



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO –FARMACOBIOLOGIA.

ÁREA TEMÁTICA EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS
DE ALGINATO Y MUCÍLAGO DE NOPAL QUE CONTIENE
ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN POR GELIFICACIÓN IÓNICA**

TESIS

Que presenta:

IBQ. MANUEL ALEJANDRO ALCÁNTAR COVARRUBIAS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Asesora:

D.I. MA. GUADALUPE GARNICA ROMO

Morelia, Mich. Septiembre 2014

DEDICATORIA

A mis padres y mis hermanos por ser mi más grande apoyo, mi mayor motivación y por animarme en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo; por su orientación, consejos y comentarios sobre el trabajo.

Al dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso por su apoyo, resolución de todas las dudas planteadas y por su orientación.

Al dr. Ricardo Pérez por su apoyo en todo momento.

Al dr. Juan José Valdés Alarcón por su asesoría y apoyo en la manipulación del equipo de microscopía confocal.

Al dr. Rafael Salgado Garciglia por ayudarme con la liofilización de las muestras.

A la dra. Marina Vega por su asesoría en la preparación de las muestras para FT-IR y MEB, y apoyo en la manipulación de los equipos.

Al dr. Rosalio Mercado y a su excelente equipo de trabajo por recibirme en su laboratorio en todo momento. En especial a Susy y Roberto por su asesoría, préstamo de material y equipos; además a Omar, Jetza, Pedro y Edson por su amistad y los buenos momentos.

A Karla Córdova por su amistad, consejos y apoyo técnico en la atomización. Además, por facilitarme el mucílago en polvo.

A mis compañeras de laboratorio, Mariana y Fátima por su amistad y los buenos momentos.

A mis amigos; Ricardo, Paola, Héctor y Óscar por estar siempre en los buenos y malos momentos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo y la beca (270388) que me permitió continuar en mi formación profesional y para la realización de este trabajo de investigación.

Y a todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para conseguir este logro.

CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
4. Marco teórico	5
4.1. Aceite esencial	5
4.2. Aceite esencial de limón	6
4.3. Microencapsulación	7
4.4. Gelificación iónica	9
4.5. Agente encapsulante	11
4.6. Alginato	12
4.7. Mucílago de nopal	16
4.8. Sistema binario.....	18
5. Justificación	20
6. Hipótesis.....	21
7. Objetivos.....	22
7.1. Objetivo general	22
7.2. Objetivos específicos	22
8. Materiales y métodos	23
8.1 Materiales.....	23
8.2 Métodos.....	23
8.2.1 Extracción del mucílago	24
8.2.2 Diagramas de fase	24
8.2.3 Preparación de las emulsiones	25
8.2.4 Preparación de las microcápsulas	25
8.2.5 Caracterización de las microcápsulas obtenidas por gelificación iónica	25
8.3 Análisis estadístico.....	28
9. Resultados y discusión.....	29
9.1. Diagramas de fase	29
9.2 Preparación de las microcápsulas	40
9.2.1 Efecto de la presión en la morfología y en el tamaño de las microcápsulas	40
9.2.2 Efecto de la distancia de atomización en la morfología y en el tamaño de las microcápsulas.....	44
9.2.3 Efecto del flujo en la morfología y en el tamaño de las microcápsulas	50
9.2.4 Selección de las mejores condiciones para la caracterización de las microcápsulas ..	54
9.3 Caracterización de las microcápsulas	55
9.3.1 Morfología de las microcápsulas por Microscopía Óptica (MO)	55
9.3.2 Tamaño de las microcápsulas	57
9.3.3 Microscopía Confocal (MC).....	60
9.3.4 Morfología superficial de las microcápsulas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	62

9.3.5 Análisis por Espectroscopía en Infrarrojo (FT-IR).....	66
9.3.6 Eficiencia de encapsulación por Espectroscopía de Absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis)	70
10. Conclusiones	72
11. Anexos.....	74
12. Referencias bibliográficas	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración esquemática de la encapsulación de sabores.	8
Figura 2. Representación esquemática de la gelificación iónica.	10
Figura 3. Montaje experimental para la producción de microcápsulas.	11
Figura 4. Estructura química del alginato.	13
Figura 5. Enlazamiento de los iones divalentes con alginato, modelo “egg-box”.	14
Figura 6. Diagrama de flujo del desarrollo del trabajo.	23
Figura 7. Diagramas de fase de polímeros individuales.	31
Figura 8. Fotografías del sistema alginato.	32
Figura 9. Fotografías del sistema mucílago.	33
Figura 10. Diagramas de fase de los sistemas alginato-mucílago.	35
Figura 11. Fotografías del sistema alginato-mucílago (3:1).	36
Figura 12. Fotografías del sistema alginato-mucílago (2:1).	37
Figura 13. Fotografías del sistema alginato-mucílago (1:1).	37
Figura 14. Fotografías del sistema alginato-mucílago (1:2).	38
Figura 15. Fotografías del sistema alginato-mucílago (1:3).	38
Figura 16. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 7.5 lb/in ²	42
Figura 17. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 15 lb/in ²	42
Figura 18. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 22.5 lb/in ²	42
Figura 19. Análisis estadístico del efecto de la presión de aire en el tamaño de las microcápsulas de alginato.	43
Figura 20. Efecto de la presión de aire en la distribución de tamaño de las microcápsulas de alginato.	44
Figura 21. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 12 cm.	47
Figura 22. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 20 cm.	47
Figura 23. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 28 cm.	47
Figura 24. Microcápsulas de alginato producidas a 28 cm.	48
Figura 25. Forma de las cuentas de alginato producidas por extrusión.	48
Figura 26. Análisis estadístico del efecto de la distancia de atomización en el tamaño de las microcápsulas de alginato.	49
Figura 27. Efecto de la distancia de atomización en la distribución de tamaño de las microcápsulas de alginato.	50
Figura 28. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 3 ml/min.	52
Figura 29. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 6 ml/min.	52
Figura 30. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 9 ml/min.	52
Figura 31. Análisis estadístico del efecto del flujo en el tamaño de las microcápsulas de alginato.	53
Figura 32. Efecto del flujo en la distribución de tamaño de las microcápsulas de alginato.	54
Figura 33. Morfología de las microcápsulas a diferentes formulaciones por microscopía óptica.	56
Figura 34. Análisis estadístico del efecto del mucílago en el tamaño de las microcápsulas en diversas formulaciones.	58
Figura 35. Efecto del mucílago en la distribución de tamaño de las microcápsulas.	59

Figura 36. Microcápsulas a diversas formulaciones por microscopía de nomarski y microscopía confocal. 61

Figura 37. Morfología de las microcápsulas (liofilizadas) por MEB (100X). 63

Figura 38. Morfología de las microcápsulas (liofilizadas) por MEB (2500X). 64

Figura 39. Morfología de las microcápsulas sin liofilizar por MEB (100X). 65

Figura 40. Morfología de las microcápsulas sin liofilizar por MEB (2000X). 66

Figura 41. Espectros IR de los ingredientes y las microcápsulas. 69

Figura 42. Eficiencia de la encapsulación de las microcápsulas a diversas formulaciones. 71

Figura 43. Análisis estadístico de la eficiencia de encapsulación de las microcápsulas en las diversas formulaciones. 71

