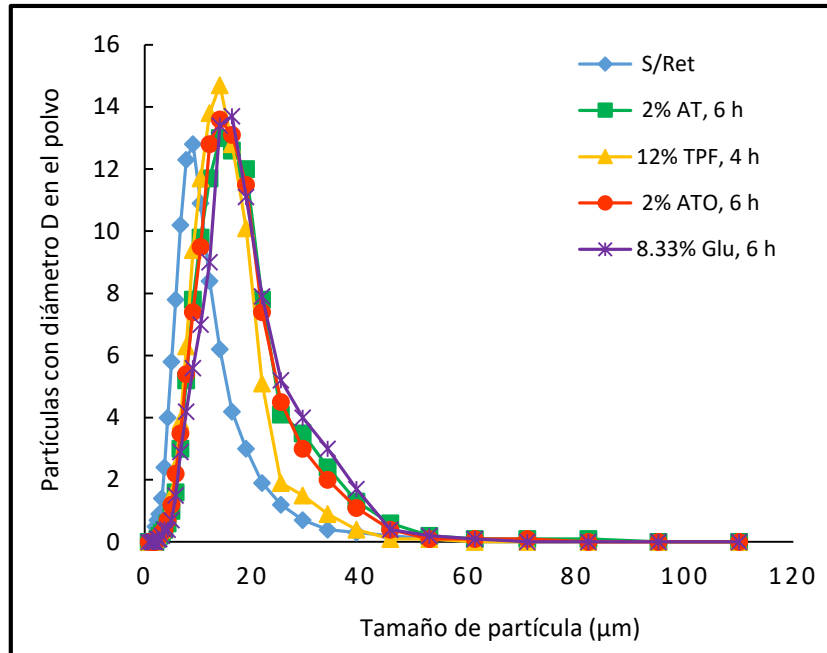


Figura 20. Distribución del tamaño de partícula de microcápsulas de aceite esencial de naranja secadas por aspersión para el sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) sin agente reticulante y reticulados con ácido tánico (AT), tripolifosfato de sodio (TPF), ácido tánico oxidado (ATO) y glutaraldehído (GLU)

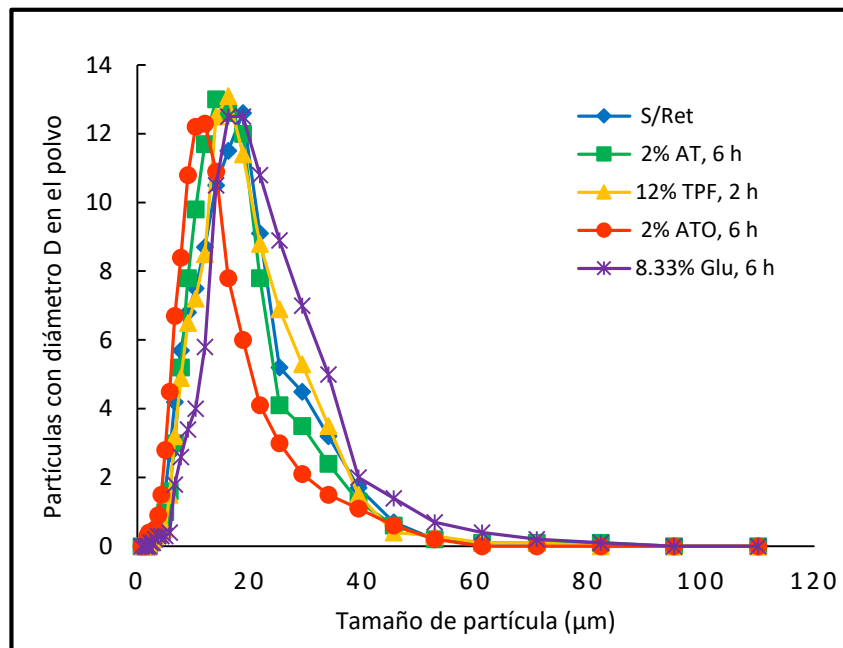


Figura 21. Distribución del tamaño microcápsulas de aceite esencial de naranja secadas por aspersión para el sistema aislado de proteína de suero de leche:alginate de sodio (APS:AS) sin agente reticulante y reticulados con ácido tánico (AT), tripolifosfato de sodio (TPF), ácido tánico oxidado (ATO) y glutaraldehído (GLU)

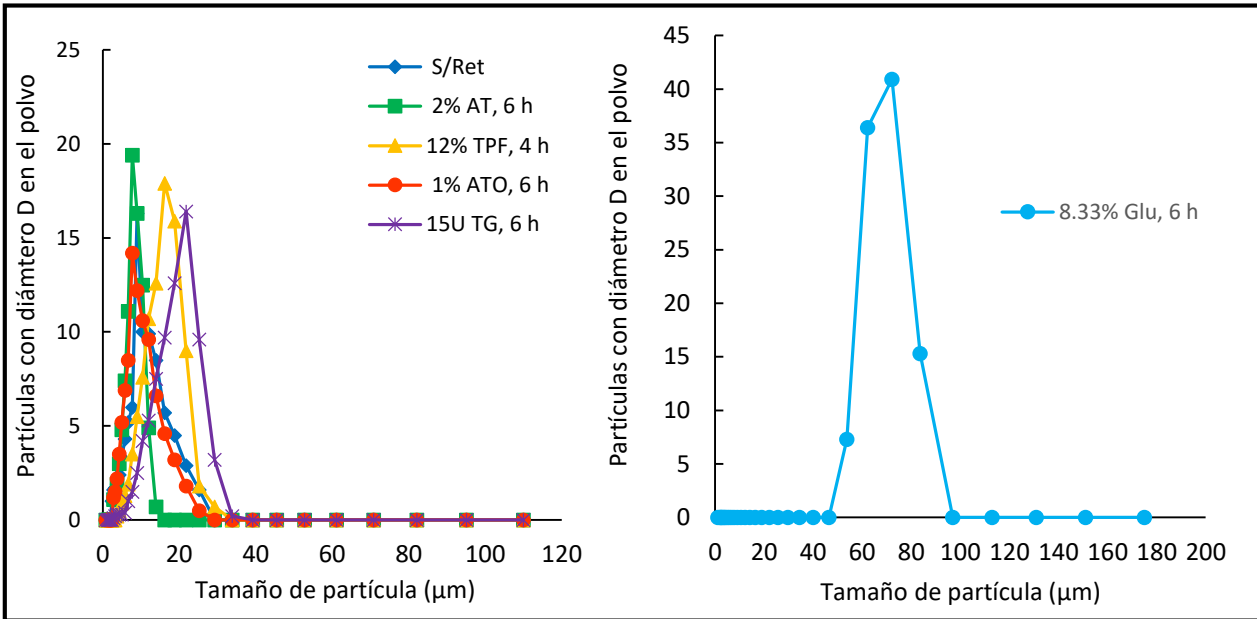


Figura 22. Distribución del tamaño de microcápsulas de aceite esencial de naranja secadas por aspersión para el sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q) sin agente reticulante y reticulados con ácido tánico (AT), tripolifosfato de sodio (TPF), ácido tánico oxidado (ATO), transglutaminasa (TG) y glutaraldehído (GLU)

#### 7.4 Efecto del tipo de secado en la eficiencia de encapsulación

Como se puede observar en la discusión del efecto de los diferentes agentes reticulantes y métodos de secado, independientemente del sistema proteína:polisacárido, las microcápsulas liofilizadas obtuvieron significativamente mayores EE ( $p < 0.05$ ), comparadas con las de secado por aspersión, esto sugiere que si bien el reticulado ha mejorado la EE de las microcápsulas coacervadas secadas por aspersión, el reticulante no ha dado suficiente soporte y rigidez a la pared de las microcápsulas, para resistir por completo el secado por aspersión.

En términos generales, las muestras liofilizadas sin agente reticulante, tienen EE mayores a las muestras reticuladas. Esto puede ser atribuido al tiempo de agitación utilizado durante la reticulación, ya que como lo indica Xing *et al.* (2004) la agitación desestabiliza la emulsión, resultando en la distorsión o incluso fragmentación de las microcápsulas coacervadas reduciendo la eficiencia de encapsulación. Las muestras sin reticulante se agitan por 30 min después de formar los coacervados,

mientras que las muestras reticuladas se mantienen en agitación hasta por 6 h para dejar actuar el reticulante en el endurecimiento de la pared, afectando la interacción electrostática.

Basados en los resultados obtenidos para las muestras liofilizadas se puede inferir que la eficiencia de encapsulación está en función de los materiales de pared y no necesariamente del agente reticulante, siendo al mismo tiempo un método de secado menos agresivo. Sin embargo, es un proceso de mayor costo económico y de mayor tiempo para la obtención de las microcápsulas secas, dando lugar a la formación de un bloque sólido, en donde el secado por aspersión tiene mayor ventaja, ya que reduce tanto el costo de operación como el tiempo del proceso. Aunque, en secado por aspersión se perdió material lipofílico durante el proceso, hay muestras en las que se obtuvo hasta un 50% de EE aproximadamente; como el sistema APS:CMC reticulado con 2% (w/w) de AT por 6 h y con el sistema APS:Q reticulado con 15U por 12 h; lo cual representa una mejora del 400% en la EE con respecto a las muestras sin reticulante. El polvo fluido seco obtenido por aspersión puede permitir que el material lipofílico sea protegido por mayor tiempo hasta su uso final, mientras que las muestras obtenidas como un bloque sólido en liofilización, deben ser sometidas a un proceso de molienda para su uso, lo cual causa la inmediata liberación del material encapsulado.

Como se mencionó anteriormente, tanto el AT como la enzima TG, fueron los dos agentes reticulantes que ofrecieron mayor protección al aceite durante la etapa de aspersión, por lo que, se llevó a cabo un análisis comparativo entre estas microcápsulas y las obtenidas por liofilización. Para que ambas muestras fueran polvos fluidos con similares características, las muestras liofilizadas fueron sometidas a un proceso de molienda y tamizado (tamiz de 200).

En el cuadro 9, se muestran los resultados comparativos entre las muestras secadas por aspersión y liofilización molida y tamizada: microcápsulas de APS:CMC reticuladas con AT (2% (w/w), 6 h) y microcápsulas de APS:Q reticuladas con TG (15U, 12 h).

Cuadro 9. Propiedades de las microcápsulas coacervadas secadas de las mejores condiciones de reticulación comparadas con microcápsulas coacervadas liofilizadas (molidas y tamizadas)

SECADO POR ASPERSIÓN				LIOFILIZACIÓN		
Muestra	ER (%)	EE (%)	Diámetro Sauter (µm)	Aceite liberado por la molienda (%)	EE remanente (%)	Diámetro Sauter (µm)
Sistema APS:CMC						
Sin reticulante	13.94 ±0.78	11.95 ±0.94	6.31 ±0.76	85.89 ±0.09	14.11 ±0.08	35.47 ±0.25
AT (2% (w/w), 6h)	66.05 ±0.27	46.99 ±1.27	11.38 ±0.27	77.50 ±0.62	22.41 ±0.62	30.06 ±0.35
Sistema APS:Q						
Sin reticulante	16.24 ±0.97	13.21 ±0.65	9.44 ±0.15	84.36 ±0.44	15.64 ±0.43	30.05 ±0.78
TG (15U, 12 h)	63.23 ±0.51	50.03 ±0.79	13.07 ±0.55	71.54 ±0.43	28.46 ±0.50	35.86 ±0.45

Como se puede observar en el cuadro 9, el porcentaje de aceite liberado debido al proceso de molienda de las microcápsulas liofilizadas es de 71 a 86%, el cual se llega a convertir en aceite superficial, mientras que el porcentaje de aceite encapsulado remanente es de tan solo 14 a 28%. Comparando estos resultados con los obtenidos en secado por aspersión, se puede apreciar que la cantidad de aceite encapsulado en el último es dos veces más a lo obtenido en liofilización después de la molienda y tamizado en las mismas condiciones de reticulación. Respecto a las muestras sin agente reticulante, se obtuvo prácticamente la misma cantidad de aceite encapsulado en ambos métodos. Por lo tanto, se puede enfatizar que el secado por aspersión es una alternativa competitiva con la liofilización, obteniendo un polvo fluido que ayuda a mantener mejor el material lipofílico.

Respecto al tamaño de partícula (cuadro 9). Se puede observar que, aunque el bloque sólido formado durante la liofilización trató de ser molido finamente e igualada al tamaño de las muestras obtenidas por aspersión, estas presentan un tamaño superior a las 30 µm, mayor al obtenido en secado por aspersión (figura 23) además de una distribución de tamaño de partícula más amplia. Las muestras

liofilizadas no se molieron a tamaños más pequeños debido a la dureza del bloque liofilizado.

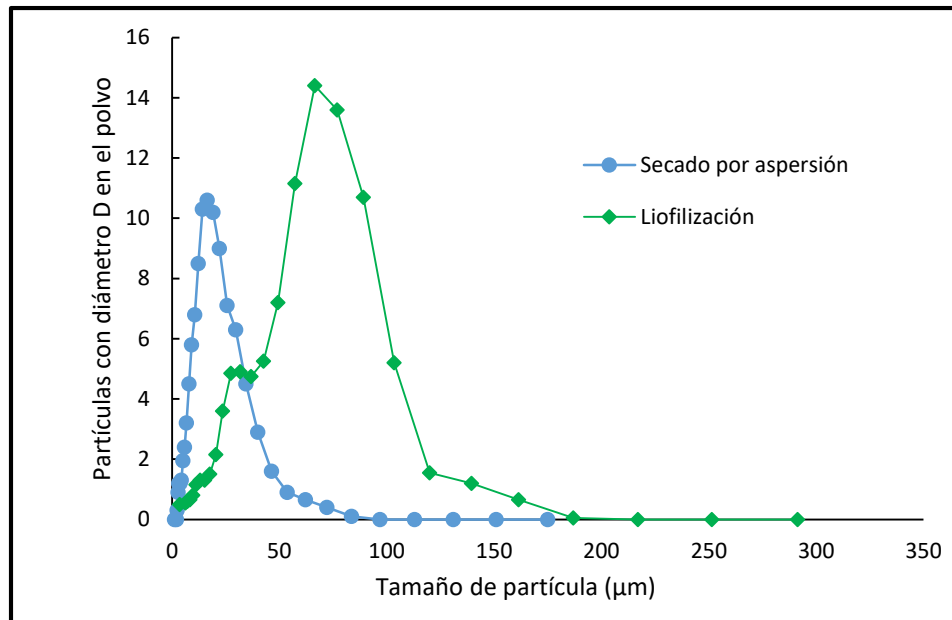


Figura 23. Distribución del tamaño de microcápsulas de aceite esencial de naranja secadas por aspersion y liofilización. Ej. Sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q) reticuladas con la enzima transglutaminasa (15U, 12 h)

#### 7.4.1 Morfología de las microcápsulas

Se utilizó microscopía óptica para observar la morfología de las microcápsulas coacervadas en suspensión con y sin agente reticulante. En la figura 24a y b se puede observar que las partículas están formadas por aglomerados de gotas de aceite encapsulados con una capa lisa de coacervado uniforme alrededor de los glóbulos de aceite, permitiendo la formación de cápsulas multinucleadas.

Por otra parte, se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) para observar la morfología de las microcápsulas de aceite esencial de naranja, obtenidas por secado por aspersion y de liofilización molida y tamizada.