Figura 44. Curva de calibración del aceite esencial de limón. 74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones más utilizadas de los alginatos.	15
Tabla 2. Formulaciones de los sistemas.....	39
Tabla 3. Variación de la presión de aire en la preparación de las microcápsulas de alginato. ...	41
Tabla 4. Efecto de la presión de aire en el tamaño de las microcápsulas de alginato..	43
Tabla 5. Variación de la distancia de atomización en la preparación de las microcápsulas de alginato.	45
Tabla 6. Efecto de la distancia de atomización en el tamaño de las microcápsulas de alginato..	49
Tabla 7. Variación del flujo en la preparación de las microcápsulas de alginato.	50
Tabla 8. Efecto del flujo en el tamaño de las microcápsulas de alginato.	53
Tabla 9. Efecto del mucílago en el tamaño de las microcápsulas en las formulaciones..	57

1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue producir las microcápsulas de alginato y mucílago de nopal que contienen aceite esencial de limón por gelificación iónica. En la preparación de las microcápsulas, se determinaron las condiciones adecuadas para su formación utilizando los diagramas de fase, donde se determinaron las concentraciones de cloruro de calcio (1% p/v) y de los biopolímeros (2% p/v). El tamaño y la morfología de las microcápsulas fueron optimizadas mediante la combinación apropiada de los parámetros del proceso de atomización (la presión de aire, el flujo de la solución y la distancia entre el dispositivo de atomización y la solución de calcio). En la caracterización de las microcápsulas, se realizaron los análisis para estudiar la morfología de las microcápsulas por microscopía óptica (MO), microscopía confocal (MC) y microscopía electrónica de barrido (MEB); para determinar la presencia del aceite en las microcápsulas se utilizó (MO, MC) y espectroscopía en infrarrojo (FT-IR); se cuantificó la eficiencia de encapsulación del aceite esencial de limón por espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis). El tamaño de las microcápsulas aumentó conforme se incrementó la cantidad de mucílago en las formulaciones. Las microcápsulas de alginato presentaron el tamaño medio más pequeño ($29.18 \pm 1.60 \mu\text{m}$) y el tamaño máximo fue obtenido con las microcápsulas de alginato-mucílago en 1:1 ($39.31 \pm 1.31 \mu\text{m}$) con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Las microcápsulas liofilizadas presentaron cierta porosidad y rugosidad. La superficie porosa se atribuye a la encapsulación del aceite, mientras que la rugosidad se debe al proceso de liofilización. Además, al incrementarse la cantidad de mucílago en las formulaciones, las microcápsulas liofilizadas presentaron cierta pérdida en la forma esférica, esto fue confirmado por MEB. Finalmente, la eficiencia de la encapsulación disminuyó conforme se incrementó la cantidad de mucílago en las formulaciones; donde se obtuvo la máxima eficiencia de encapsulación para las microcápsulas de alginato (18.39%) seguida de las microcápsulas con alginato-mucílago en 3:1 (18.06%).

Palabras clave: microencapsulación, alginato, mucílago, aceite esencial de limón.

2. ABSTRACT

The aim of this work was to produce alginate and nopal mucilage microcapsules containing lemon essential oil through ionic gelation. In the preparation of microcapsules, the formation of microcapsules appropriated conditions was determined by phase diagrams, where the concentrations of calcium chloride (1% w/v) and biopolymers (2% w/v) were determined. The microcapsules size and morphology were optimized by proper combination of the atomization process parameters (air pressure, solution flow rate and distance between atomization device and calcium chloride solution). In characterization of the microcapsules, the analysis were performed to study the morphology with the optical microscopy (OM), confocal microscopy (CM) and scanning electron microscopy (SEM); the oil presence in the microcapsules was determined by OM, CM and infrared spectroscopy (FT-IR); and lemon essential oil encapsulation efficiency was quantified by UV-visible spectroscopy absorption (UV-Vis). The microcapsules size increased as the amount of mucilage in the formulations increased. Alginate microcapsules had the smallest mean size ($29.18 \pm 1.60 \mu\text{m}$) and mucilage-alginate microcapsules at 1:1 had the maximum size ($39.31 \pm 1.31 \mu\text{m}$) with statistical difference ($p < 0.05$). The lyophilized microcapsules showed some porosity and roughness. The porous surface is attributed to oil encapsulation, while roughness is due lyophilization process. Furthermore, by increasing the amount of mucilage in formulations, lyophilized microcapsules showed some loss in spherical shape, that it was confirmed by SEM. Finally, the encapsulation efficiency decreased as the amount of mucilage formulations increased; where microcapsules of alginate had the maximum efficiency (18.39%) followed by alginate-mucilage at 3:1 (18.06%).

Key words: microencapsulation, alginate, mucilage, lemon essential oil.

3. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son una mezcla de compuestos de naturaleza oleosa obtenidos de la materia vegetal. Particularmente, el aceite esencial de limón posee una gran importancia económica debido a su composición química. Por sus propiedades aromáticas, los aceites de los cítricos han sido aplicados como aromatizantes, en alimentos, bebidas y en cosméticos. Sin embargo, el aceite esencial de limón es susceptible a la degradación causada por la luz, el calor y la humedad.

La preservación de los aceites esenciales es un problema complejo. La encapsulación puede ser una solución adecuada para la protección de los aceites esenciales ante la degradación. La microencapsulación es la tecnología mediante el cual un material o una mezcla de materiales son recubiertos con o atrapados dentro de otro material o un sistema. El material recubierto es denominado como material núcleo, activo o encapsulado y el material que recubre es llamado material pared, concha o agente encapsulante. Generalmente, la microencapsulación se utiliza para proteger el material núcleo ante condiciones adversas del medio como la luz, temperatura y humedad (Madene y col., 2006).

Para la protección exitosa de los aceites esenciales es muy importante elegir un material pared así como la técnica de encapsulación adecuada.

Los procesos de encapsulamiento pueden ser divididos en físicos y químicos. Entre los procesos físicos se encuentra el secado por aspersion, extrusión, aspersion por enfriamiento y lecho fluidizado. Por otro lado, los procesos químicos son la coacervación simple o compleja, atrapamiento en liposomas, co-cristalización, polimerización interfacial e inclusión molecular.

Entre los procesos de encapsulamiento, la gelificación iónica es una técnica muy simple que no utiliza condiciones drásticas de procesamiento (solventes o temperatura elevada). El proceso se basa en la capacidad de los polímeros para formar geles cuando interaccionan con iones, donde el material activo queda atrapado en la matriz polimérica de las cápsulas. Los polímeros como el alginato y el mucílago pueden ser utilizados en la gelificación iónica.

Los alginatos son uno de los materiales mejor conocidos y más utilizados en la microencapsulación de una gran variedad de compuestos de aroma (Zuidam y Shimoni, 2010).

Por otro lado, el mucílago de nopal es un polisacárido con propiedades de interés en la industria alimentaria; sin embargo, ha sido muy poco estudiado en el campo de la microencapsulación. La mezcla de ambos biopolímeros puede resultar en microcápsulas con características muy interesantes (menor rugosidad en la superficie, mayor eficiencia de encapsulación).

En el presente trabajo, se produjeron microcápsulas con alginato y mucílago de nopal donde se encapsuló el aceite esencial de limón mediante la gelificación iónica. Para la formación de las microcápsulas fue necesario determinar las condiciones adecuadas de la concentración de la sal de calcio y de los biopolímeros (diagramas de fase). Posteriormente, se evaluó el efecto de los parámetros del proceso (presión, distancia y flujo) en la morfología y el tamaño de las microcápsulas; donde se eligieron los valores adecuados de dichos parámetros para la producción de las microcápsulas. Finalmente, se evaluó el efecto de mezcla de los polímeros como agente encapsulante en comparación con el alginato sobre las características de las microcápsulas (tamaño, morfología y eficiencia de encapsulación).

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Aceite esencial

4.1.1. Definición y aplicaciones

Los aceites esenciales son compuestos líquidos aromáticos de consistencia oleosa extraídos de las plantas, los cuales son categorizados como sustancias GRAS (generally recognized as safe) por la asociación Food and Drug Administration (FDA) de los EE.UU. (Hosseini y *col.*, 2013a). Sin embargo, ésta definición no incluye a los aceites esenciales extraídos de las frutas cítricas. De acuerdo con las normas ISO, los aceites esenciales son definidos como productos obtenidos de materias primas vegetales los cuales pueden ser aislados por medios físicos. Los métodos físicos usados son destilación, prensado en frío o destilación en seco de materiales naturales. Después de la destilación o el prensado, los aceites esenciales son físicamente separados de la fase acuosa (Ferhat y *col.*, 2007). El método tradicional para obtener los compuestos volátiles de los aceites esenciales (en frutas cítricas) es el prensado en frío. A nivel laboratorio, las técnicas convencionales que pueden ser usadas para obtener la fracción volátil de una muestra son: destilación al vacío, hidrodestilación o destilación al vapor, extracción con solventes combinada con destilación, extracción con fluidos supercríticos e hidrodestilación asistida con microondas. Sin embargo, es importante resaltar que sólo el producto obtenido por hidrodestilación puede ser llamado “aceite esencial”, con excepción del prensado en frío para frutas cítricas (Rubiolo y *col.*, 2010).

Completando las definiciones anteriores, los aceites esenciales son una mezcla de compuestos volátiles, los cuales poseen altos niveles de insaturación y generalmente son inestables en factores como la luz, el calor y la humedad (Ferhat y *col.*, 2007).

Los aceites de los cítricos han sido aplicados en diversos productos tales como alimentos, bebidas, cosméticos y en medicinas; además como agentes aromatizantes en la aromaterapia. El uso de los aceites esenciales en la perfumería, los cosméticos, agricultura e industria alimentaria es muy común debido a sus propiedades aromáticas (Martins y *col.*, 2014).

4.2. Aceite esencial de limón

4.2.1. Generalidades del aceite de limón

En todos los cítricos, el aceite esencial se encuentra en sacos con forma oval o de globo, los cuales se encuentran situados irregularmente debajo de la superficie coloreada de la cáscara (flavedo). El mesocarpio interno de color blanco (albedo) no contiene los sacos de aceite (Can-Baser y Buchbauer, 2010). La cáscara de limón contiene alrededor de 0.4% de aceite y actúa como barrera tóxica contra varios microorganismos e insectos (Cerutti y Neumayer, 2004). El aceite de limón es un aceite esencial de importancia comercial considerable, siendo el tercer aceite esencial producido a nivel mundial detrás del aceite de naranja dulce y de menta (Can-Baser y Buchbauer, 2010). En el 2008, los principales productores del aceite esencial de limón fueron Argentina, Italia y España (Can-Baser y Buchbauer, 2010), donde México aportó el 6% a la exportación mundial del mismo (Bruzzone, 2009).

4.2.2. Aplicaciones del aceite de limón

El aceite de limón es uno de los aceites saborizantes más importantes y utilizados en todo tipo de bebidas, refrescos, polvos de refrescos y tabletas, productos horneados tales como pasteles, pastas, rellenos de pasteles, confitería, caramelos duros y suaves, postres de gelatina, helados, entre otros productos. El aceite también es empleado en perfumes, aguas de tocador, colonias y en los cosméticos, lo cual les imparte una nota superior muy refrescante (Guenther, 1955). Los terpenos del aceite esencial de limón pueden ser utilizados como agentes saborizantes en bebidas carbonatadas no alcohólicas (Vekiari y *col.*, 2002).

4.2.3. Principales compuestos volátiles del aceite de limón

Existen más de 130 compuestos volátiles que han sido identificados en el aceite de limón, siendo la mayoría compuestos insaturados como los terpenos, los cuales pueden ser fácilmente modificados causando pérdida en el sabor y el aroma del aceite esencial (Van Straten y Maarse, 1983). Los

compuestos insaturados son aquellos que presentan enlaces con doble o triple ligadura.

El aceite esencial de limón consiste básicamente en 75% de terpenos, 12% de compuestos oxigenados y un 3% de sesquiterpenos. Los principales compuestos volátiles que le confieren el intenso aroma y el sabor del aceite son neral, geranial, limoneno, linalool, sabineno, terpinoleno, β -mirceno, γ -terpineno, α -pineno y β -pineno; siendo el limoneno el compuesto que se encuentra en mayor cantidad desde 50 hasta 65% (Chamblee y *col.*, 1991) del total del aceite (Gamarra y *col.*, 2006).

4.2.4. Compuestos que contribuyen con el mal sabor del aceite del limón

El aceite de limón es susceptible a la oxidación debido al porcentaje elevado de compuestos insaturados. La oxidación es influenciada por la temperatura, radiación UV y trazas de metales que actúan como catalizadores. Los compuestos que contribuyen al mal sabor del aceite son el p-cimeno (ejerce la mayor contribución) (Nguyen y *col.*, 2009), carvona y p-metilacetofenona (Schieberle y Grosch, 1989), entre otros. El p-cimeno surge de la oxidación del limoneno y del γ -terpineno, también puede formarse de la deshidratación del citral (Nguyen y *col.*, 2009). La carvona y la p-metilacetofenona se forman por la presencia de luz y de oxígeno.

Además de la formación de compuestos oxidados, se presenta la pérdida del citral, α -terpineno, β -terpineno y α -terpinoleno; estos componentes contribuyen con el sabor del limón fresco.

Para proteger a los aceites esenciales de la oxidación causada por el calor, la luz y la humedad; puede utilizarse la microencapsulación.

4.3. Microencapsulación

4.3.1. Generalidades de la microencapsulación

En general, la microencapsulación es la incorporación de un material en el interior de otro material (Madene y *col.*, 2006). El desarrollo de productos microencapsulados inició en la década de 1950, con la investigación en revestimientos sensibles a la presión para la fabricación de papel carbón

(Green y Scheicher, 1955). Hoy en día, la tecnología de encapsulación está desarrollada y es aceptada dentro de la industria farmacéutica, química, cosmética, alimenticia y de impresión (Augustin y col., 2001). Los productos alimenticios como grasas, aceites esenciales, compuestos aromáticos, oleorresinas, vitaminas, minerales, colorantes y enzimas han sido encapsulados (Dziezak, 1988).