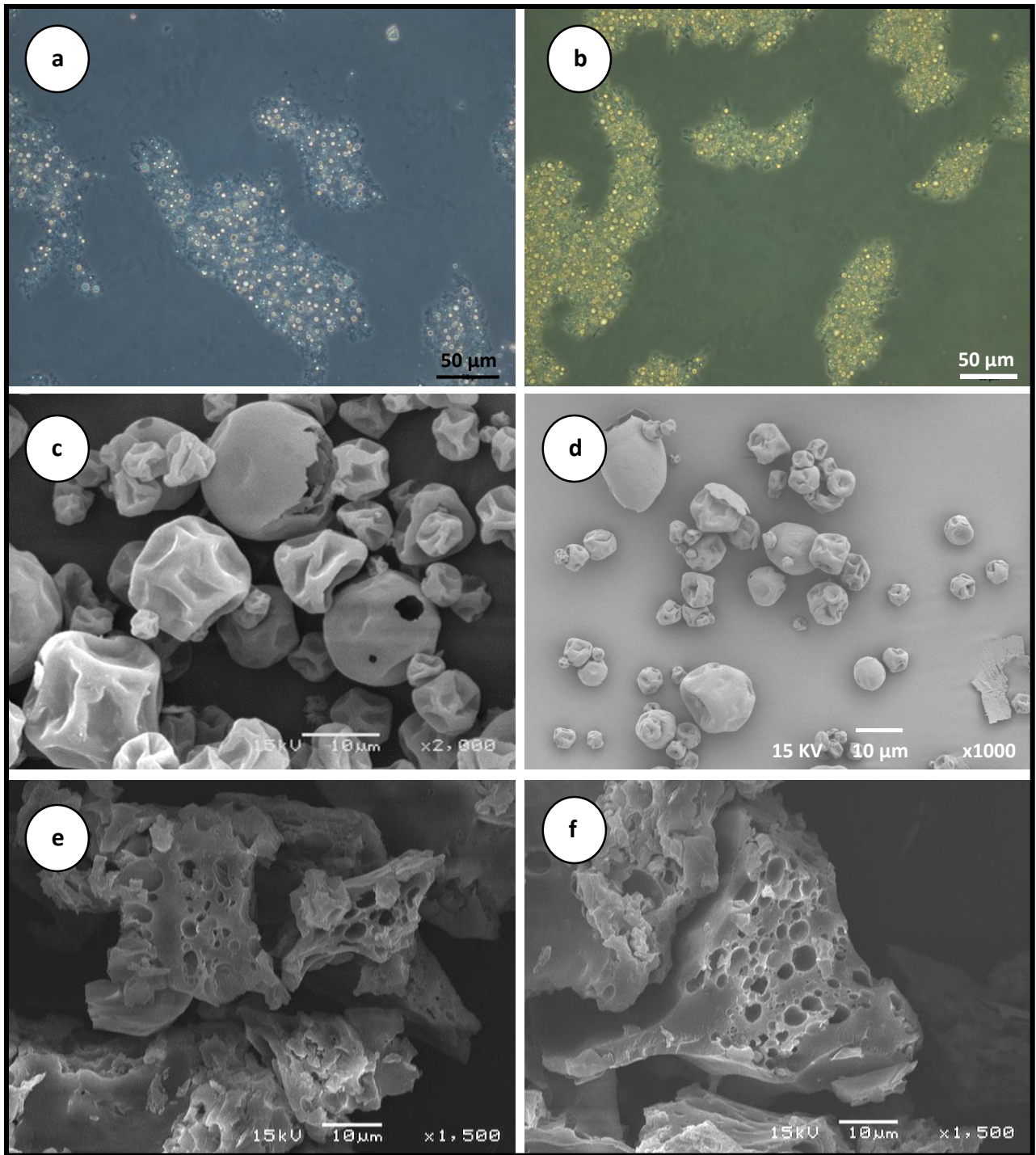


Figura 24. Morfología de las microcápsulas coacervadas del sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). Morfología por microscopía óptica de contraste de fases de las microcápsulas coacervadas en suspensión sin reticulante (a) y reticuladas con la enzima transglutaminasa (TG) (b). Morfología por SEM de las microcápsulas: secadas por aspersión sin reticulante (c) y reticuladas con TG (d); liofilización molida y tamizada sin reticulante (e) y reticuladas con TG (f).



La figura 24c y d muestra un ejemplo de la morfología obtenida para las muestras de secado por aspersión, las cuales fueron similares con o sin reticulante, en general, se puede observar que las microcápsulas están formadas por algunas partículas grandes de forma redonda y superficie lisa, algunas están encogidas con abolladuras y una gran mayoría de diminutas partículas arrugadas, sin embargo, algunas microcápsulas sin reticulante se encontraron visiblemente perforadas y fracturadas lo que provoca pérdida del agente lipofílico. La figura 24d y e, muestra un ejemplo de la morfología obtenida para las microcápsulas liofilizadas molidas y tamizadas, la cual es similar tanto en muestras con y sin reticulante. Como se puede observar, estas muestras presentan una forma irregular de estructura porosa debido al aceite encapsulado el cual fue expuesto durante el proceso de molienda.

## 7.5 Encapsulación de agentes bioactivos lipofílicos

### 7.5.1 Aceite esencial de bergamota y pescado (fuente de omega 3)

Se llevó a cabo la encapsulación de diferentes agentes bioactivos lipofílicos: aceite esencial de bergamota y aceite de pescado este último como fuente de ácidos grasos omega 3, que en lo sucesivo se denominarán como ácidos grasos omega 3, con los sistemas APS:CMC y APS:Q, ya que son los que obtuvieron las mejores eficiencias de encapsulación después del secado por aspersión. Las microcápsulas coacervadas fueron reticuladas en las condiciones mostradas en el cuadro 10.

Cuadro 10. Agentes reticulantes para microcápsulas de agentes bioactivos lipofílicos

Sistema	Reticulante	*Concentración/ g de proteína	Tiempo
APS:CMC	Ácido tánico	2% (w/w)	6 h
	Glutaraldehído	8.33% (w/w)	6 h
APS:Q	Transglutaminasa	15 U	12 h
	Glutaraldehído	8.33% (w/w)	6 h

\*Concentración con base al contenido de proteína

En la figura 25 y 26 se muestran los resultados obtenidos de la eficiencia de encapsulación para las microcápsulas reticuladas de aceite esencial de bergamota y ácidos grasos omega 3, respectivamente.

Como se puede observar en las figuras 25a y 26a, en ambas muestras secadas por aspersión, se obtuvieron EE muy similares a las muestras con aceite esencial de naranja a las mismas condiciones de reticulación, por lo que, el estudio del efecto del agente reticulante, se puede utilizar en estos materiales lipofílicos. Además, algunas muestras secadas por aspersión rebasaron el 50% de eficiencia de encapsulación. Aunque las EE fueron muy similares, los polvos obtenidos presentan características completamente diferentes, las muestras de aceite esencial de bergamota son polvos muy finos de coloración blanca, mientras que los de ácidos grasos omega 3 son polvos ligeramente amarillos, que tienden a agregarse dando una apariencia aceitosa.

La EE de las muestras liofilizadas de aceite esencial de bergamota (figura 25b), fue en promedio de 80%, independientemente de si la muestra fue o no reticulada con ambos sistemas, sin diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Estas muestras formaron un bloque sólido de considerable dureza. Para las muestras de ácidos grasos omega 3 liofilizadas (figura 26b), la EE fue de 50% aproximadamente con el sistema de APS:CMC independientemente de si está o no reticulada, mientras que para el sistema de APS:Q las microcápsulas tuvieron una eficiencia ligeramente mayor, siendo la muestra reticulada con glutaraldehído la que mejor EE obtuvo (74%). Con este método de secado, se hizo evidente que el tipo de aceite influye en las características de las microcápsulas. Si bien la proporción de aceite con respecto al material de pared fue la misma para ambos agentes lipofílicos, el aceite de pescado es más viscoso (20 cps, proveedor) que el aceite de bergamota (0.5 cps, proveedor), lo cual posiblemente provocó que la EE se afectará durante la etapa de congelación, ya que hay mayor tendencia a la coalescencia o aglomeración, y los cristales de hielo durante esta etapa pudieron romper las vesículas, dando lugar a la pérdida de aceite y a la obtención de un bloque de fácil desintegración.

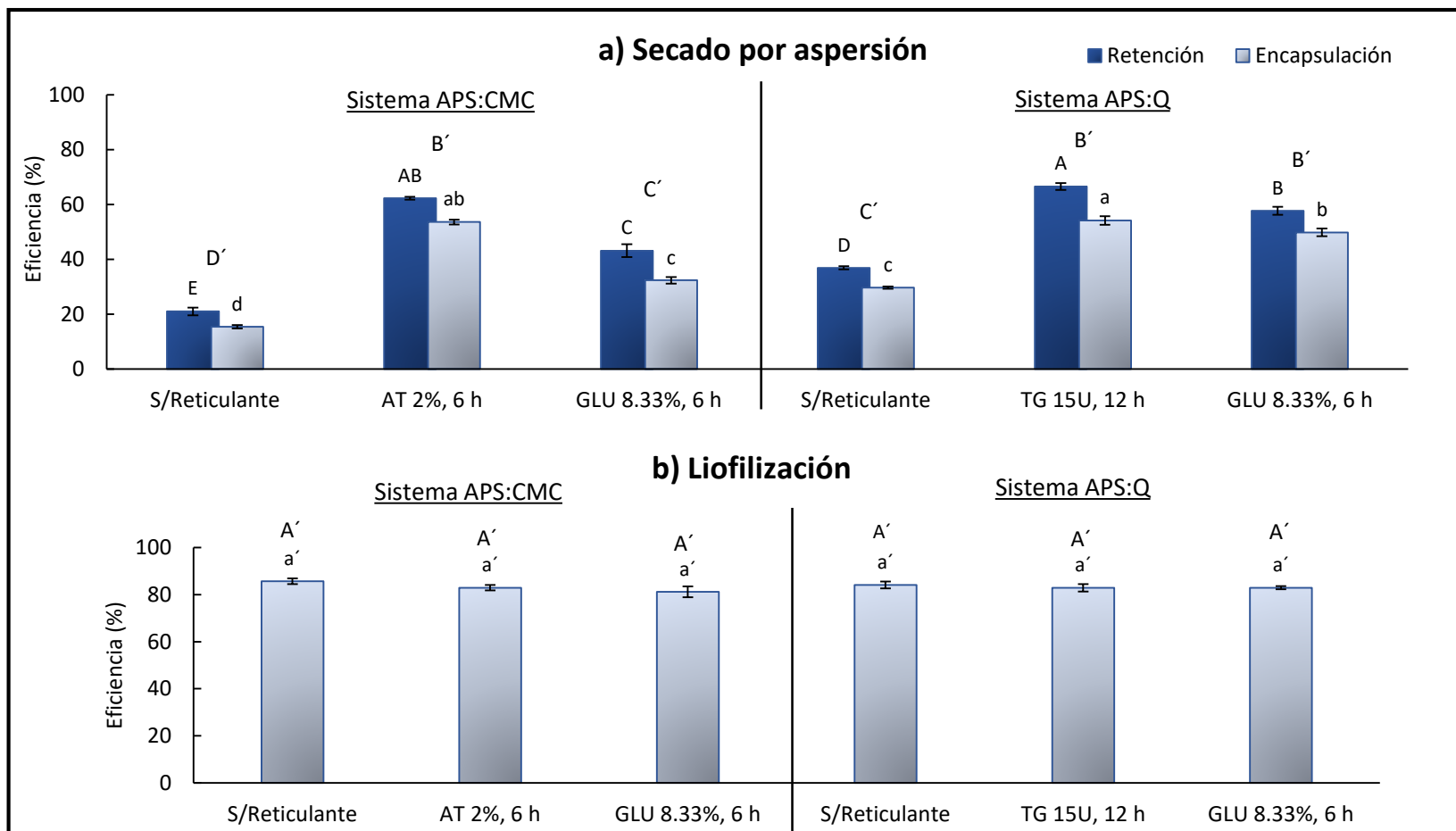


Figura 25. Efecto de las condiciones de reticulación y método de secado (a) Aspersión, b) Liofilización) sobre la eficiencia de retención y encapsulación de las microcápsulas de **aceite esencial de bergamota**: para el sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (**APS:CMC**) y sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (**APS:Q**). Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ). S/Reticulante: sin reticulante; AT: ácido tánico; TG: transglutaminasa; GLU: glutaraldehído

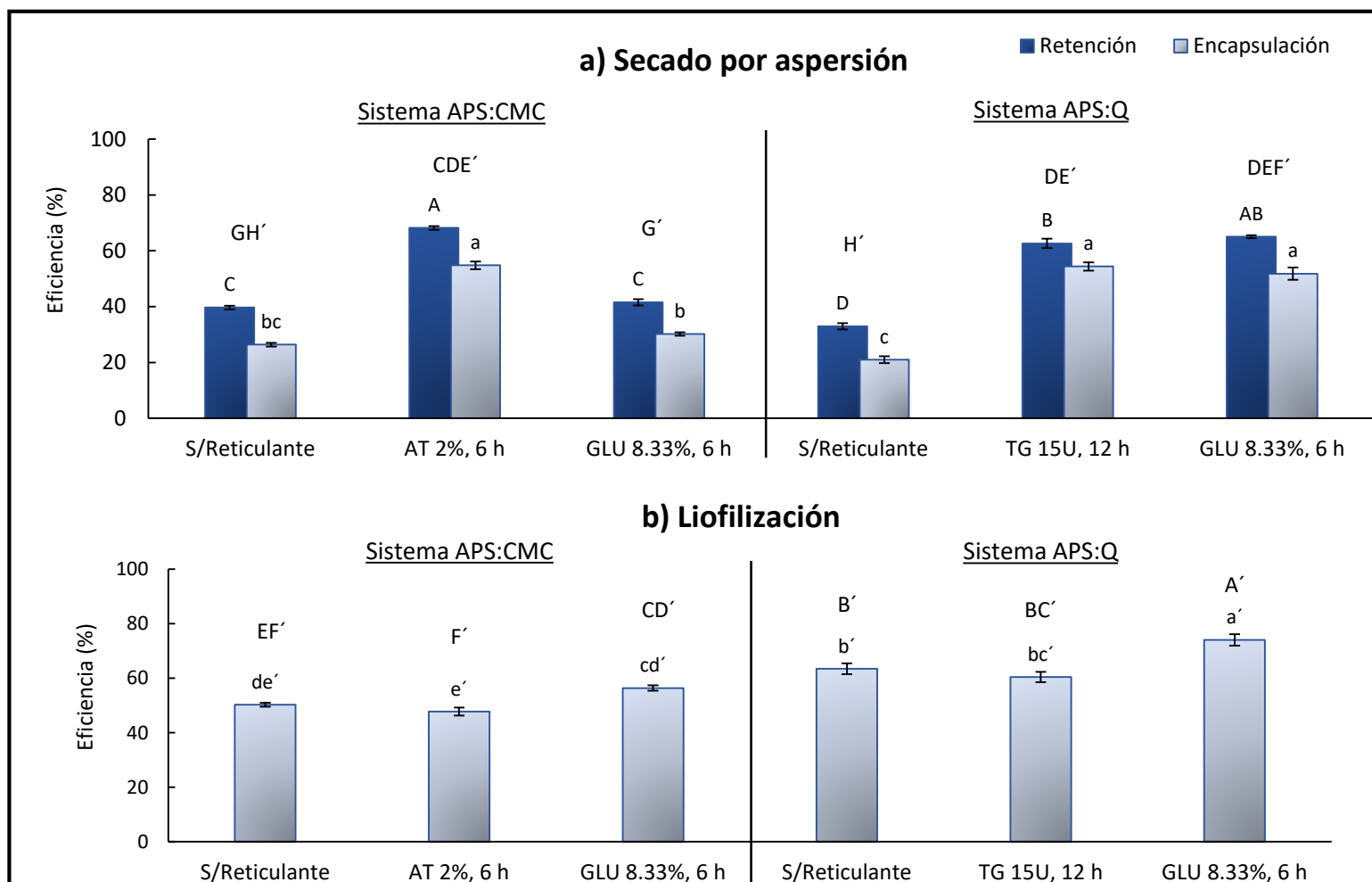


Figura 26. Efecto de las condiciones de reticulación y método de secado (a) Aspersión, b) Liofilización) sobre la eficiencia de retención y encapsulación de las microcápsulas de **ácidos grasos omega 3**: para el sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ). S/Reticulante: sin reticulante; AT: ácido tánico; TG: transglutaminasa; GLU: glutaraldehído

En términos generales, las microcápsulas liofilizadas presentan mayor eficiencia de encapsulación que las de secado por aspersión. Cabe señalar que en el método de secado por aspersión se elimina más del 90% de agua durante la aspersión, mientras que para la liofilización, se elimina el mismo porcentaje por decantación, lo cual repercute en la eficiencia, sin embargo, al comparar entre la cantidad de aceite que se retuvo (eficiencia de retención) en las muestras de secado por aspersión y la eficiencia obtenida en liofilización, se pueden apreciar (figura 25 y 26) que hay una diferencia de aproximadamente del 15%, por lo que, se ratifica una vez más que el secado por aspersión puede competir con la liofilización, especialmente para aceites más densos y viscosos como los ácidos grasos omega 3.

#### **7.5.1.1 Tamaño y distribución del tamaño de partícula**

En las figura 27(a y b), se muestra la distribución de tamaño de las microcápsulas para el sistema APS:CMC y APS:Q, respectivamente secados por aspersión. En general se observa una distribución bastante homogénea y unimodal. Con respecto al tamaño de partícula (diámetro Sauter), éste fue de 10 y 12  $\mu\text{m}$  para las microcápsulas de APS:CMC y APS:Q respectivamente con o sin reticulante en los dos sistemas.

En lo que respecta a la distribución y tamaño de partícula para las microcápsulas de ácidos grasos omega 3 secadas por aspersión, se obtuvo una distribución bimodal independientemente del sistema o agente reticulante empleado (figura 28 y 29), el tamaño de partícula, diámetro Sauter ( $D_{3,2}$ ) fue de aproximadamente 15 y 20  $\mu\text{m}$  con APS:CMC y APS:Q respectivamente, sin embargo, las microcápsulas tienen una apariencia aceitosa, lo cual promueve la formación de aglomerados (distribución bimodal); como consecuencia se obtuvo un segundo tamaño de partícula aproximadamente de 30 y 40  $\mu\text{m}$  con APS:CMC y APS:Q respectivamente.