En general, el proceso de microencapsulación de compuestos sensibles se compone de dos pasos: 1) la emulsificación del material activo con una solución densa de un material pared, como un polisacárido o una proteína, y 2) el secado o enfriamiento de las emulsiones. Una ilustración esquemática de la encapsulación de un sabor se muestra en la figura 1 (Madene y col., 2006).

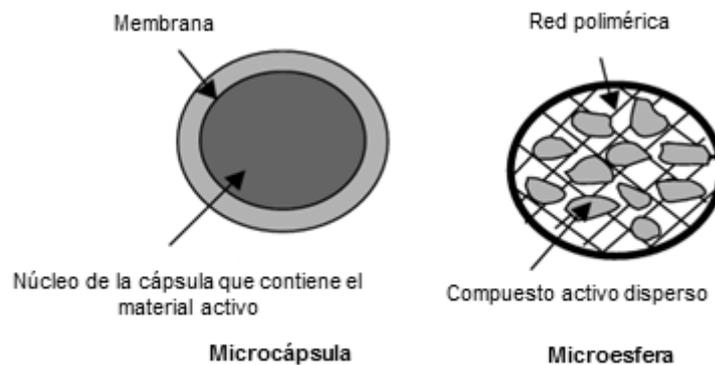


Figura 1. Ilustración esquemática de la encapsulación de sabores. Tomada de Madene y col. (2006).

El aroma puede ser encapsulado para mejorar la funcionalidad y estabilidad del aroma en productos alimenticios. Los posibles beneficios de los aromas encapsulados son (Uhlemann y col., 2002):

- Mayor facilidad de manejo, transporte e incorporación a otros componentes (conversión de la forma líquida a la sólida).
- Mejorar la estabilidad del producto final y durante el procesamiento (protección de la evaporación, degradación y reacción con otros componentes en el producto alimenticio; protección de las reacciones inducidas por la luz produciendo la oxidación de compuestos).

- Mejorar la seguridad (por ejemplo, reducir la flamabilidad, manejo de aceite de aroma no concentrado).
- Incrementar la vida de anaquel de los sabores.
- Creación de efectos visibles y de textura (señales visuales).
- Enmascaramiento del sabor y olor.
- Liberación controlada del aroma (la retención del aroma).

Además, la incorporación de pequeñas cantidades de sabores en los alimentos puede influenciar la calidad del producto final, el costo y la satisfacción del cliente (Zeller y Salleb, 1996).

La selección del proceso de encapsulación considera el tamaño medio de la partícula requerida, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante, la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material encapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (Madene y col., 2006).

Conforme a Yañez y col. (2002), los métodos de encapsulamiento pueden ser divididos en: 1) procesos físicos: secado por aspersion, extrusión, aspersion por enfriamiento y lecho fluidizado; y 2) procesos químicos: coacervación simple o compleja, atrapamiento en liposomas, co-cristalización, polimerización interfacial e inclusión molecular.

Una técnica muy simple que no utiliza condiciones drásticas de procesamiento (temperatura elevada o solventes), además los polímeros como el alginato y el mucílago pueden ser utilizados es la gelificación iónica.

4.4. Gelificación iónica

4.4.1. Generalidades de la gelificación iónica

La gelificación iónica es una técnica en la que las microcápsulas son producidas por el goteo de una solución polimérica (normalmente se utiliza alginato) sobre una solución catiónica (generalmente se utiliza el calcio), en agitación constante (fig. 2) (Schoubben y col., 2010). La solución polimérica contiene el material activo, la cual es goteada sobre una solución iónica en concentraciones adecuadas pudiéndose obtener cápsulas de diferentes formas y tamaños. La técnica se basa en la habilidad de varios hidrocoloides de formar

geles en presencia de iones, normalmente cationes divalentes. La interacción de iones como el calcio, con los grupos carboxilos de las cadenas poliméricas de los polisacáridos resulta en la formación de geles insolubles. Por lo tanto, la adición gota a gota de una dispersión del polisacárido conteniendo el material a ser encapsulado sobre una solución de iones, produce la formación de camas o cuentas. Las gotas al entrar en contacto con los iones forman instantáneamente estructuras de gel conteniendo el material a ser encapsulado disperso por toda la matriz del polisacárido (Srnđel y col., 2008).

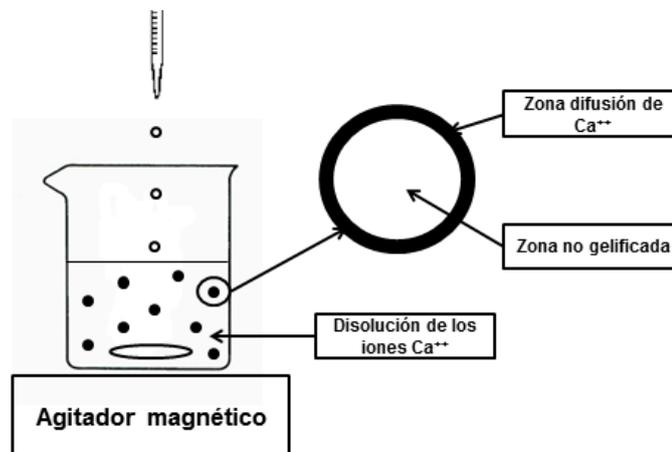


Figura 2. Representación esquemática de la gelificación iónica. Tomada y modificada de Zambon y col. (2002).

4.4.2. Generalidades de la atomización

La gelificación iónica puede ser realizada por medio de la atomización. Ésta es una técnica distinguida por la capacidad de formar cápsulas de tamaño pequeño y no utiliza condiciones drásticas de procesamiento (solventes o temperaturas elevadas). La solución de alginato es transportada por la bomba peristáltica con cierta velocidad de flujo hacia el dispositivo de atomización, y rociada sobre la solución de cloruro de calcio (fig. 3). El aire a presión y el líquido son alimentados al dispositivo por la parte superior. En el interior del dispositivo, el aire a presión se mezcla con el líquido, forzando a las pequeñas gotas de líquido pasen a través del orificio de la boquilla (Kwok y col., 1991). El proceso de atomización es útil para producir microcápsulas que van desde 5 a

200 μm , esto se logra con el ajuste de flujo de líquido, la presión y distancia del atomizador a la solución de calcio (Cui y col., 2001).

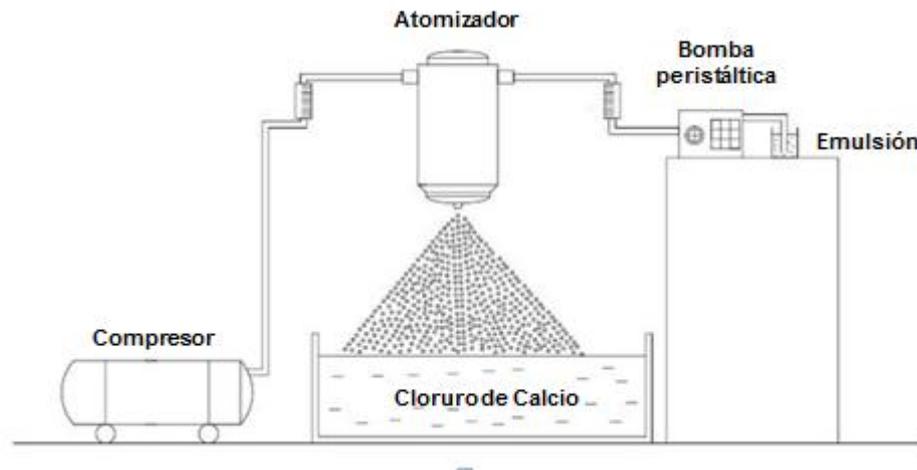


Figura 3. Montaje experimental para la producción de microcápsulas. Tomado de Chan y col. (2012).

4.5. Agente encapsulante

4.5.1. Funciones y características de los agentes encapsulantes

La elección del material pared depende de un número de factores que incluyen: objetivos de productos esperados y requerimientos, naturaleza del material núcleo, proceso de encapsulación, aspectos económicos y si el material pared está aprobado por la FDA (Amrita y col., 1999).

La eficiencia de encapsulación es particularmente dependiente del agente encapsulante, el cual debe tener las siguientes funciones: proteger a los componentes activos de la oxidación, la luz, la humedad y el contacto con sustancias en el almacenamiento, prolongar la vida de anaquel; evitar la pérdida de los componentes volátiles encapsulados, obtener un producto fácil de manejar (King y col., 1976).

Para la encapsulación de compuestos de sabor, el material pared no debe de reaccionar con el material núcleo, el material debe estar presente en una forma fácil de manejar con una viscosidad baja en altas concentraciones de sólidos, poseen propiedades emulsionantes que facilitan la formación de la

película de interés, tienen baja higroscopicidad, son económicos y son fáciles de obtener (Madene y col., 2006).

Por lo general se utilizan hidrocoloides como agentes encapsulantes, como la gelatina, gomas, almidones modificados y proteínas (Shahidi y Han, 1993). En un intento por obtener un material pared con estas propiedades, los investigadores han recurrido a mezclar diversos materiales para elaborar el material "ideal".

Para la protección exitosa de los compuestos de sabor es muy importante elegir un material pared así como la técnica de encapsulación adecuada. En este sentido, los alginatos son uno de los materiales mejor conocidos y más utilizados en la microencapsulación de una gran variedad de compuestos de sabor (Zuidam y Shimoni, 2010).

4.6. Alginato

4.6.1. Generalidades del alginato

“Alginato” es un término colectivo para una familia de polisacáridos obtenidos de las algas pardas y ciertas especies de bacterias alrededor del mundo. El ácido algínico fue descubierto por primera vez, extraído, y patentado por Stanford en 1881. Este polisacárido fue reconocido como un componente estructural de las algas pardas marinas (*Phaeophyceae*), donde constituye hasta el 40% de la materia seca y se encuentra principalmente en la pared celular de algas como una mezcla insoluble de calcio, magnesio, potasio, y sales de sodio. La presencia de alginato proporciona la resistencia mecánica y la flexibilidad de las algas y, además, actúa como depósito de agua para prevenir de la deshidratación, cuando una parte del alga marina ha sido expuesta al aire (Rehm, 2009).

4.6.2. Estructura del alginato

Las aplicaciones del alginato en la industria alimentaria son totalmente dependientes de las propiedades del alginato. Estas propiedades se derivan de la estructura química de los alginatos. Los alginatos poseen una cadena conformada por residuos de ácido α -L-gulurónico (G) y el ácido β -D-

manurónico (M) (fig. 4a); la estructura no tiene ramificaciones. En la cadena, el ácido α -L-gulurónico y el ácido β -D-manurónico pueden presentarse en bloques G, M y GM; donde los bloques G contienen dos unidades de ácido α -L-gulurónico, los bloques M contienen dos unidades de ácido β -D-manurónico; mientras que los bloques MG, contienen una unidad de cada uno de los ácidos (fig. 4b). La estructura química de los bloques M, G debido a los diferentes enlaces glucosídicos entre los carbonos C-1 y C-4 de las unidades monoméricas se muestran en la figura 4. Las regiones de bloques M corresponden a cadenas lineales, mientras que los bloques G presentan una estructura en forma de bucle.

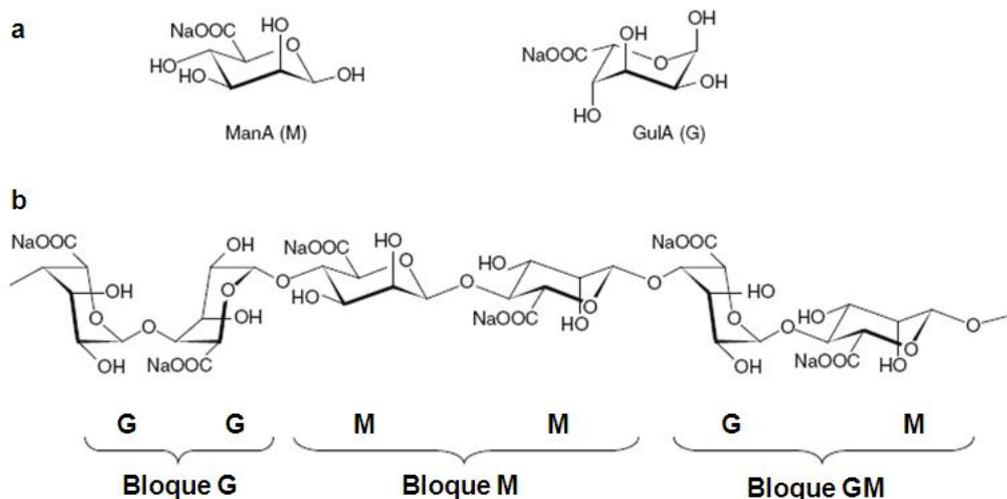


Figura 4. Estructura química del alginato. Panel a, la conformación del 4C1 de la sal sódica de ácido β -D-manurónico (M) y la conformación del 1C4 de la sal sódica de ácido α -L-gulurónico (G). Panel b, la composición del bloque de alginato con los bloques G, M y GM. Tomada de Rehm (2009).

Cuando dos cadenas de bloques G se alinean lado a lado resulta una zona en forma de diamante, la cual contiene una dimensión ideal para acomodar en su interior un ión calcio, formándose una red. Este modelo conocido con el nombre de “egg-box” fue propuesto por Grant (1973), se utiliza para explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas (fig. 5).

Cuando la estructura polimérica posee mayor cantidad de bloques G, generalmente el gel es fuerte y frágil, mientras que con la presencia de mayor proporción de M-bloques, el gel formado se presenta suave y elástico (Lupo-

Pasin y col., 2012). Los alginatos tienden a formar geles con un gran número de cationes divalentes, donde el ión calcio es el más empleado por la industria alimentaria.