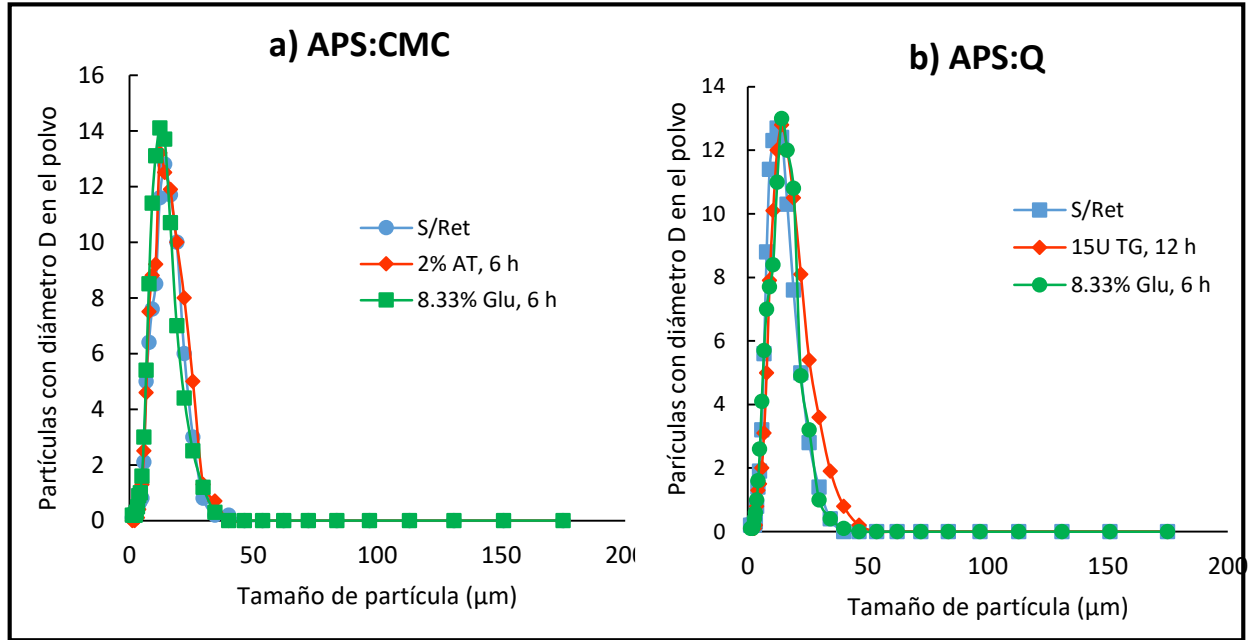


Figura 27. Distribución del tamaño de microcápsulas de aceite esencial de bergamota secadas por aspersión: a) sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) sistema aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). S/Ret: sin reticulante; AT: ácido tánico; TG: transglutaminasa; GLU: glutaraldehído

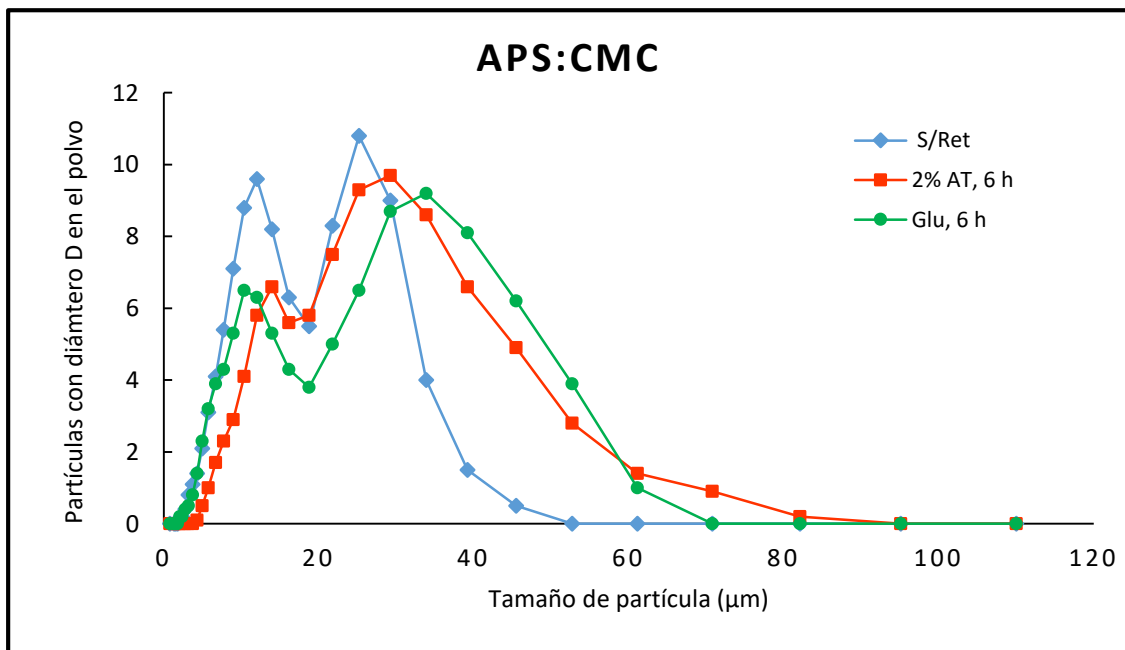


Figura 28. Distribución del tamaño de microcápsulas de ácidos grasos omega 3 secadas por aspersión para el sistema aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC). S/Ret: sin reticulante; AT: ácido tánico; GLU: glutaraldehído

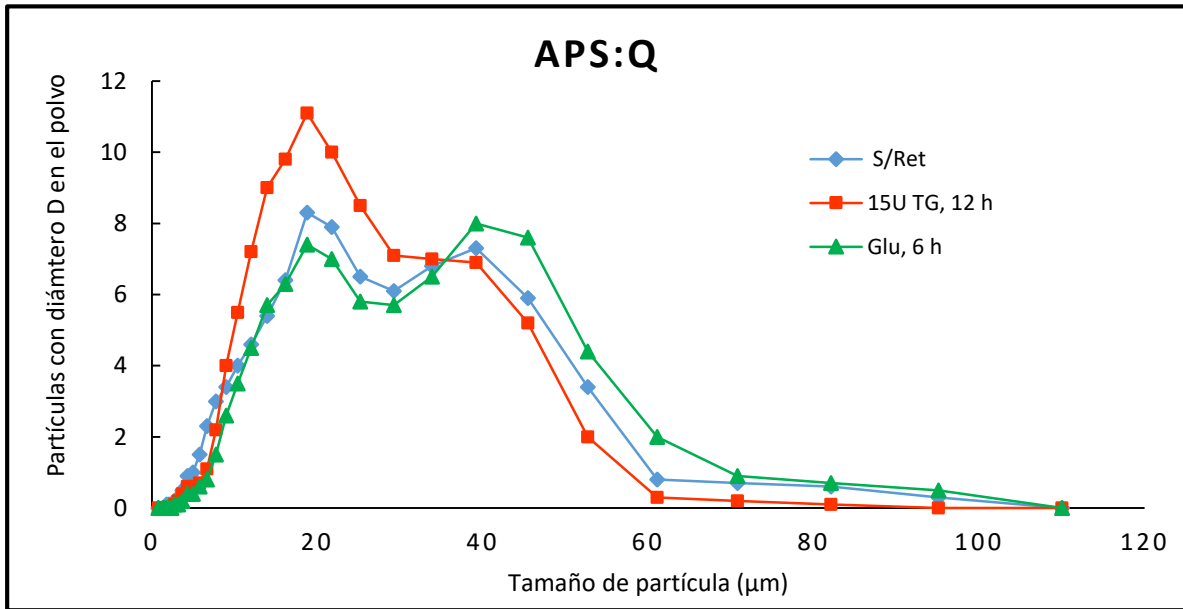


Figura 29. Distribución del tamaño de microcápsulas de ácidos grasos omega 3 secadas por aspersión para el sistema aislado de proteína de suero de leche:qitosano (APS:Q). S/Ret: sin reticulante; TG: transglutaminasa; GLU: glutaraldehído

Para las muestras liofilizadas, se evaluó el tamaño de partícula en las microcápsulas de APS:Q reticuladas con glutaraldehído, ya que son las únicas que se obtuvieron en forma de polvo. Como se puede observar en la figura 30, tanto las microcápsulas de aceite esencial de bergamota como de ácidos grasos omega 3 presentan un tamaño de  $121.6 \pm 2.5$  y  $118.7 \pm 1.5$  µm respectivamente, lo cual es considerablemente superior a las muestras obtenidas en secado por aspersión. Además, presentan una distribución más amplia, posiblemente como consecuencia del proceso de secado, ya que, durante la etapa de congelación se ha reportado que con la baja temperatura y alta velocidad de congelación, se lleva a cabo la agregación de las partículas y como consecuencia se obtiene un mayor tamaño de partícula (Morais *et al.*, 2016).

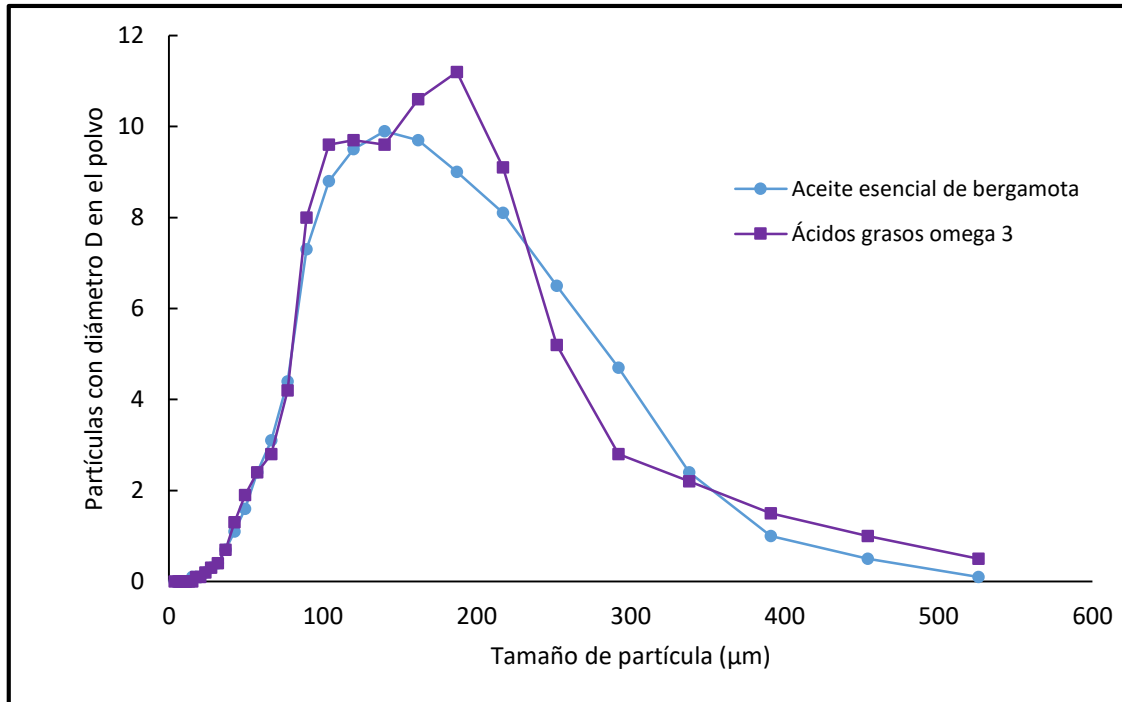


Figura 30. Distribución del tamaño de microcápsulas de aceite esencial de bergamota y ácidos grasos omega 3 obtenidas por liofilización. Sistema aislado de proteína de suero de leche: quitosano (APS:Q). reticuladas con glutaraldehído

### 7.5.1.2 Morfología de las microcápsulas

La morfología por microscopía electrónica para las microcápsulas secas obtenidas por aspersion y liofilización se observa en la figura 31. Las microcápsulas de aceite de bergamota obtenidas por aspersion, presentan forma redonda con partículas más pequeñas encogidas y con abolladuras (figura 31a), mientras que las microcápsulas de ácidos grasos omega 3, se encuentran aglomeradas (figura 31c). Las muestras liofilizadas independientemente del agente lipofílico encapsulado (figura 31b y d) tiene una estructura porosa que indica los glóbulos de aceite expuesto durante la molienda.



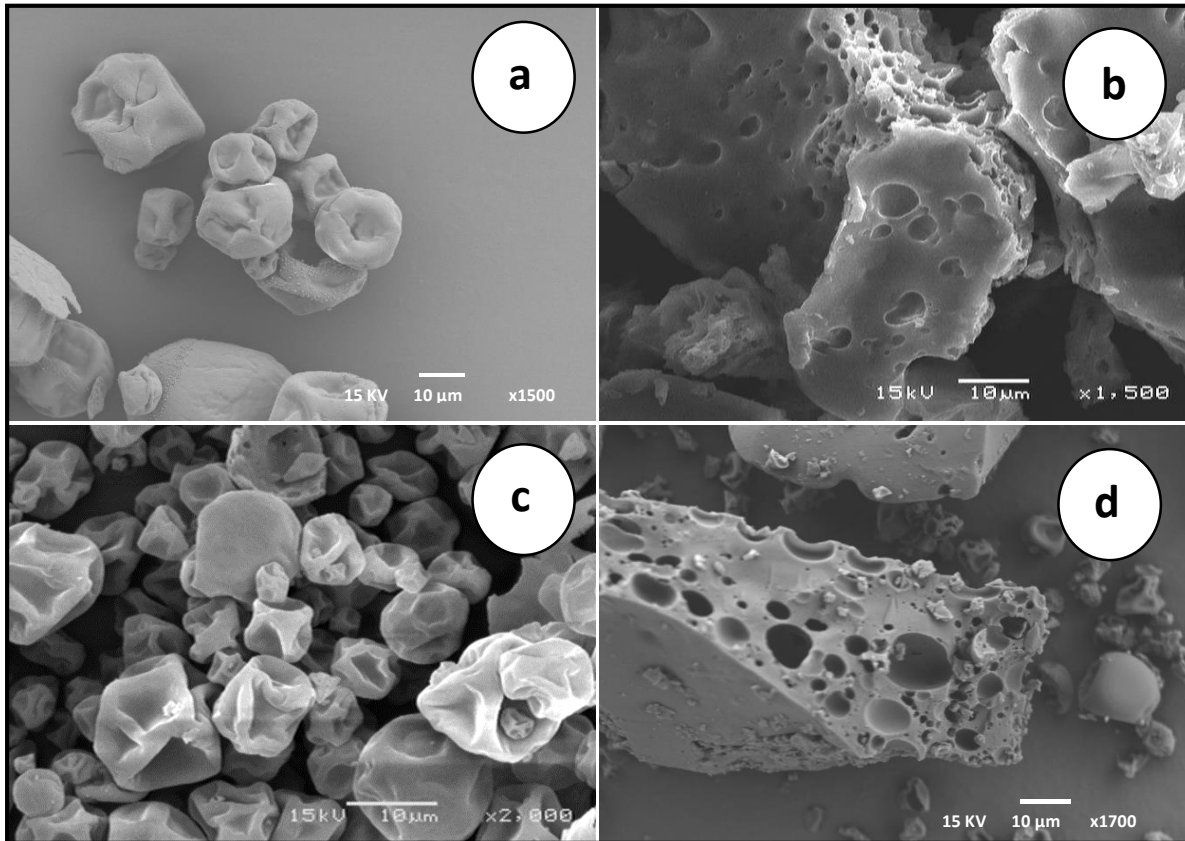


Figura 31. Morfología de las microcápsulas coacervadas con el sistema aislado de proteína de leche: quitosano (APS:Q) reticuladas con transglutaminasa: aceite esencial de bergamota a) Secado por aspersión y b) Liofilización; ácidos grasos omega 3 c) Secado por aspersión y d) Liofilización molida y tamizada.

## 7.6 Liberación de los agentes lipofílicos en un fluido gastrointestinal simulado

La influencia de la pared sobre la digestibilidad de las microcápsulas fue evaluada por medio de una digestión *in vitro* (gástrica e intestinal). Este análisis se llevó a cabo para las microcápsulas de aceite esencial de bergamota y de ácidos grasos omega 3 obtenidas por aspersión con los sistemas de APS:CMC (sin reticulante, reticuladas con ácido tánico y glutaraldehído) y APS:Q (sin reticulante, reticuladas con transglutaminasa y glutaraldehído). Para las muestras liofilizadas solo se realizó la digestión en las microcápsulas de APS:Q reticuladas con GLU, esto fue debido a que es la única muestra que se obtuvo en forma de un polvo granular. Las otras muestras liofilizadas al ser un bloque sólido, tenían que someterse a molienda y eso

provocó la liberación inmediata del agente lipofílico, por lo que fueron descartados para realizar la digestión gastrointestinal.

En la figura 32 y 33 se muestran los perfiles de liberación acumulativa del material encapsulado durante la digestión *in vitro*, obtenidos para los agentes lipofílicos de aceite esencial de bergamota y ácidos grasos omega 3, respectivamente.

Como se puede apreciar en las figuras 32 y 33, para las microcápsulas sin reticulante de APS:CMC y APS:Q, durante la primer hora de digestión gástrica se liberó aproximadamente el 50% de material lipofílico que se tenía encapsulado, esta rápida liberación es conocida como efecto ráfaga (Jain *et al.*, 2015; Saravanan & Rao, 2010). En el caso del sistema de APS:CMC, a pH gástrico (1.3) los grupos carboxilo de la CMC pierden su carga eléctrica (se disocian), mientras que para el sistema APS:Q en este valor de pH ambos polímeros tienen la misma carga eléctrica (positiva), por lo tanto, con el primer sistema la interacción con la proteína se pierden y con el segundo se interrumpe por repulsión electrostática. En ambos casos, el aceite esencial encapsulado fue liberado de la cápsula principalmente por la solubilidad de los materiales de pared. A medida que transcurrió el tiempo de digestión (5 h totales), se liberó el 100% del aceite encapsulado, debido a la acción del proceso de digestión, ya que la proteína quedó totalmente expuesta a ser atacada por las enzimas proteolíticas. Resultados similares fueron obtenidos por Karaca *et al.* (2013) para microcápsulas coacervadas de proteína de lenteja:maltodextrina, en donde se tuvo una liberación de aceite de linaza del 93%, por el efecto combinado de las enzimas hidrolíticas y de las condiciones de pH sobre la hidrólisis de la pared de la cápsula, lo cual resultó en un cambio en la estructura de la pared acompañada de la liberación de aceite.

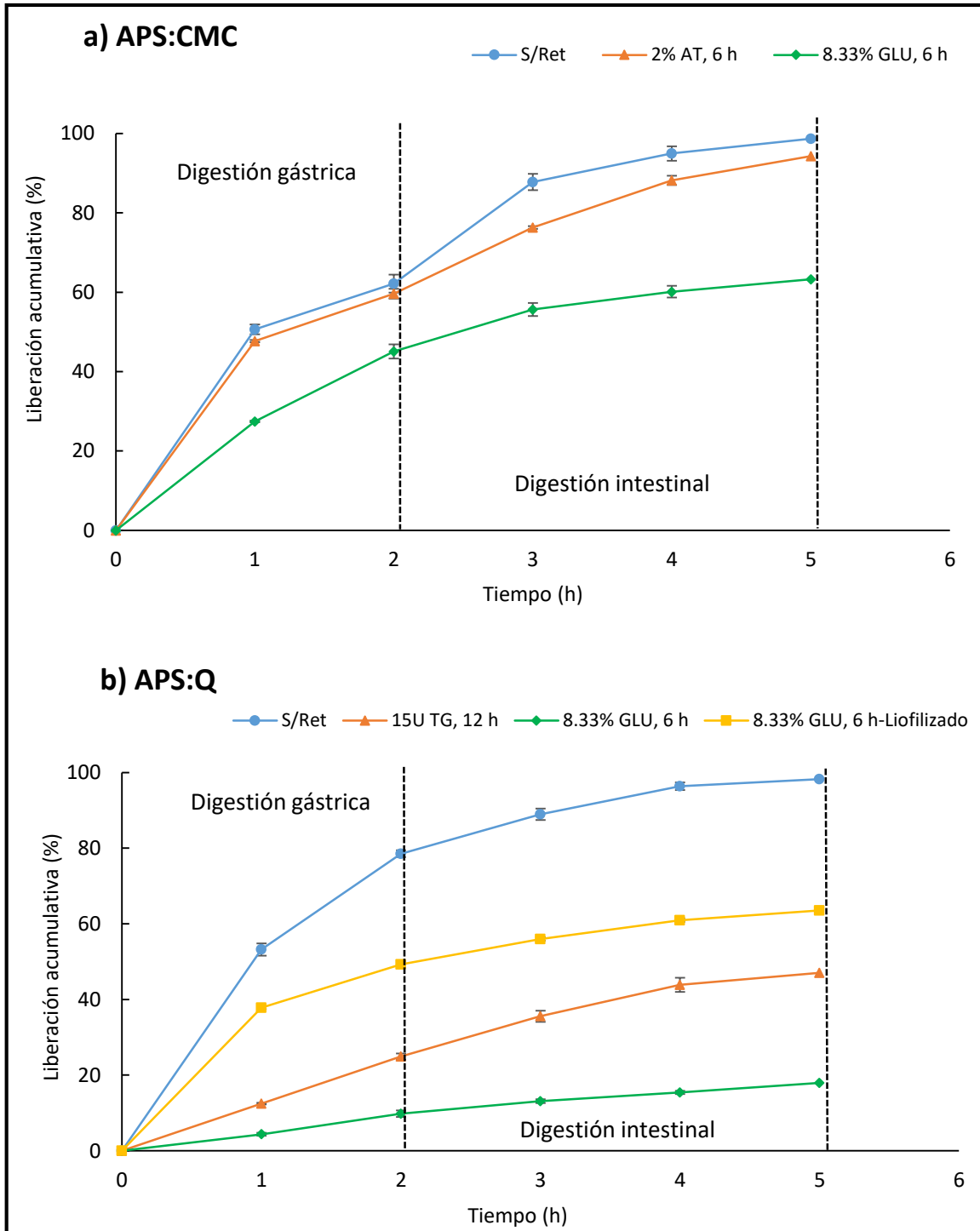


Figura 32. Perfil de liberación de acumulativa de **aceite esencial de bergamota** de microcápsulas: a) Aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) Aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). S/Ret: sin reticulante; AT: ácido tánico; TG: Transglutaminasa; GLU: glutaraldehído

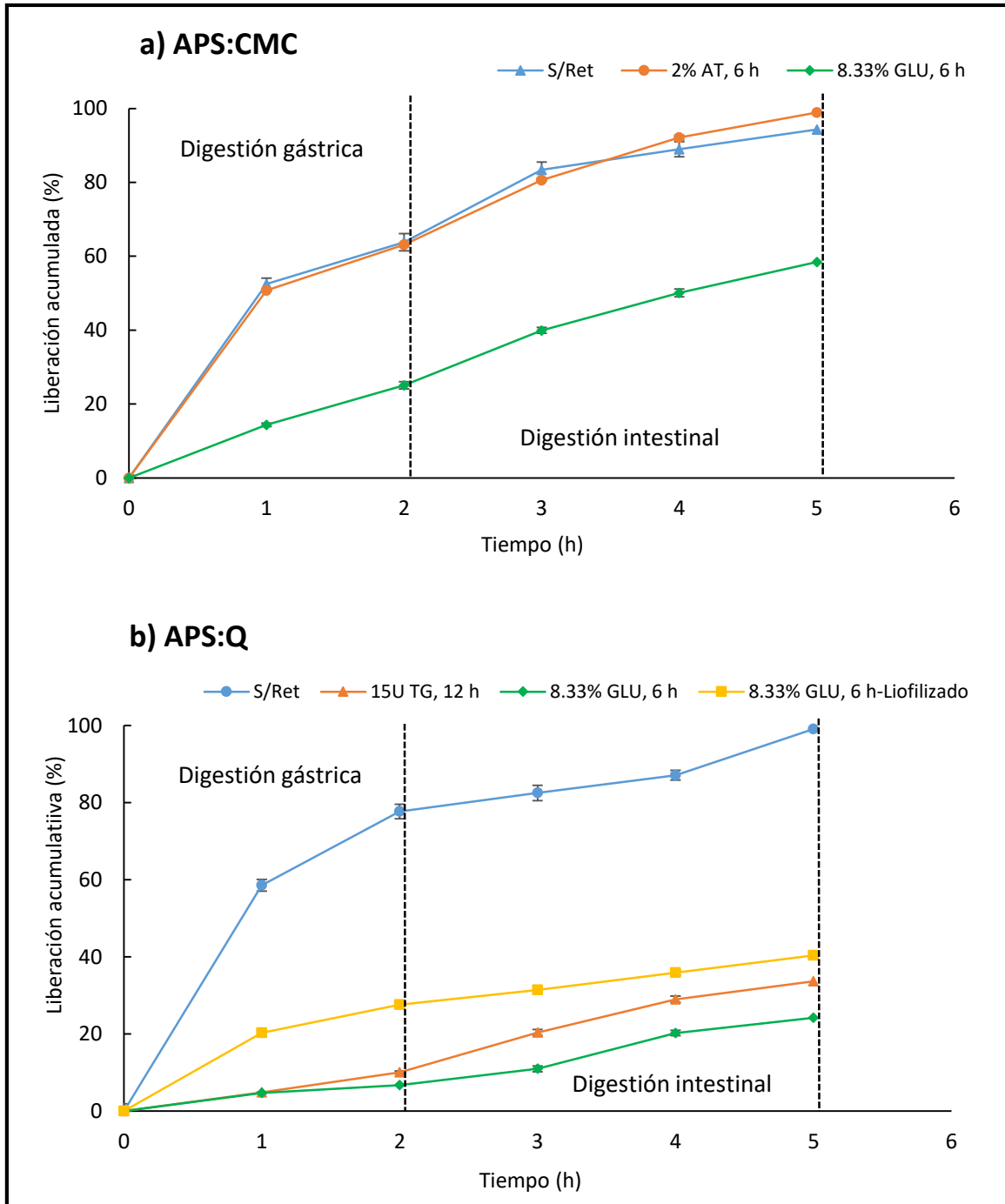


Figura 33. Perfil de liberación de acumulativa de **ácidos grasos omega 3** de microcápsulas: a) Aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) Aislado de proteína de suero de leche:qitosano (APS:Q). S/Ret: sin reticulante; AT: ácido tánico; TG: Transglutaminasa; GLU: glutaraldehído

En el caso de las microcápsulas de APS:CMC reticuladas con ácido tánico (figura 32a y 33a), se puede apreciar que la liberación del agente lipofílico fue prácticamente del 95%, después de 5 h de digestión. La desintegración de las microcapsulas, puede ser causada por la disociación de la pared, por lo que sigue un perfil similar a las microcápsulas sin reticulante; en pH ácido los grupos carboxilo se neutralizan, en consecuencia, la CMC pierde su carga y se separa de la proteína. En pH intestinal el ácido tánico se hidroliza (Zhang *et al.*, 2011), de modo que, el enlace entre el ácido tánico y la proteína se ve fuertemente afectado a esta condición de pH, por lo tanto la pared de las microcápsulas se desintegra por completo permitiendo la liberación de material lipofílico. La figura 32a y 33a muestran una liberación similar con reticulación con ácido tánico o sin ella, lo cual está de acuerdo con Zhang *et al.* (2011), quienes reportan una liberación del 100% del material encapsulado de microcápsulas de gelatina:goma arábica reticuladas con AT al final del proceso de digestión, sin embargo, la liberación fue más lenta comparada con microcápsulas sin reticulante.

En microcápsulas de APS:Q reticuladas con la enzima TG, la liberación de material lipofílico fue lenta a la primer hora de digestión (Figura 32b y 33b), esta incrementó gradualmente, hasta alcanzar una liberación total de 47 y 34% para aceite de bergamota y ácidos grasos omega 3 respectivamente, al final de la digestión. Con este agente reticulante, se logro retardar la liberación del núcleo por más tiempo, lo cual implica que la pared de las microcápsulas toleró mejor la degradación por parte de las enzimas o por la condiciones de pH, sin embargo, no todo el material lipofílico se encuentra biodisponible. En el caso de la muestra de omega 3, las microcápsulas tuvieron poca solubilidad en el medio de digestión formando aglomerados, lo cual dificulta la degradación enzimática (Saravanan & Rao, 2010), como consecuencia, la liberación fue más lenta comparada con las microcápsulas de aceite esencial de bergamota. Respecto al grado de reticulación con la enzima TG hay opiniones divididas, por un lado se argumenta que es eficiente por que la liberación del núcleo es lenta (Zhang *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2008), como lo que sucedió en el presente trabajo, pero por otra parte, hay reportes en los que se

observó que la liberación del núcleo es similar en microcápsulas con y sin reticulación con la enzima (Alvim & Grosso, 2010; Prata *et al.*, 2008). Un factor importante a considerar es la concentración de enzima, la cual difiere entre cada investigación, por lo que se hace difícil tener un mejor panorama de comparación.

Para el caso de la liberación de las microcápsulas reticuladas con GLU (figura 32b y 33b) para el sistema con APS:Q obtenidas por aspersión, esta fue considerablemente lenta, llegando a ser apenas el 20% después de 5 h de digestión, lo cual implica que en la pared de las microcápsulas el grado de reticulación fue mayor y no fácil de digerir. Por una parte se tiene la ventaja de llevar a cabo una liberación sostenida pero con la desventaja de tener baja disponibilidad del material lipofílico. En el sistema de APS:Q la reticulación con glutaraldehído se llevó a cabo a pH 6, mientras que para el sistema con APS:CMC se reticuló a pH 3, estas condiciones de pH son importantes en vista de que de eso depende la intensidad en el grado de reticulación, es decir, con el primer sistema, la liberación fue lenta (liberación total de aceite 20%), mientras que con el segundo, fue en aumento hasta alcanzar el 60% de material lipofílico (figura 32a y 33a), lo cual indica que el reticulado fue menos eficiente.

Para las microcápsulas de aceite esencial de bergamota con APS:Q reticuladas con glutaraldehído que fueron liofilizadas, se observó que estas liberaron 40% de aceite en la primer hora, a pesar de tener un reticulado fuerte, pero debido a que son partículas altamente porosas y al estar en contacto con las enzimas digestivas, se alcanzó una liberación de aceite esencial del 63% al final de la digestión. Como se puede observar en esta muestra, la liberación fue mayor, que con la muestra de APS:Q en las mismas condiciones de reticulación obtenida por secado por aspersión. Saravanan & Rao (2010) reportaron que en partículas de menor tamaño la tasa de liberación es más lenta que en aquellas que tienen mayor tamaño, lo cual concuerda con los resultados de ese trabajo. Por otra parte, las microcápsulas de omega 3 reticuladas con glutaraldehído y liofilizadas, tuvieron una liberación cercana al 40%, lo cual fue menor que con las microcápsulas de aceite esencial de

bergamota a las mismas condiciones, esto probablemente se deba al hecho de que las muestras de omega 3 forman aglomerados, dificultando el proceso de digestión, por lo que se libera bajo porcentaje de aceite encapsulado.

### **7.7 Estabilidad del material lipofílico durante el almacenamiento**

A través de la microencapsulación se puede aumentar la estabilidad de los materiales lipofílicos, lo que significa que este proceso protege a dicho material de la pérdida por evaporación, así como degradación por cambios químicos ocasionados por el medio ambiente (Adamiec & Kalemba, 2006). Para evaluar la estabilidad de los materiales lipofílicos encapsulados con respecto al tiempo, las microcápsulas se almacenaron durante 4 meses en un horno convencional a 30°C en la oscuridad.

La evaluación de la estabilidad, durante el periodo de almacenamiento de los materiales lipofílicos, se realizó para las microcápsulas de aceite esencial de bergamota y de ácidos grasos omega 3, obtenidas por aspersión con los sistemas de APS:CMC (sin reticulante y reticuladas con ácido tánico y glutaraldehído) y APS:Q (sin reticulante y reticuladas con transglutaminasa y glutaraldehído). Para las muestras liofilizadas solo se realizó la estabilidad en las microcápsulas de APS:Q reticuladas con glutaraldehído, esto fue debido a que es la única muestra que se obtuvo en forma de un polvo granular. Para las otras muestras liofilizadas, como se obtuvieron en forma de un bloque sólido, ésta característica permite tener el material lipofílico mejor protegido al limitar el contacto con el oxígeno, pero al ser molido y tamizado para su posible aplicación, se libera la mayor parte de agente lipofílico encapsulado exponiéndolo a la degradación, lo cual implica una gran desventaja sobre las otras muestras, razón por la cual fueron descartadas para realizar los estudios de estabilidad.

### 7.7.1 Estabilidad de las microcápsulas de aceite esencial de bergamota

En la figura 34 se muestran los resultados correspondientes a la estabilidad de microcápsulas de aceite esencial de bergamota, durante el periodo de almacenamiento.