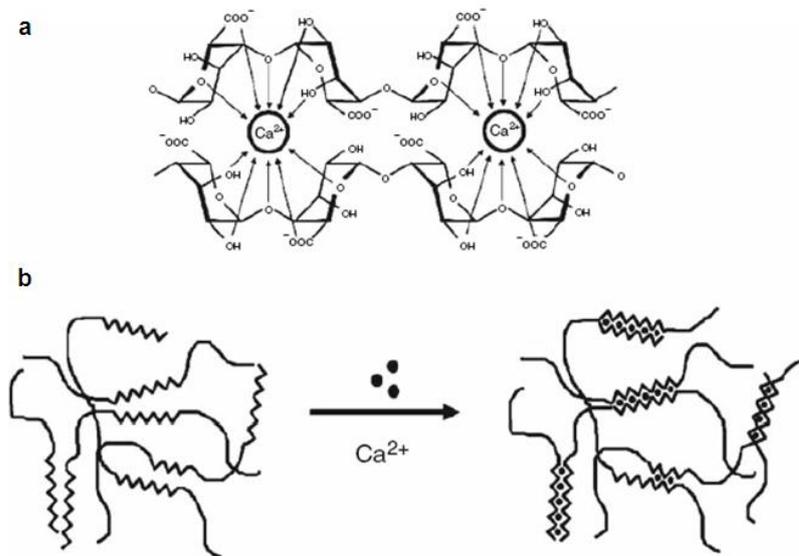


Figura 5. Enlazamiento de los iones divalentes con alginato, modelo "egg-box". Panel a, quelación de los iones divalentes. Panel b, unión de las cadenas. Tomada de Rehm (2009).

4.6.3. Aplicaciones del alginato

El alginato es un hidrocoloide de gran interés en diversas ramas de la industria, por lo cual posee un amplio rango de aplicaciones. En la tabla 1, se presentan las aplicaciones más utilizadas con los alginatos (Gacesa, 1988).

Tabla 1. Aplicaciones más utilizadas de los alginatos.

Área de aplicación	Función	Ejemplos específicos
Industria de alimentos y bebidas	Estabilizante	Estabilizante de espuma (cerveza). Retardante de separación de fases (helado).
	Viscosificador	Suspensión con pulpa de fruta. Espesante en salsa, malteadas, etc.
	Agente gelificante	Reconstitución de alimentos (aros de cebolla, frutas sin hueso).
	Película	Recubrimiento en pescado.
Industria farmacéutica	Estabilizante	Emulsiones en preparaciones cosméticas. Aglutinante para tabletas.
	Agente gelificante	Moldes para impresiones dentales.
	Películas/fibras	Revestimientos gastrointestinales para tabletas. Vendajes homeostáticos.
	Agentes terapéuticos	Compuestos para antiácidos y antiúlceras.
Otros usos	Viscosificador	Tinta de impresión
	Agente gelificante	Inmovilización de enzimas y células.

En el campo de la microencapsulación, el alginato ha sido muy utilizado ya que posee la capacidad de formar una matriz altamente versátil, biocompatible y no tóxica para la protección de diversos materiales núcleo como aceites, células, microorganismos, minerales y vitaminas.

4.6.4. Encapsulamiento de aceites con alginato

Los alginatos poseen la habilidad para reaccionar con los iones calcio y formar geles o fibras a temperatura ambiente. Por medio de esta interacción, los aceites de pueden ser encapsulados dentro de una matriz de gel de alginato (King, 1988).

Generalmente, los sabores solubles en aceite pueden ser atrapados con los alginatos, para ello es necesario formar una emulsión. Posteriormente, la emulsión será agregada gota a gota, o atomizada sobre una solución de cloruro de calcio. De manera instantánea, se forman cuentas o cápsulas del gel con el material núcleo atrapado en el interior de las cuentas o cápsulas. El diámetro de las cuentas varía desde 200 a 5000 μm dependiendo de la formulación y del equipo utilizado (King, 1988).

Recientemente, se han desarrollado sistemas de encapsulación en escala nanométrica utilizando el alginato como agente encapsulate, las nanocápsulas han sido utilizadas para envolver al aceite de cúrcuma (Lertsutthiwong y col., 2008), el aceite esencial de *Satureja hortensis* (Hosseini y col., 2013a) y el aceite esencial de *Lippia sidoides* (de Oliveira y col., 2014). Las nanocápsulas con los aceites esenciales respectivos pueden aplicarse en la cosmética (Lertsutthiwong y col., 2008), como agente oxidante y antimicrobiano con liberación controlada del aceite en la industria alimentaria (Hosseini y col., 2013a) y como larvicida contra insectos (de Oliveira y col., 2014).

4.7. Mucílago de nopal

4.7.1. Generalidades del mucílago de nopal

El nopal es el nombre común que reciben las cactáceas del género *Opuntia*; este género y su familia son originarios de América (Granados y Castañeda, 1997). El nopal excreta la baba, también conocida como mucílago, está distribuido en diversas partes de la planta de *Opuntia*, como en los cladodios y la fruta (Sáenz y col., 2004). Este hidrocoloide presenta gran capacidad de absorber agua, esta característica tiene un rol muy importante en la fisiología de la planta, considerando que la *Cactácea* retiene agua bajo condiciones climatológicas desfavorables (Saag y col., 1975).

4.7.2. Estructura química del mucílago

El mucílago del nopal posee una estructura larga, compleja y altamente ramificada en azúcares (Ruiz y Guerrero, 2009). La cadena posee los siguientes monómeros: L-arabinosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-xilosa y ácido galacturónico. La proporción de estos monómeros en la molécula varía de acuerdo a diversos factores como la variedad, la edad, las condiciones ambientales y el método de extracción, entre otros (Abraján, 2008). Su composición glucosídica es aproximadamente de 47% de arabinosa, 23% de xilosa, 18% de galactosa, 7% de ramnosa y 5% de ácido galacturónico, con respecto a su peso molecular.

4.7.3. Valor nutricional del mucílago de nopal

El mucílago forma parte de la fibra dietética y se encuentra clasificado como fibra soluble. La fibra dietética está asociada con varios efectos fisiológicos tales como disminuir el nivel de colesterol y controlar el nivel de glucosa en la sangre (ayuda en la diabetes), contribuye con la secreción de ácidos biliares (Sáenz y col., 2004). Además, ayuda a reducir ciertos tipos de cáncer, como el de colon, reducción de síntomas de constipación crónica y hemorroides (McPherson, 1992; Atalah y Pak, 1997).

4.7.4. Propiedades y aplicaciones del mucílago de nopal

El mucílago es un componente con excelentes perspectivas como un aditivo no sólo en la industria alimentaria, también para otros usos en la industria. La especie *Opuntia ficus-indica* es la más estudiada en el mundo (Ruiz y Guerrero, 2009); se ha reportado el uso del mucílago de esta especie para la obtención de películas comestibles (Abraján, 2008), además de su empleo como aditivos mejoradores de la textura en los alimentos (Álvarez y col., 2007; Ruiz y Guerrero, 2009), así como agente espesante, gelificante, y emulsificante (Álvarez y col., 2007). La capacidad de emulsificación es una propiedad esencial del material para la encapsulación de aceites. Por

lo tanto, será de gran utilidad el uso del mucílago para el encapsulamiento del aceite esencial de limón.

En México y Chile, el mucílago ha sido utilizado como un purificador de agua y como adhesivo para la cal (Sáenz y col., 2004). Otra propiedad del mucílago de nopal es su uso en alimentos como sustituto de grasas y como ligante de sabor (McCarthy citado por Cárdenas y col., 1997).

Además, Medina-Torres y col. (2013) demostraron la efectividad del mucílago de nopal (*O. ficus indica*) como agente encapsulante del ácido gálico mediante el secado por aspersion. Por otro lado, el mucílago puede ser explotado comercialmente como un agente encapsulante como una alternativa en los países donde la *Cactácea* crece en abundancia (Zamora-Vega y col., 2012).