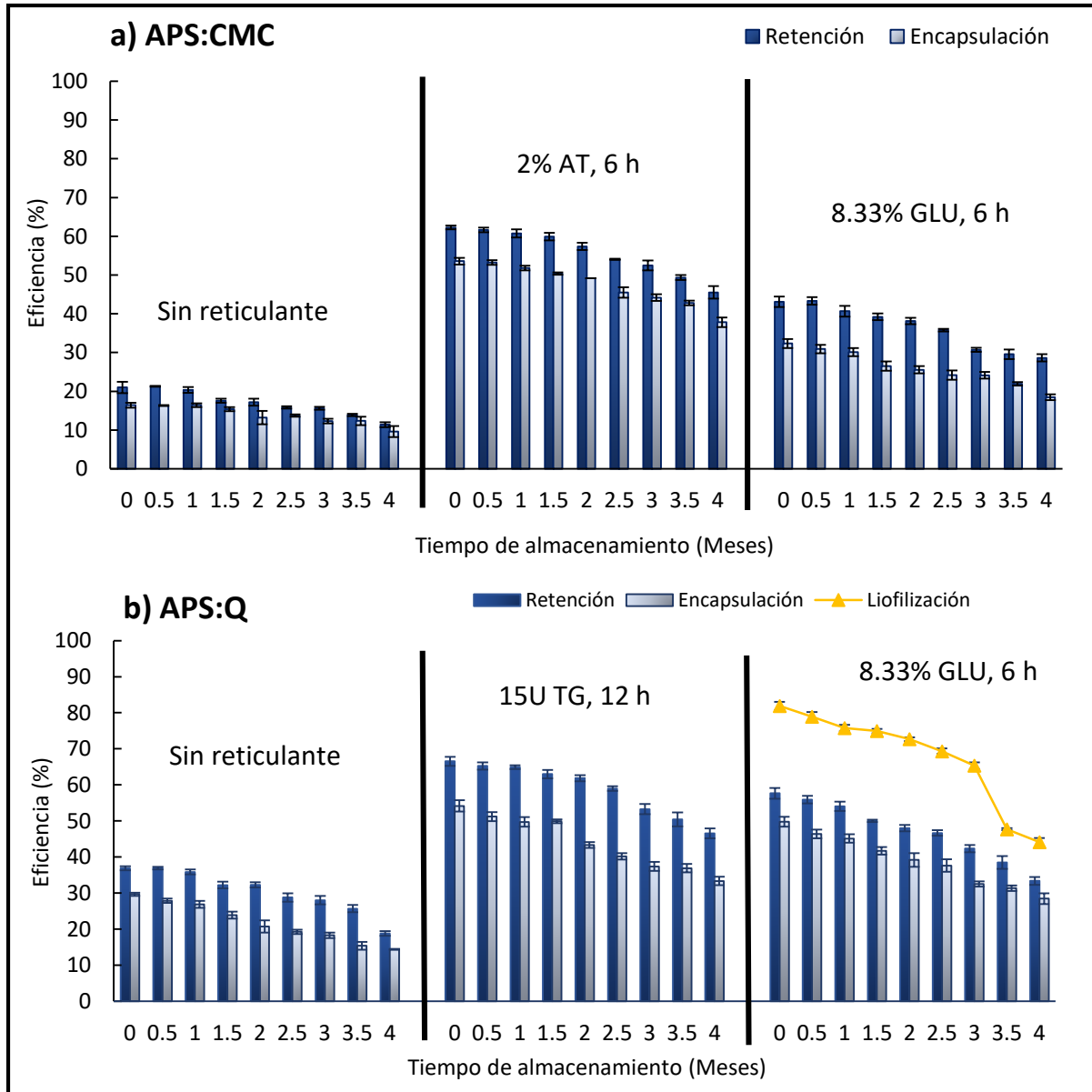


Figura 34. Variación de la eficiencia de retención y encapsulación durante el almacenamiento de microcápsulas de aceite esencial de bergamota: a) Aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) Aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). AT: ácido tánico; TG: Transglutaminasa; GLU: glutaraldehído



Como se puede observar (figura 34a), las microcápsulas de aceite esencial de bergamota secadas por aspersión del sistema APS:CMC, tuvieron una disminución tanto de aceite encapsulado como retenido, siendo menor al 10% en las microcápsulas sin reticulante y de 15% aproximadamente, en las muestras reticuladas con ácido tánico y glutaraldehído. Aunque la pérdida de aceite esencial es mayor en las muestras reticuladas con ácido tánico, que aquellas no reticuladas, al tener inicialmente un mayor contenido de aceite esencial encapsulado (53.5%), se logra mantener mayor porcentaje de aceite encapsulado (38% EE) después de 4 meses de almacenamiento, lo cual representa 4 veces más aceite encapsulado comparado con las microcápsulas sin reticulante, que solo tuvieron el 9.5% de EE al finalizar el almacenamiento. Las microcápsulas reticuladas con glutaraldehído presentaron solo el 18.5% de EE, siendo la mitad de aceite encapsulado comparado con las microcápsulas reticuladas con ácido tánico al final del periodo de almacenamiento, por lo que, el ácido tánico pudo proporcionar menor pérdida de aceite esencial de bergamota.

En figura 34b se puede observar que para las microcápsulas de APS:Q obtenidas por aspersión, en general presentaron una reducción tanto en la ER como en la EE de aproximadamente 20% independientemente del reticulante utilizado o sin el uso de reticulante, sin embargo, las microcápsulas reticuladas con la enzima transglutaminasa obtuvieron una EE al concluir el almacenamiento de 33%, mientras que las microcápsulas sin reticulante presentaron en el mismo periodo una EE de 14%, aun cuando la disminución de aceite esencial fue similar en ambas muestras. Las microcápsulas reticuladas con la enzima preservaron el doble de aceite encapsulado con respecto a las microcápsulas sin reticulante, por lo que, la enzima transglutaminasa ayudó disminuir la difusión del aceite esencial encapsulado hacia la superficie de la cápsula. En lo que respecta a la muestras de APS:Q reticuladas con glutaraldehído obtenidas por aspersión la disminución del porcentaje de aceite encapsulado y retenido fue considerablemente menor (aproximadamente 24 unidades de porcentaje) al final del almacenamiento, que la muestra liofilizada de APS:Q reticulada con glutaraldehído, ya que esta última tuvo

una disminución del porcentaje de encapsulación de aceite esencial, del 82% inicial al 44% al final de los 4 meses de almacenamiento, teniendo una pérdida de aceite esencial de 38 unidades de porcentaje, lo cual representa prácticamente 1.5 veces más reducción, de lo que se obtuvo en la muestra de secado por aspersión. En el caso de las microcápsulas liofilizadas la pérdida de aceite esencial fue mayor, como consecuencia de la estructura porosa que se forma, siendo poco estable durante el almacenamiento, comparada con las muestras obtenidas por aspersión, en donde se obtuvo una estructura de menor porosidad. Resultados similares fueron obtenidos por Yang *et al.* (2014), Peng *et al.* (2014) y Jain *et al.* (2015), teniendo una reducción de más del 60% a 40°C, para microcápsulas reticuladas y liofilizadas de aceite esencial de vainilla, mostaza y  $\beta$ -caroteno, usando como materiales de pared gelatina:goma arábica (GA), GA:Q y APS:GA respectivamente, a los 30 de almacenamiento.

La principal razón de la pérdida de aceite esencial que se tuvo durante el almacenamiento, podría ser por un incremento en la presión de vapor del aceite esencial causado por la temperatura, lo cual incrementó la volatilidad del aceite esencial (Yang *et al.*, 2014). La temperatura es un factor importante en el almacenamiento de materiales termo-sensibles, como los aceites esenciales. La estructura de la microcápsula puede hacer lenta la liberación del núcleo, mientras que la alta temperatura puede acelerar el colapso de la estructura perdiendo material encapsulado (Peng *et al.*, 2014), el cual difundió rápidamente hacia el exterior de la microcápsula. Al formar una pared delgada debido al bajo contenido de sólidos (1%  $w/w$ ), no es suficiente para mantener al material lipofílico atrapado en la matriz de la microcápsula (Rojas *et al.*, 2018). Sin embargo, con el reticulado de la pared, se logra una mayor retención del material lipofílico durante el almacenamiento comparado con las muestras sin reticulante, aunque el porcentaje de disminución es similar en ambos.

### 7.7.1.1 Evaluación de la calidad del aceite esencial de bergamota

En lo que respecta a la calidad del aceite esencial de bergamota, este fue monitoreado por cromatografía de gases, por lo que se pudo conocer el perfil de los principales componentes del aceite esencial, y posteriormente verificar como influye el proceso de encapsulación y el tipo secado sobre ellos.

El aceite esencial de bergamota original destilado se consideró como referencia para compararlo con el aceite esencial encapsulado de los sistemas APS:CMC y APS:Q tanto los obtenidos por secado por aspersión como por liofilización. El análisis se realizó mediante la cuantificación de las áreas de los picos de los principales componentes volátiles contenidos en el mismo. Las áreas se expresan como porcentaje de abundancia para cada componente con respecto al contenido total de componentes volátiles presentes. En el cuadro 11, se observa que el 96.63% representa a los componentes principales, que se utilizaron como estándares, el 3.37% restante son los componentes minoritarios que no se consideraron en este estudio. De acuerdo con la literatura (Celia *et al.*, 2013), la fracción volátil (d-limoneno, linalool, acetato de linalilo, mirceno,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno) representan del 93 – 96%, mientras que la fracción no volátil (cumarinas como el bergamotín y bergapteno) representan del 4 – 7% del contenido total del aceite esencial.

En la figura 35, se observa el cromatograma correspondiente al aceite esencial de bergamota destilado. Como se puede apreciar, el d-limoneno, linalool y el acetato de linalilo, son los terpenos que se encuentran en mayor abundancia, en conjunto representan el 89.5% del aceite total, lo cual corresponde a lo reportado en la literatura, siendo el linalool y el acetato de linalilo los que marcan las notas de sabor de este aceite, así como su calidad (Bagetta *et al.*, 2010).

Cuadro 11. Porcentaje de abundancia de los principales componentes del aceite esencial de bergamota

Componente	Abundancia (%)	Tiempo de retención (min)
$\alpha$ -Pineno	0.635 $\pm$ 0.02	3.955
$\beta$ -Pineno	3.73 $\pm$ 0.01	4.587
d-Limoneno	26.62 $\pm$ 0.13	5.454
Mirceno	0.18 $\pm$ 0.06	5.883
$\gamma$ -Terpineno	1.68 $\pm$ 0.01	6.013
Linalool	26.53 $\pm$ 0.01	7.064
$\alpha$ -Terpineol	0.55 $\pm$ 0.01	8.541
Carvona	0.32 $\pm$ 0.01	9.333
Acetato de linalilo	36.38 $\pm$ 0.23	9.567
Total	96.63	

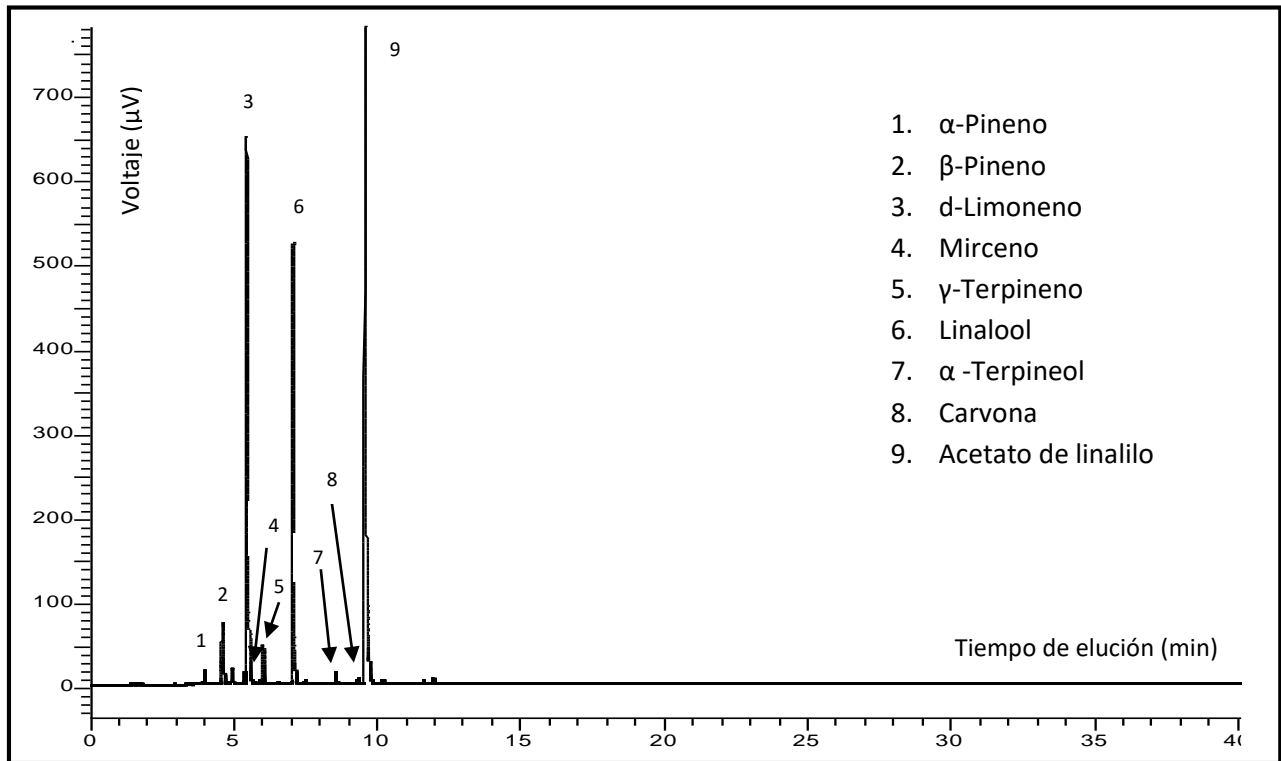


Figura 35. Cromatograma de aceite esencial de bergamota destilado

Los aceites provenientes de cítricos son especialmente vulnerables a la degradación por su alto contenido en d-limoneno (Pudil *et al.*, 1998). En el presente

trabajo se evaluó tanto el porcentaje de carvona como de  $\alpha$ -terpineol como indicadores de la calidad, ya que se reconoce a la carvona como producto de la degradación del d-limoneno (Velázquez *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2018), y al  $\alpha$ -terpineol como producto de la degradación del acetato de linalilo en la oxidación de aceite esencial de bergamota (Kiran & Singh, 2012). En el cuadro 12, se puede observar la variación en el porcentaje de abundancia, de los principales componentes del aceite esencial de bergamota de las microcápsulas de APS:CMC y APS:Q a los 2 y 4 meses de almacenamiento a 30°C.

Para poder tener una mejor apreciación sobre la variación en el porcentaje de abundancia de los principales componentes del aceite esencial de bergamota (d-limoneno, linalool y acetato de linalilo), así como de los productos de oxidación (carvona y  $\alpha$ -Terpineol), se presentan gráficamente en la figura 36 los porcentajes de estos componentes a los 2 y 4 meses de almacenamiento para ambos sistemas. Como solo se presentan 5 componentes del aceite esencial, estos no representan el porcentaje total de abundancia.

Como se puede observar en la figura 36, el d-limoneno y el acetato de linalilo fueron gradualmente degradados durante el periodo de almacenamiento tanto en las muestras sin reticulante como reticuladas de ambos sistemas, sin embargo, la degradación fue mayor en las muestras que no fueron reticuladas, ya que los productos de oxidación,  $\alpha$ -terpineol y carvona, incrementaron hasta en 15 y 5 veces su valor inicial respectivamente, a los 4 meses de almacenamiento. Estas microcápsulas no soportaron la etapa de aspersion, la pared de la microcápsula se rompió, por lo que, no ofreció protección al aceite esencial, como consecuencia la pérdida de estos componentes fue mayor durante el almacenamiento.

Cuadro 12. Variación del % de abundancia de los principales componentes del aceite esencial de bergamota encapsulado durante almacenamiento

Componente	Abundancia (%)						
	APS:CMC			APS:Q			
	Secado por aspersión						Liofilización
	S/Ret	AT 2%, 6 h	GLU 8.33%, 6 h	S/Ret	TG 15U, 12 h	GLU 8.33%, 6 h	GLU 8.33%, 6 h
<b>2 MESES DE ALMACENAMIENTO</b>							
$\alpha$ -Pino	0.05	0.38	0.18	0.16	0	0.24	0.63
$\beta$ -Pino	0.5	2.71	0.89	1.29	0.74	1.75	3.75
Mirceno	2.4	0.32	0.18	1.27	0.2	0.28	0.41
$\gamma$ -Terpino	0.71	1.12	0.86	2.25	0.59	0.48	0.58
d-Limoneno	12.48	20.8	15.9	14.08	11.97	25.94	21.42
Linalool	24.12	26.81	18.90	23.31	14.33	25.52	23.42
Acetato de linalilo	18.73	30.28	28.74	15.41	17.02	21.71	27.35
Carvona	0.62	0.39	0.85	1.05	2.18	1.42	0.93
$\alpha$ -Terpineol	4.81	5.96	9.83	11.10	12.02	6.21	3.51
<b>4 MESES DE ALMACENAMIENTO</b>							
$\alpha$ -Pino	0.39	0.25	0.25	0.16	0.08	0.07	0.42
$\beta$ -Pino	2.02	1.54	1.48	3.29	0.65	3.45	2.08
Mirceno	2.22	1.43	2.16	5.93	3.17	0.55	0.91
$\gamma$ -Terpino	0.78	1.15	1.09	5.41	0.475	0.81	1.02
d-Limoneno	7.86	14.94	13.62	9.47	7.9	21.3	19.80
Linalool	33.81	31.5	30.83	28.84	31.58	31.99	35.10
Acetato de linalilo	13.07	10.12	10.27	3.24	15.69	23.44	15.09
Carvona	1.54	1.4	1.41	13.97	1.51	1.14	1.64
$\alpha$ -Terpineol	8.1	8.73	8.81	10.79	10.71	4.88	8.12

S/Ret: Sin reticulante; AT: Ácido tánico; GLU: Glutaraldehído; TG: Transglutaminasa

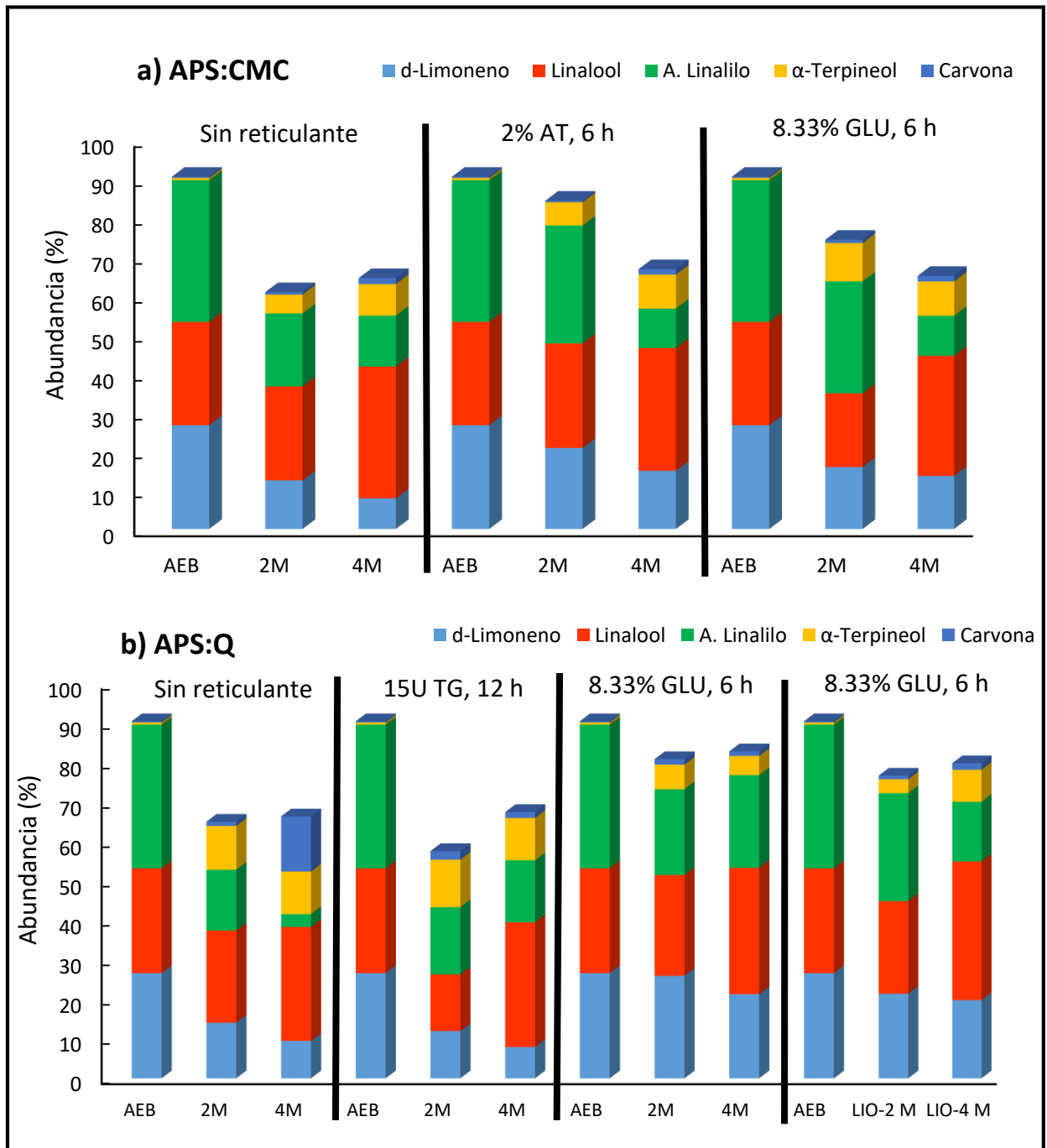


Figura 36. Variación del porcentaje de abundancia de los principales componentes del aceite esencial de bergamota encapsulado (d-limoneno, linalool y acetato de linalilo) y de sus productos de oxidación ( $\alpha$ -terpineol y carvona) a los 2 (2M) y 4 (4M) meses de almacenamiento: a) Aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) Aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). AEB: aceite esencial de bergamota (referencia); AT: ácido tánico; TG: transglutaminasa; GLU: glutaraldehído; LIO: muestra liofilizada y reticulada con GLU

Para el sistema de APS:CMC, en las microcápsulas reticuladas con ácido tánico se observa (figura 36a), que a los 2 meses de almacenamiento el aceite encapsulado fue mejor protegido, posiblemente porque el AT ofrece capacidad antioxidante, lo que contribuyó a disminuir el deterioro, aunque al cabo de 4 meses el porcentaje de acetato de linalilo disminuyó a 10%, el cual se degradó a su correspondiente alcohol (linalool) (Kiran & Singh, 2012), por lo que, el porcentaje de este componente incrementó y afectó la calidad del aceite esencial de bergamota, además se puede apreciar un incremento tanto de carvona como de  $\alpha$ -terpineol de 4 y 16 veces su valor inicial respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos para las microcápsulas reticuladas con GLU, en donde se pudo determinar que independientemente de que la EE obtenida fuera mayor en las microcápsulas reticuladas con AT que con GLU, durante el almacenamiento, la calidad del aceite esencial se afectó en ambas muestras.

Respecto al sistema de APS:Q (figura 36b), las microcápsulas que mejor protección ofrecieron al aceite contra la degradación, fue la reticulada con GLU obtenida por aspersión, al cabo de 4 meses de almacenamiento el porcentaje de abundancia de carvona y  $\alpha$ -terpineol fue de 4.9 y 1.1% respectivamente, mientras que la pérdida de d-limoneno y acetato de linalilo fue de 20 y 40% con respecto al valor inicial en el aceite esencial de bergamota, respectivamente. Como ya se mencionó anteriormente el GLU forma un enlace covalente lo que ayuda a tener un mejor reticulado dando mayor soporte a la pared de la microcápsula. Por otra parte, para la muestra reticulada con la enzima TG, se puede observar que a los 2 meses de almacenamiento tuvo una pérdida del 50% en todos los componentes mayoritarios con respecto al aceite esencial original, por lo que, los productos de oxidación incrementaron 22 y 6 veces el valor inicial para  $\alpha$ -terpineol y carvona respectivamente, sin embargo, de los 2 a los 4 meses de almacenamiento los demás componentes se mantuvieron prácticamente constantes, a excepción del linalool que incrementó hasta un porcentaje de abundancia de 32% como consecuencia del deterioro de acetato de linalilo. Para este sistema al igual que con el de APS:CMC, también se obtuvo una mejor protección del aceite esencial en las



microcápsulas reticuladas con GLU, aunque la EE fue menor a lo obtenido en microcápsulas reticuladas con la enzima TG.

En la figura 37 se muestran para efectos comparativos los cromatogramas obtenidos de aceite esencial de bergamota encapsulado con el sistema APS:Q, de las microcápsulas reticuladas con GLU obtenidas por aspersión y liofilización, a 4 meses de almacenamiento. Como se puede observar, el aceite encapsulado tuvo mayor deterioro en la muestra que fue liofilizada, ya que tanto el d-limoneno como el acetato de linalilo fueron degradados, alcanzando un porcentaje de abundancia de 19.8 y 15% respectivamente, comparado a 21.4 y 25.9% para la muestra de aspersión (cuadro 12). Además, los compuestos de oxidación,  $\alpha$ -terpineol y carvona, tienen un porcentaje de abundancia del 8.1 y 1.6% para la muestra liofilizada, en comparación con 4.9 y 1.1% en la muestra obtenida por aspersión, respectivamente (cuadro 12). El porcentaje de abundancia de linalool (producto intermedio en la oxidación de acetato de linalilo) superó el 30% en ambas muestras. A pesar de que las microcápsulas liofilizadas obtuvieron mayor EE (44%) con respecto a la muestra obtenida por aspersión (28% EE), la calidad del aceite encapsulado se afectó en mayor grado, debido a la estructura porosa que presentan, incluso se observa (figura 37) la formación de nuevos componentes a los 6 y 8 minutos de retención.

Durante el periodo de almacenamiento, existe un cambio importante tanto en la cantidad como en la calidad del aceite esencial encapsulado, por lo que, se debe mejorar este método de coacervación compleja, para formar una pared más resistente que permita mayor protección contra el deterioro.

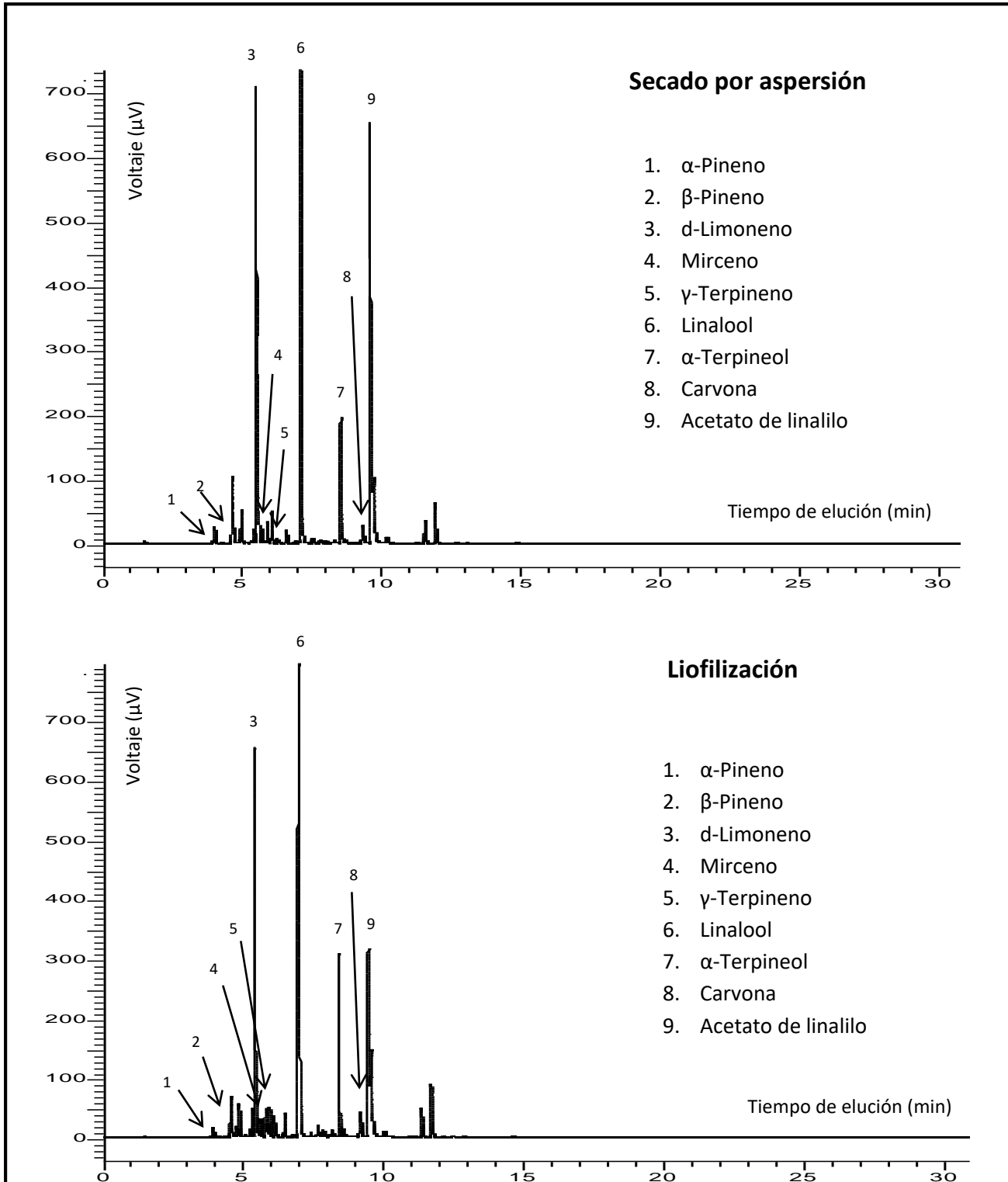


Figura 37. Perfiles de **aceite esencial de bergamota** encapsulado con aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q) reticulado con glutaraldehído a los 4 meses de almacenamiento: a) secado por aspersión y b) liofilización

### 7.7.2 Estabilidad de las microcápsulas de ácidos grasos omega 3

En la figura 38 se muestran los resultados correspondientes a la estabilidad de microcápsulas de ácidos grasos omega 3, durante el periodo de almacenamiento.

Para las microcápsulas de ácidos grasos omega 3 secadas por aspersion, se puede observar (figura 38), que la eficiencia de retención se mantuvo prácticamente constante en ambos sistemas y en cualquier condición de reticulación, debido a que los ácidos grasos omega 3 no son un material volátil como el aceite esencial de bergamota, esta eficiencia permaneció prácticamente sin cambios.

Para las microcápsulas de APS:CMC y APS:Q, se puede apreciar en la figura 38, que a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento, hubo una variación importante en la eficiencia de encapsulación, los ácidos grasos omega 3 pasaron de estar encapsulados a permanecer como aceite superficial (diferencia entre el aceite retenido y encapsulado), debido a la pared delgada de las microcápsulas, se permitió la difusión de los ácidos grasos omega 3, por lo que, fueron acumulándose como aceite superficial. Al final del almacenamiento, las microcápsulas sin reticulante de APS:CMC y APS:Q obtuvieron una EE menor al 10%, sin embargo, el aceite superficial incremento hasta 2.5 veces su valor inicial. Por otra parte, las microcápsulas reticuladas con AT y la enzima TG, alcanzaron una EE de 25 y 36% respectivamente después de 4 meses de almacenamiento, mientras que el porcentaje de aceite superficial incremento poco más de 3 veces su valor inicial. A pesar de que se obtuvo mayor porcentaje de aceite superficial en las microcápsulas reticuladas con respecto a las sin reticulante, las primeras resguardaron mayor EE, de manera que, el agente reticulante ayudó a retardar la difusión de material encapsulado al darle mayor rigidez a la pared de las microcápsulas.