4.8. Sistema binario

Un sistema binario se encuentra formado por dos sustancias. En el presente trabajo se utilizó la mezcla de alginato y mucílago como un sistema binario.

Algunos estudios han reportado que el alginato puede formar complejos fuertes con otros polímeros naturales como la pectina, esto se realiza mediante una asociación fuerte entre sus cadenas; posteriormente, los geles se forman después de la adición de cationes divalentes como los del calcio (Liu y col., 2003). En este sentido, Islan y col. (2012) y Koo y col. (2013) utilizaron la mezcla de alginato con pectina en las combinaciones apropiadas obteniendo una elevada eficiencia de encapsulación en comparación con un sistema individual de alginato.

Sin embargo, los trabajos de investigación sobre la encapsulación de compuestos activos utilizando la mezcla de alginato y mucílago de nopal son escasos. De acuerdo con Zamora-Vega y col. (2012), los materiales de revestimientos formados con mucílago, inulina y alginato pueden proporcionar mayor protección a los probióticos en productos alimenticios. Además, los autores reportaron que la mezcla de estos materiales le proporcionó mayor suavidad a la superficie de las micrócapsulas. Esto le confiere un valor positivo

5. JUSTIFICACIÓN

El aceite esencial de limón es un producto de alto valor en la industria alimentaria. Los principales compuestos volátiles del aceite proporcionan el aroma fuerte y el sabor, estos compuestos poseen un alto nivel de insaturación por lo que son susceptibles a la oxidación por acción de factores como la luz, oxígeno, metales, entre otros. El encapsulamiento constituye una excelente opción para proteger el aceite esencial de limón de la oxidación.

Se propone encapsular el aceite esencial de limón mediante la gelificación iónica, aunque el método es poco usual en el encapsulamiento de aceites, resulta ser muy sencillo y se opera a temperatura ambiente. Dicha tecnología de encapsulamiento requiere un agente encapsulante con la capacidad de formar cápsulas al entrar en contacto con una solución iónica. En este caso, el alginato es un polímero que ha sido ampliamente utilizado en la microencapsulación debido a su habilidad para formar geles al entrar en contacto con el ión calcio.

Por otro lado, el mucílago de nopal es un polisacárido con propiedades de interés en la industria alimentaria, sin embargo ha sido muy poco estudiado en el campo de la microencapsulación. Además, el mucílago de nopal puede ser explotado como un agente encapsulante en los países donde el nopal crece en abundancia, como en México. La mezcla de ambos polisacáridos se utilizará para encapsular el aceite esencial de limón.

6. HIPÓTESIS

Al utilizar la mezcla de alginato con mucílago de nopal para obtener microcápsulas que contengan el aceite esencial de limón, se puede lograr una mayor cantidad de aceite esencial encapsulado, que si se producen microcápsulas con un solo material, producidas con alginato.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Determinar la eficiencia de la mezcla de alginato con mucílago de nopal en el encapsulamiento del aceite esencial de limón.

7.2. Objetivos específicos

1. Obtener el mucílago del nopal.
2. Determinar las condiciones de gelificación de la mezcla alginato-mucílago.
3. Determinar las condiciones adecuadas para la producción las microcápsulas en base a los parámetros del proceso de atomización.
4. Caracterizar las microcápsulas en base a las condiciones seleccionadas del proceso de atomización.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Materiales.

El nopal de la especie *O. ficus indica* fue adquirido en el mercado local de la ciudad de Morelia, Michoacán, México. El aceite esencial de limón sintético y el cloruro de calcio anhidro (pureza del 96%) fueron obtenidos por Meyer. El alginato de sodio tipo Manugel DMB (con alto contenido de grupos gulurónicos, lote G3909401) fue donado por FMC Biopolymers. En este trabajo, el aceite esencial de limón fue utilizado como modelo de aceite esencial. Todos los reactivos químicos fueron usados sin alguna otra purificación.

8.2 Métodos.

El diagrama de flujo resume los principales pasos realizados en el presente trabajo de investigación (fig. 6).

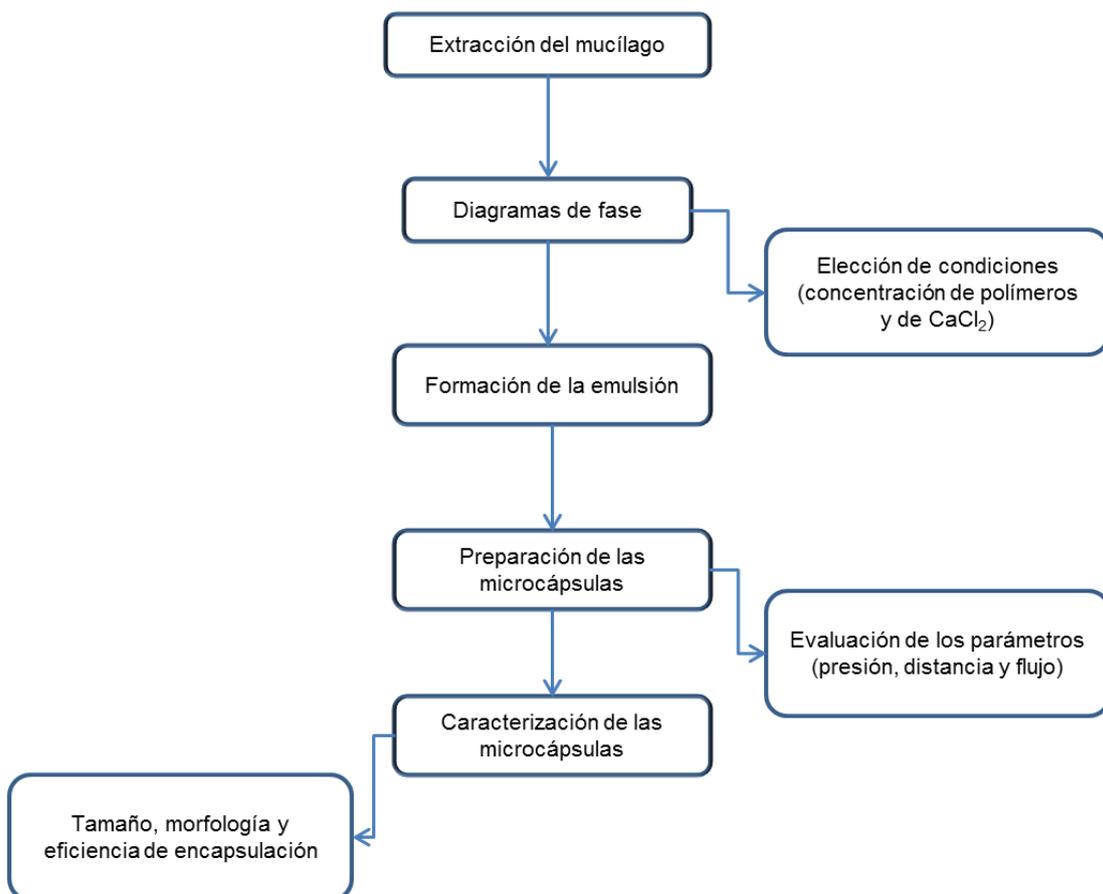


Figura 6. Diagrama de flujo del desarrollo del trabajo.