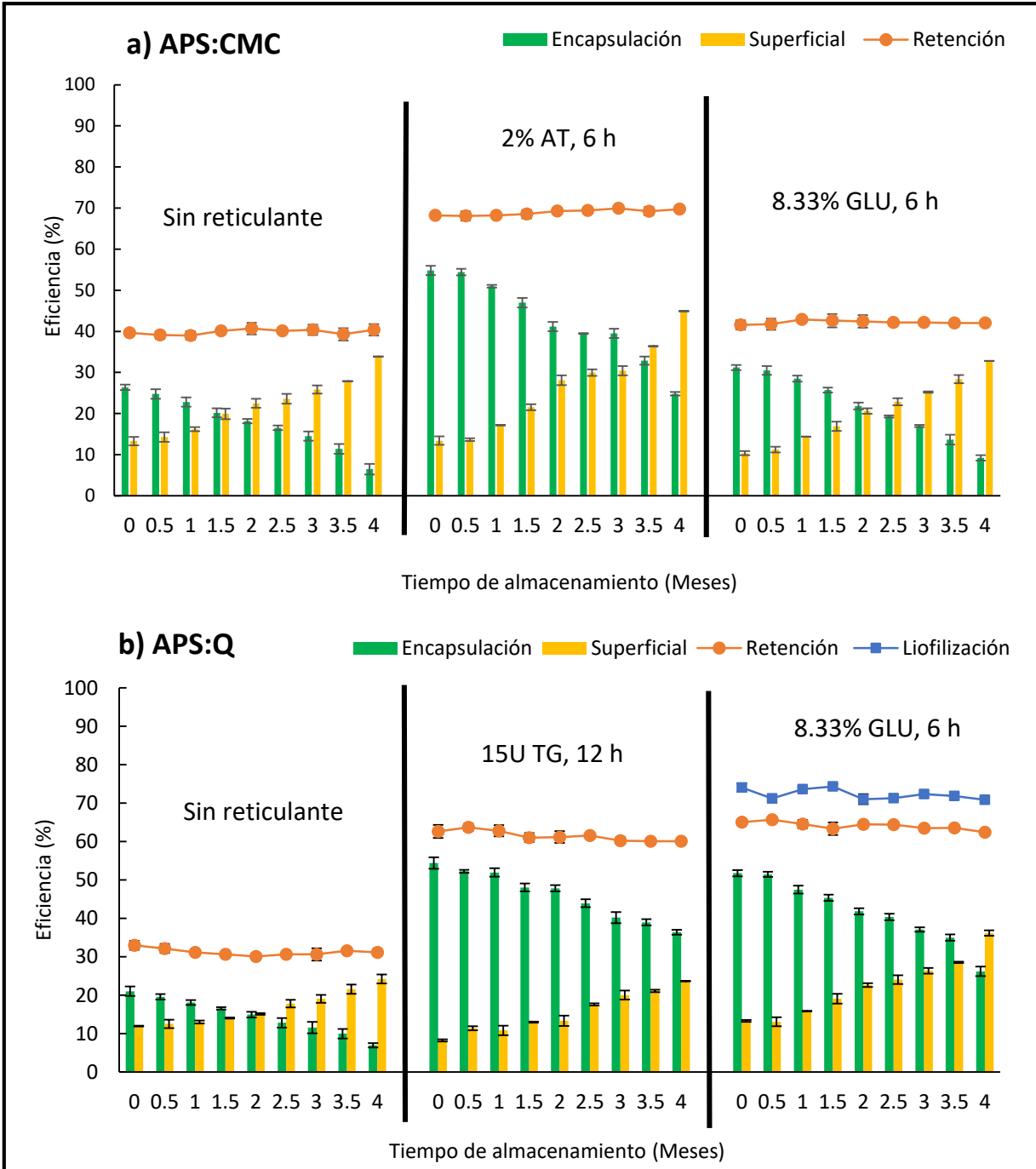


Figura 38. Variación de la eficiencia de retención y encapsulación durante el almacenamiento de microcápsulas de ácidos grasos omega 3: a) Aislado de proteína de suero de leche:carboximetilcelulosa (APS:CMC) y b) Aislado de proteína de suero de leche:quitosano (APS:Q). AT: ácido tánico; TG: Transglutaminasa; GLU: glutaraldehído

Con respecto a las microcápsulas reticuladas con GLU obtenidas por aspersión, tanto de APS:CMC como de APS:Q, se puede observar (figura 38) que la EE fue

cada vez menor conforme paso el tiempo de almacenamiento, siendo la muestra de APS:CMC la que mayor pérdida obtuvo, 3 veces menor que su valor inicial. A los 4 meses de almacenamiento la EE fue de 9 y 26% para APS:CMC y APS:Q respectivamente, nuevamente se puede corroborar que la reticulación con GLU a pH ácido no es eficiente (sistema APS:CMC).

Para la muestra liofilizada de APS:Q reticulada con GLU (figura 38b), la EE prácticamente no varió, sin embargo, con el paso del tiempo la muestra dejó de ser un polvo granular para dar lugar a la formación de grandes aglomerados, posiblemente por la difusión de material lipofílico a la superficie.

#### **7.7.2.1 Evaluación de la calidad de los ácidos grasos omega 3**

Para determinar la calidad química de los ácidos grasos omega 3 se evaluó el índice de peróxido (IP) y el índice de yodo (IY), sólo del material que se encontraba encapsulado, ya que es el único que realmente estaba protegido por la pared de la microcápsula, de tal manera que, permita saber que tan protegido se encontraba este aceite.

En el cuadro 13 se presentan los valores correspondientes de IY y del IP a los 2 y 4 meses de almacenamiento, para los ácidos grasos omega 3 de todas las microcápsulas evaluadas.

En un inicio los ácidos grasos omega 3, tenían un IY y IP de 140 y 5 meq respectivamente (Cuadro 13), de acuerdo con la NMX-F-152-S-1981, el aceite de pescado presenta un IY mayor a 120 debido a sus dobles enlaces.

Cuadro 13. Estabilidad química de las microcápsulas de ácidos grasos omega 3

Muestra		Índice de yodo (IY) g/100 g	Índice de peróxido (IP) meq/ Kg aceite			
Ácidos grasos omega 3 (inicial)		140	5			
<b>SECADO POR ASPERSIÓN</b>						
		2 meses	4 meses	2 meses	4 meses	
APS:CMC	Sin reticulante	56.48 ±0.35	13.07 ±0.01	9.51 ±0.83	34.61 ±1.89	
	2% AT, 6 h	57.53 ±0.53	27.71 ±0.02	9.00 ±0.14	22.43 ±0.10	
	8.33% GLU, 6 h	68.23 ±0.01	29.97 ±0.23	7.68 ±0.93	24.66 ±0.45	
APS:Q	Sin reticulante	56.34 ±0.35	17.94 ±0.01	7.87 ±0.39	27.18 ±0.27	
	15U TG, 12 h	56.83 ±0.05	28.32 ±0.17	6.93 ±0.38	19.64 ±0.48	
	8.33% GLU, 6 h	66.63 ±0.01	26.01 ±0.49	11.34 ±0.86	25.16 ±0.79	
<b>LIOFILIZACIÓN</b>						
APS:Q	8.33% GLU, 6 h	55.74 ±1.48	5.04 ±0.93	13.26 ±0.12	38.12 ±2.15	

Como se puede observar en el cuadro 13, durante los 2 primeros meses de almacenamiento el IY del material encapsulado, disminuyó más del 50% con respecto a su valor inicial, en todas las muestras almacenadas, lo cual indica que hubo deterioro en la calidad de los ácidos grasos omega 3. A los 4 meses de almacenamiento el IY fue considerablemente bajo en las microcápsulas sin reticulante tanto de APS:CMC como de APS:Q, cuyos valores fueron de 13 y 17.9 respectivamente, como consecuencia del proceso oxidativo. Para las microcápsulas reticuladas con AT y GLU del sistema APS:CMC, así como las microcápsulas reticuladas con la enzima TG y GLU del sistema APS:Q, los valores de IY se encontraron entre 26 a 30 aproximadamente, al cabo de 4 meses de almacenamiento. Aun cuando se puede determinar que la calidad de los ácidos grasos omega 3 se afectó debido a la susceptibilidad que tienen sus dobles enlaces a la oxidación, la reticulación ayudó a retardar la oxidación con respecto a las microcápsulas sin reticulante.

Los peróxidos son los responsables del mal olor y sabor, así como pérdida nutricional de los ácidos grasos omega 3 (Liu *et al.*, 2010). Como se puede observar en el cuadro 13, a los 2 meses de almacenamiento el IP se incrementó prácticamente el doble con respecto al valor inicial (5 meq), mientras que a los 4 meses de almacenamiento, la rancidez de los ácidos grasos fue más evidente con los elevados valores de IP obtenidos, de 27 y 34 meq para las microcápsulas sin reticulante de APS:Q y APS:CMC, mientras que en las microcápsulas reticuladas el IP se encontró entre 19 a 25 meq. Aun cuando el reticulante disminuye el deterioro oxidativo comparado con las microcápsulas sin reticulante, este debe ser mejorado, ya que la pared no es lo suficientemente gruesa o impermeable para darle mejor protección a este tipo de material.

En lo que respecta a las microcápsulas liofilizadas de APS:Q reticuladas con GLU, presentaron mayor oxidación con respecto a las muestras de aspersion, al cabo de 4 meses de almacenamiento el IY y IP fue de 5 y 38 meq. Como se mencionó anteriormente estas microcápsulas formaron aglomerados debido a la difusión del aceite hacia la superficie, y como consecuencia, se encontró más expuesto a ser oxidado. De acuerdo a Eratte *et al.* (2015), la estabilidad oxidativa en microcápsulas coacervadas secadas por aspersion, es mejor que en las microcápsulas coacervadas liofilizadas, aun cuando se usaron temperaturas más altas en el secado por aspersion; la posible razón puede ser atribuida a la estructura compacta en las microcápsulas obtenidas por aspersion, por el contrario, la morfología porosa que tienen las muestras liofilizadas, facilita el acceso de oxígeno al interior de los polvos y se acelera el deterioro del material lipofílico (Kaushik *et al.*, 2014).

En la literatura se ha reportado que las microcápsulas coacervadas ofrecen mejor estabilidad oxidativa durante el almacenamiento, por ejemplo, microcápsulas de aceite de linaza formadas con gelatina:goma arábica (G:GA), fueron más estables por un periodo de 25 días a temperatura ambiente que el aceite sin encapsular, con IP de 10 y 20 meq, respectivamente (Liu *et al.*, 2010); de la misma forma, microcápsulas de aceite de semilla de amapola formadas con G:GA, fueron más

estables por 40 días a 40°C, con un IP de 25 meq contra 250 meq que tuvo el aceite sin encapsular al final del almacenamiento (Yang *et al.*, 2015).

Como se puede apreciar de los resultados anteriores, el método de microencapsulación por coacervación compleja ofrece mejor protección contra el deterioro oxidativo si las microcápsulas son reticuladas, sin embargo, no es suficiente para mantener intacta la calidad del material lipofílico, por lo que se podría incrementar la relación núcleo:material de pared, así como optimizar las condiciones de reticulación para retardar la oxidación, al tratar de generar una pared más gruesa y resistente.



## 8 CONCLUSIONES

- ❖ La mejor eficiencia de encapsulación obtenida en microcápsulas en suspensión de aceite esencial de naranja por coacervación compleja fue de 94, 88 y 91% utilizando los sistemas APS:CMC, APS:AS y APS:Q, con relación núcleo:pared 1:2.
- ❖ El tipo de reticulante empleado tiene efecto en la eficiencia de encapsulación. Las microcápsulas coacervadas y reticuladas con los diferentes agentes tuvieron una rigidez parcial de la pared, por lo que algunas de ellas fueron fracturadas durante el secado por aspersion existiendo pérdida del material lipofílico, lo que disminuyó la eficiencia de encapsulación.
- ❖ Las microcápsulas coacervadas y liofilizadas, tienen eficiencias de encapsulación mayores (80%) con y sin agente reticulante, por lo que la eficiencia de encapsulación, depende más del material de pared, que del tipo de reticulante. Sin embargo, al obtenerse un bloque compacto, requiere molienda para su uso, lo que influye en la EE.
- ❖ La liofilización es un secado menos agresivo para las microcápsulas coacervadas, sin embargo, es un proceso de mayor costo económico y tiempo de operación. El secado por aspersion tiene mayor ventaja, ya que reduce el costo y el tiempo de operación para la obtención del material seco, en donde si bien se perdió algo de material lipofílico, hay muestras en las que se llegó a obtener hasta un 50% de EE y 62% de ER aproximadamente, mejorando un 400% con respecto a las muestras sin reticulante. Estas muestras fueron: el sistema APS:CMC con el reticulante AT al 2% por 6 h de reticulación y para el sistema APS:Q la enzima TG con 15U por 12 h de reticulación.

- ❖ Aunque el estudio de los diferentes agentes reticulantes se aplicó exitosamente a otros materiales lipofílicos (aceite esencial de bergamota y ácidos grasos omega 3), es necesario ajustar la relación núcleo:pared en función del material lipofílico, para los ácidos grasos omega 3, ya que las microcápsulas de estos tienen tendencia a aglomerarse.
- ❖ Durante la digestión *in vitro* se pudo observar que las microcápsulas reticuladas con la TG tiene una liberación gradual del material lipofílico en comparación con las obtenidas sin reticulante, que sufren degradación de la pared tanto por las condiciones de pH como por las enzimas digestivas. Aunque la liberación de las microcápsulas reticuladas con TG fue lenta, fue ligeramente mayor que las reticuladas con glutaraldehído, sin embargo, la primera puede ser una alternativa más segura al no presentar problemas de toxicidad.
- ❖ Durante la etapa de almacenamiento a 30°C, se presentó pérdida de aceite esencial de bergamota, afectando la eficiencia de retención y encapsulación debido a su volatilidad. Si bien la pérdida es mayor en microcápsulas reticuladas, estas obtuvieron al final mayor EE de 38 y 33% con AT y TG para el sistema APS:CMC y APS:Q comparada con las muestras sin reticulante que fue de 10 y 14% respectivamente. La muestra liofilizada alcanzó una disminución de 38% como consecuencia de la estructura porosa que posee. Para las muestras de omega 3, la EE disminuyó y la cantidad de aceite superficial incrementó exponiéndolo al deterioro.
- ❖ La calidad del aceite esencial de bergamota como de ácidos grasos omega 3 se afectó considerablemente durante el almacenamiento, teniendo degradación importante sobre los componentes principales de estos materiales lipofílicos, siendo mayor en las muestras sin reticulante y liofilizadas.

## CONCLUSIÓN GENERAL

La coacervación compleja es un método que permite proteger adecuadamente materiales lipofílicos con alta eficiencia de encapsulación. Al reticular las microcápsulas se pudo dar mayor soporte y rigidez, sin embargo, no fue suficiente para proteger por completo el material lipofílico durante la etapa de secado, así como de la pérdida por degradación durante el tiempo de almacenamiento. Por lo que, es necesario reforzar la pared de las microcápsulas modificando las condiciones de reticulación (concentración y tiempo), así como aumentando la relación pared:núcleo para obtener mayor protección a la oxidación. Esto permitirá hacer más eficiente el secado por aspersion, siendo este método una alternativa competitiva a la liofilización, con la ventaja de proporcionar polvos fluidos de menor porosidad en menor tiempo y costo de operación.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Adamiec J, Kalembe D. 2006. Analysis of microencapsulation ability of essential oils during spray drying. *Drying Technology*, **24**: 1127–1132.
- Aguilera JM, Lillford PJ. 2007. *Food materials science: principles and practice*. Springer, New York. Pp. 577–587.
- Alvim I, Grosso R. 2010. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 4:1069-1076.
- Arab-Tehrany E, Jacquot M, Gaiani C, Imran M, Desobry S, Linder M. 2012. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Food Science & Technology*, **25**: 24-33.
- Aryee F, Nickerson M. 2012. Formation of electrostatic complexes involving mixtures of lentil protein isolates and gum Arabic polysaccharides. *Food Research International*, **48**:520-527.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2000. *Official methods of analysis*, 17th edn. USA.
- Bagetta G, Morrone L, Rombolá L, Amantea D, Russo R, Berliocchi L, Sakurada S, Sakurada T, Rotiroti D, Corasaniti M. 2010. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*, **81**:453-461.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46**:446-475.
- Balange A, Benjakul S. 2009. Effect of oxidized phenolic compounds on the gel property of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi. *Food Science and Technology*, **42**: 10559-1064.
- Barbosa GV. 2005. *Food powders: physical properties, processing, and functionality*. Kluwer academic, USA. Pp. 199–210.
- Barrow C, Nolan C, Jin Y. 2007. Stabilization of highly unsaturated fatty acids and delivery into foods. *Lipid Technology*. **19**: 108-111.

- Barrow C, Nolan C, Holub B. 2009. Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. *Journal of Functional Foods*, **1**:38-43.
- Berger RG. 2007. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Germany. Pp. 439–445.
- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N, Rubini K. 2002. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*, **23**:4827-4832.
- Butstraen C, Salaün F. 2014. Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum arabic and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **9**:608-616.
- Bouyer E, Mekhloufi G, Le Potier I. 2011. Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by  $\beta$ -lactoglobulin and gum arabic. *Journal of Colloid and Interface Science*, **354**: 457–477.
- Calderón-Oliver M, Pedroza-Islas R, Escalona-Buendía H, Pedraza-Chaverri J, Ponce-Alquicira E. 2017. Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract. *Food Hydrocolloids*, **62**:49-47.
- Cárdenas-Bailón F, Osorio-Revilla G, Gallardo-Velázquez T. 2014. Microencapsulation of insulin using a W/O/W double emulsion followed by complex coacervation to provide protection in the gastrointestinal tract. *Journal of Microencapsulation*, **32**:308-316.
- Celia C, Trapasso E, Locatelli M, Navarra M, Ventura C, Wolfram J, Carafa M, Morittu V, Britti D, Di Marcio L, Paolino D. 2013. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **112**:548-553.
- Chang P, Gupta R, Timilsena Y, Adhikari B. 2016. Optimisation of the complex coacervation between canola protein isolate and chitosan. *Journal of Food Engineering*, **191**: 58-66.
- Chen Q, McGillivray D, Wen J, Zhong F, Quek S. 2013. Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins. *Journal of Food Engineering*, **117**:505-512.
- Cole G, Ma Q, Frautschy S. 2009. Omega-3 fatty acids and dementia. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acid, **81**:213-221.

- Comunian T, Thomazini M, Gouvêa A, Eustáquio F, Carvalho J, Favaro C. 2013. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. *Food Research International*, **52**:373-379.
- Coronado M, Vega S, Gutiérrez R, García B, Díaz G. 2006. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. *UAM*, **25**:72-79.
- Costa de Conto L, Ferreira C, Guaraldo L. 2013. Chemometry as applied to the production of omega-3 microcapsules by complex coacervation with soy protein isolate and gum arabic. *Food Science and Technology*, **53**:218-224.
- Deveci SS, Basal G. 2009. Preparation of PCM microcapsules by complex coacervation of silk fibroin and chitosan. *Colloid Polymers Science*, **287**: 1455–1467.
- Dickinson E. 2008. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. *Soft matter*, **4**:932-942.
- Dong Z, Xia S, Hua S, Hayat K, Zhang X, Xu S. 2008. Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. *Colloids and Surfaces*, **63**:41-47.
- Dong Z, Ma Y, Hayat K. 2011. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *Journal of Food Engineering*, **104**: 455–460.
- Eratte D, McKnight S, Gengenbach TR, Dowling K, Barrow CJ, Adhikari BP. 2015. Co-encapsulation and characterization of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, **19**: 882-892.
- Estevinho B, Rocha F, Santos L, Alves A. 2013. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications- A review. *Food Science and Technology*, **31**:138-155.
- Etherton K, Harris W, Appel L. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Nutrition Committee, Circulation*, **106**:247-2757.
- Fernandes LP, Turatti IC, Lopes NP. 2008. Volatile retention and antifungal properties of spray dried microparticles of *Lippia sidoides* essential oil. *Drying Technology*, **26**: 1534–1542.

- Figuerola MC, Morel MH, Surget A, Asther M, Moukha S, Sigoillot JC, Rouau X. 1999. Attempt to crosslink feruloylated arabinoxylans and proteins with a fungal laccase. *Food Hydrocolloids*, **13**: 65-71.
- Flores F, Singh R, Kerr W, Pegg R, Kong F. 2014. Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, **153**: 272-278.
- Fuguet E, Platerink C, Janssen H. 2007. Analytical characterization of glutardialdehyde cross-linking products in gelatin-gum Arabic complex coacervates. *Analytica Chimica Acta*, **604**:45-53.
- Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. 2007. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, **40**:1107-1121.
- Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal Food Science*, **50**: 213–224.
- Huang Y, Cheng Y, Yu C, Tsai T, Cham T. 2007. Microencapsulation of extract containing shikonin using gelatin-acacia coacervation method: A formaldehyde-free approach. *Colloids and Surfaces*, **58**:290-297.
- Huang G, Sun Y, Xiao J, Yang J. 2012. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry*, **135**:534-539.
- Ilyasoglu H, Nehir S. 2014. Nanoencapsulation of EPA/DHA with sodium caseinate-gum arabic complex and its usage in the enrichment of fruit juice. *Food Science and Technology*, **56**:461-468.
- Imeson A. 2009. *Food stabilizers, thickeners and gelling agents*. Wiley Blackwell, USA. Pp. 21–23.
- Haypek E, Silva L, Batista E, Marquez D, Meireles M, Meireles A. 2000. Recovery of aroma compounds from orange essential oil. *Journal of Chemical Engineering*, **17**:4–7.
- Jain A, Thakur D, Ghoshai G, Katare OP, Shivhare US. 2015. Microencapsulation by complex coacervation using whey protein isolates and gum Arabic: an approach to preserve the functionality and controlled release of  $\beta$ -carotene. *Food Bioprocess Technol*, **8**:1635-1644.

- Jafari SM, Assadpoor E, He Y, Bhandari B. 2008. Encapsulation efficiency of food flavors and oils during spray drying. *Drying Technology*, **26**: 816–835.
- Jiménez-Alvarado R, Beristain C, Medina-Torres L, Román-Guerrero A, Vermon-Carter E. 2009. Ferrous bisglycinate content and release in  $W_1/O/W_2$  multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*, **23**:2425-2433.
- Jun-xia X, Hai-yan Y, Jian Y. 2011. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein/gum arabic. *Food Chemistry*, **125**:1267–1272.
- Karaca A, Nickerson M, Low N. 2013. Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. *Food Chemistry*, **139**:448-457.
- Kashappa GH, Park HJ. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, **23**: 1361–1394.
- Kaushik P, Dowling K, Barrow C, Adhikari B. 2014. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. *Journal of Functional Foods*, **50**:1-14.
- Kiran G, Singh B. 2012. Characteristics variation of lavender oil produced by different hydrodistillation techniques. *Quality control & standardization*, **8**: 122-136.
- Klaypradit W, Huang Y. 2008. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *Food Science and Technology*, **41**:1133-1139.
- Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, Decker E, Julian D. 2006. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food research international*, **39**:449-467.
- Koupantsis T, Pavlidou E, Paraskevopoulou A. 2016. Glycerol and tannic acid as applied in the preparation of milk proteins-CMC complex coacervates for flavor encapsulation. *Food Hydrocolloids*, **57**: 62-71.
- Koupantsis T, Pavlidou E, Paraskevopoulou A. 2014. Flavour encapsulation in milk proteins-CMC coacervate-type complexes. *Food Hydrocolloids*, **37**:134-142.



- Kralovec J, Zhang S, Zhang W, Barrow C. 2012. A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chemistry*, **131**:639-644.
- Kruif C, Weinbreck F, Vries R. 2004. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Colloid and Interface Science*, **9**:340-349.
- Kumar S. 2006. *Functional coatings: by polymer microencapsulation*. Weinheim, Germany. Pp. 12–25.
- Lee AC, Hong YH. 2009. Coacervate formation of  $\alpha$ -lactoalbumin-chitosan and  $\beta$ -lactoglobulin-chitosan complexes. *Food Research International*, **42**:733-738.
- Leclercq S, Harlander K, Reineccius G. 2009. Formation and characterization of microcapsules by complex coacervation with liquid or solid aroma cores. *Flavour and Fragrance Journal*, **24**:17-24.
- Lemetter C, Meeuse F, Zuidam N. 2009. Control of the morphology and the size of complex coacervate microcapsules during scale up. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, **55**:1487-1496.
- Liu S, Low H, Nickerson M. 2010. Entrapment of flaxseed oil within gelatin-gum Arabic capsules. *Oil Chemistry*, **87**:809-815.
- Luo Q, Boom RM, Janssen AEM. 2015. Digestion of protein gels in simulated gastric environment. *Food Science and Technology*, **63**: 161-168.
- Lv Y, Zhang X, Abbas S, Karangwa E. 2012. Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule. *Journal of Food Engineering*, **111**:225-233.
- Lv Y, Yang F, Li X, Zhang X, Abbas S. 2014. Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum Arabic based complex coacervation. *Food Hydrocolloids*, **35**:305-314.
- Martín A, Varona S, Navarrete A, Cocero MJ. 2010. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *Chemical Engineering Journal*, **4**: 31–41.

- Mendanha B, Molina S, Favaro C, Mauri A. 2009. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, **42**:1099–1104.
- Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S. 2014. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food function*, **5**: 1113-1124.
- Morais A, Alencar Ê, Júnior F, Oliveira C, Marcelino H, Barralt G, Fessi H, Sócrates E, Elaissari A. 2016. Freeze-drying of emulsified system: A review. *Journal of Pharmaceutics*, **508**: 102 – 114.
- Motoki M, Seguro K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Food Science and Technology*, **9**:204-210.
- NMX-F-152-S-1981. Alimentos para humanos. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del índice de yodo por el método de wijs. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- Ocak B. 2012. Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. *Journal of Environmental Management*, **100**: 22-28.
- Peng C, Zhao S, Zhang J, Huang G, Chen L, Zhao F. 2014. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. *Food Chemistry*, **165**:560-568.
- Pernice R, Borriello G, Ferracane R, Borrelli R, Cennamo F, Ritieni A. 2009. Bergamot: A source of natural antioxidants for functionalized fruit juices. *Food Chemistry*, **112**: 545-550.
- Prata A, Grosso C. 2015 (a). Production of microparticles with gelatin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **116**:292-299.
- Prata A, Grosso C. 2015 (b). influence of the oil phase on the microencapsulation by complex coacervation. *J Am Oil Chem Soc*, **92**:1063-1072.
- Prata A, Zanin M, Ré M, Grosso C. 2008. Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatin-gum arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil. *Colloids and Surface: Biomaterials*, **67**:171-178.

- Pudil F, Volfvod J, Janda V, Valentovd H, Pokomv J. 1998. Effect of rosemary and 1,4-dihydropyridines on oxidative and flavour changes of bergamot oil. *Food Flavors: Formation, Analysis and Packaging Influences*. Elsevier Science B.V. 679-687.
- Reineccius G. 2004. The spray drying of food flavors. *Drying Technology*, **22**: 1289-1324.
- Reineccius GA. 1994. Flavor manufacturing. In *source book of flavors*. 2<sup>a</sup> Edition. Chapman and Hall, New York. Pp. 572–576.
- Rojas-Moreno Sandra, Cárdenas-Bailón Fernando, Osorio-Revilla Guillermo, Velázquez-Gallardo Tzayhrí, Proal-Nájera José. 2018. Effects of complex coacervation-spray drying and conventional spray drying on the quality of microencapsulated orange essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **12**: 650-660.
- Russo R, Ciociaro A, Berliocchi L, Gilda M, Cassiano V, Rombolá L, Ragusa S, Bagetta G, Blandini F, Corasaniti M. 2013. Implication of limonene and linalyl acetate in cytotoxicity induced by bergamot essential oil in human neuroblastoma cells. *Fitoterapia*, **89**:48-57.
- Santos M, Bozza F, Thomazini M, Favaro-Trindade C. 2015. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. *Food Chemistry*, **171**:32-39.
- Saravanan M, Rao K. 2010. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, **80**:808-816.
- Schmitt C, Turgeon S. 2010. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Colloid and Interface Science*, **15**:136-146.
- Serfert Y, Drusch S, Schwarz K. 2009. Chemical stabilization of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenization, microencapsulation and storage. *Food Chemistry*, **113**:1106-1112.
- Shenvi S, Ismail A, Isloor A. 2014. Preparation and characterization study of PPEES/chitosan composite membrane crosslinked with tripolyphosphate. *Desalination*, **344**:90-96.

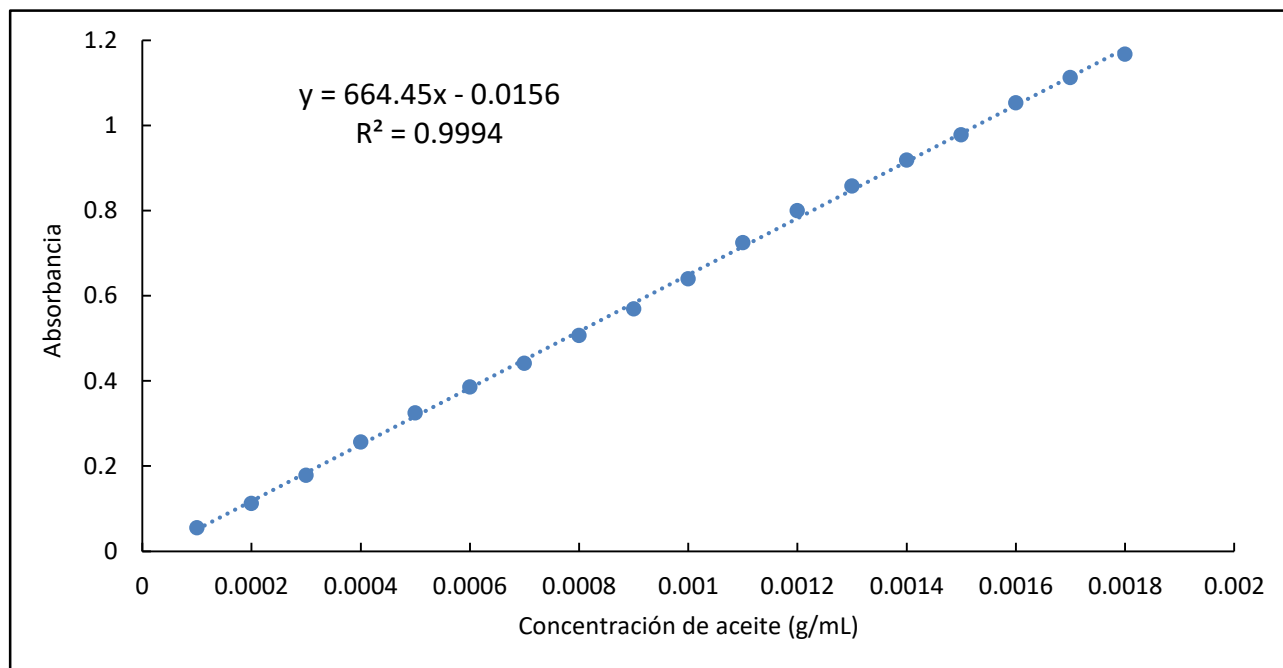
- Smith J, Charter E. 2010. Functional food product development. Blackweel publishing, USA. Pp. 80–91.
- Smith C, William L. 2008. Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases. *Trends in Biochemical Sciences*, **33**:24-37.
- Sontrop J, Campbell M. 2006.  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids and depression: A review of the evidence and a methodological critique. *Preventive Medicine*, **42**:4-13.
- Strauss G, Gibson S. 2004. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as foods ingredients. *Food Hydrocolloids*, **18**:81-89.
- Tang X, Pikal M. 2004. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm. Res.* **21**:191-200.
- Thies C. 1995. How to make microcapsules. Lecture and laboratory manual, Sant Louis. Pp. 1-43.
- Thimma RT, Tammishetti S. 2003. Study of complex coacervation of gelatin with sodium carboxymethyl guar gum: microencapsulation of clove oil and sulphamethoxazole. *Journal of Microencapsulation*, **20**: 203–210.
- Tisserand R, Young R. 2014. Essential oils composition. Essential oil safety (Second edition). Book chapter 2, Pp. 5-22.
- Turgeon S, Laneville S. 2009. Protein-polysaccharide coacervates and complexes: from scientific background to their application as functional ingredients in food products. Dairy research center and institute of nutraceutical and functional foods. Laval University, Canada. Pp. 327–330.
- Valencia E, Ignacio I, Sosa E, Bartolomé M, Martínez H, Garcia M. 2017. Polyphenols: antioxidant and toxicological properties. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, **16**:15-29.
- Valenzuela R, Tapia G, González M, Valenzuela A. 2011. Omega-3 fatty acids (EPA and DHA) and its application in diverse clinical situations. *Revista chilena de nutrición*, Vol. 38, No. 3, Pp. 356-367.
- Velázquez C, Osorio G, Gallardo T. 2014. Encapsulation of orange essential oil in a spout fluid bed dryer with a draft tube on a bed of inert solids. *Drying Technology*, **32**:47-41.

- Victoria F, Anversa R, Savegnago L, Lenardão E. 2013. Essential oil of *E. uniflora* leaves protect liver injury induced by acetaminophen. *Food Bioscience*, **4**:50-57.
- Wang W, Chen M, Chen G. 2012. Issues in freeze drying of aqueous solutions. *Chin. J. Chem. Eng.* **20**:551-559.
- Wang B, Adhikari B, Barrow C. 2014. Optimization of the microencapsulation of tuna oil in gelatin-sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food Chemistry*, **158**:358-365.
- Weinbreck F, Minor M, Kruif G. 2004. Microencapsulation of oils using whey protein and gum arabic coacervates. *Journal of Microencapsulation*, **21**: 667–679.
- Wille J, 2006. Skin delivery systems: transdermals, dermatologicals, and cosmetic actives. Blackwell publishing, USA. Pp. 173–176.
- Wu K, Chai X, Chen Y. 2005. Microencapsulation of fish oil by simple coacervation of hydroxypropyl methylcellulose. *Chinese Journal of Chemistry*, **23**:1569-1572.
- Xing F, Cheng G, Yang B, Ma I. 2004. Microencapsulation of Capsaicin by the Complex Coacervation of Gelatin, Acacia and Tannins. *Journal of Applied Polymer Science*, **91**: 2669 – 2675.
- Yang X, Gao N, Hu L, Li J, Sun Y. 2015. Development and evaluation of novel microcapsules containing poppy-seed oil using complex coacervation. *Journal of Food Engineering*, **161**: 87 – 93.
- Yang Z, Peng Z, Li J, Li S, Kong L, Li P, Wang Q. 2014. Development and evaluation of novel flavour microcapsules containing vanilla oil using complex coacervation approach. *Food Chemistry*, **145**:272-277.
- Yáñez J, Salazar J, Chaires L, Jiménez J, Márquez M, Ramos E. 2005. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Departamento de biotecnología y bioingeniería del CINVESTAV. Avance y perspectiva, **21**: 24–30.
- Zhang Z, Pan C, Chung D. 2011. Tannic acid cross-linked gelatin-gum Arabic coacervate microspheres for sustained release of allyl isothiocyanate: Characterization and *in vitro* release study. *Food Research International*, **44**:1000-1007.

- Zhang K, Zhang H, Hu X, Bao S, Huang H. 2012. Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*, **89**:61-66.
- Zimet P, Livney Y. 2009. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, **23**:1120-1126.

## 10 APÉNDICE

Apéndice 1. Curva de calibración de aceite esencial de naranja.



Apéndice 2. Curva de calibración de aceite esencial de bergamota