8.2.1 Extracción del mucílago

La extracción del mucílago de *O. ficus-indica* se realizó en base a la técnica reportada por Rodríguez-González (2010). El procedimiento se explica a continuación. El nopal se lavó, se cortó en trozos pequeños y se pesaron kilogramos independientes. Al nopal se le agregó agua destilada en relación 1:2 (g de nopal/ml de agua) y se molió en licuadora para permitir una mejor extracción del mucílago. La solución obtenida se calentó a una temperatura de 70 °C durante 1 h y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, donde se encontró el mucílago. Este se sometió a calentamiento en baño maría a 90 °C para concentrar el mucílago. Se añadió etanol, en relación 4:1 (alcohol/mucílago) para precipitar el mucílago y se dejó reposar durante 1 día a 4 °C, esto permitió obtener mayores cantidades. El mucílago aglomerado se recuperó por decantación. El producto obtenido se secó en un deshidratador solar para eliminar el alcohol y el agua retenidos. Una vez secado, el mucílago se molió para obtenerlo en forma de polvo.

8.2.2 Diagramas de fase

Los diagramas de fases fueron construidos en base a la técnica de Mukai-Correa (2003). Los materiales fueron disueltos en agua destilada hasta disolverse completamente, se utilizaron las siguientes concentraciones en solución: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 % (p/v); en combinación con la solución de cloruro de calcio en concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 % (p/v). En las mezclas binarias se utilizó la mezcla alginato-mucílago en las proporciones 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 y 1:3. Después de la disolución, se pipetearon 2.5 mL de la solución polimérica en 0.5 mL de solución de cloruro de calcio dentro de un tubo de ensaye. Los tubos se agitaron en un vórtex por 10 s, siendo después colocados en reposo a temperatura ambiente. Transcurridas 24 h, se realizó la construcción de los diagramas, los tubos se invirtieron para observar con mayor claridad las fases sol, gel y sinéresis. Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

8.2.3 Preparación de las emulsiones

La preparación de las emulsiones se realizó en base a la técnica de Mukai-Correa (2003). Las soluciones acuosas de alginato-mucílago y alginato individual fueron preparadas de acuerdo a la tabla 2 (apartado 7.1.2), donde fue incorporado el aceite esencial de limón (50% p/p con respecto a los sólidos totales) para preparar una emulsión en un dispersor Ultra-Turrax (IKA, México) a 18000 rpm durante 8 min.

8.2.4 Preparación de las microcápsulas

La preparación de las microcápsulas se realizó en base a la técnica de Mukai-Correa (2003), con algunas modificaciones. Las emulsiones fueron preparadas con soluciones de alginato al 2.0% (concentración obtenida de los diagramas de fase) y el aceite de esencial de limón de acuerdo al apartado 6.2.3; estas fueron atomizadas en una solución de cloruro de calcio al 1% (p/v) (concentración obtenida de los diagramas de fase), en agitación constante. Las emulsiones fueron transportadas hacia el atomizador de doble fluido con la boquilla de 0.7 mm de diámetro mediante una bomba peristáltica. Se probaron con tres velocidades diferentes: 3, 6 y 9 ml/min. Entre el pico de atomizador y la superficie de la solución iónica fueron probadas tres distancias: 12, 20 y 28 cm. Se probó con tres presiones de trabajo: 7.5, 15 y 22.5 lb/in².

Después de la atomización, las microcápsulas fueron mantenidas en agitación constante en la solución de calcio durante 30 min. Posteriormente, fueron escurridas en un tamiz de acero inoxidable con un diámetro de 44 µm y se lavaron durante 5 min con agua destilada, posteriormente fueron tamizadas.

8.2.5 Caracterización de las microcápsulas obtenidas por gelificación iónica

8.2.5.1 Morfología y tamaño de las microcápsulas mediante Microscopía óptica

La morfología de las microcápsulas fue observada en un microscopio óptico (Motic) utilizando la lente objetivo de 10X. La captación de las imágenes fue realizada a través del software Motic. El tamaño fue valorado en las muestras

contando 100 unidades de microcápsulas, donde se obtuvo el tamaño medio y la distribución de tamaño de las microcápsulas, para cada muestra.

8.2.5.2 Microscopía confocal

La identificación del aceite esencial de limón en las microcápsulas fue observada en un microscopio de barrido láser confocal (FluoView™ FV1000, Olympus). La Microscopía de Nomarski también se utilizó en el microscopio FV-1000 para obtener las imágenes con fondo gris. El Rojo de Nilo fue usado para la tinción e identificación de la fase oleosa. El Rojo de Nilo fue disuelto en etanol a una concentración de 1 mg/mL. La solución fue preparada y almacenada protegiéndola de la luz. Posteriormente, se tomaron 100 µL de esta solución y fueron agregados a una solución con las microcápsulas. Finalmente, una gota de la muestra fue agregada al portaobjetos, cubierta con el cubreobjetos y observada en el microscopio. El Rojo de Nilo presenta una longitud de excitación de 488 nm y una longitud de emisión de 525 nm (Donsi y *col.*, 2011). Las imágenes fueron obtenidas a través del visor de imágenes (FV10-ASW versión 2.0, Olympus).

8.2.5.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Antes de analizar las muestras en el microscopio, las muestras fueron liofilizadas como se describe a continuación. Las microcápsulas fueron congeladas a una temperatura de -4 °C durante 2 h. En seguida, fueron transferidas al liofilizador (LABCONCO) a -40 °C y sometidas a una presión de 0.42 mBar durante 17 h. Posteriormente, las muestras fueron mantenidas a una temperatura de -4 °C hasta sus respectivos análisis. Las microcápsulas fueron pulverizadas en un mortero y se unieron al soporte del portamuestras con una cinta adhesiva de doble cara. Posteriormente, la morfología superficial de las microcápsulas fue observada en un microscopio electrónico de barrido (TM-1000, Hitachi). Las imágenes fueron tomadas de acuerdo a la magnificación requerida a temperatura ambiente y usando un voltaje de aceleración de 15 KV.

8.2.5.4 Espectroscopía en Infrarrojo (IR)

Los espectros de IR del alginato, mucílago y pectina en polvo; el aceite esencial de limón, las microcápsulas liofilizadas que contienen el aceite esencial de limón producidas con alginato y la mezcla de alginato con mucílago en 3:1, 2:1 y 1:1 fueron obtenidos con un rango de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} usando un espectrofotómetro FT-IR (Tensor 27, Brunker). Las muestras fueron pulverizadas con un mortero. Posteriormente, se prepararon las pastillas con bromuro de potasio (KBr) y la muestra mediante una prensa hidráulica a 7.5 ton. En el caso del aceite esencial de limón, una gota del aceite fue colocada directamente en el portamuestras. En cada espectro, se tomaron 32 escaneos con una resolución de 4 cm^{-1} .

8.2.5.5 Eficiencia de la encapsulación del aceite esencial de limón por Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

La cantidad de aceite encapsulado en las microcápsulas fue determinada en base a la técnica de Oliveira y *col.* (2014). En las lecturas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible (Jenway 7305). Para determinar la máxima absorbancia se realizó un barrido de longitud de la onda con una solución stock del aceite esencial de limón. El aceite esencial presentó un pico máximo en 310 nm. En la curva estándar, las mediciones se realizaron a 310 nm. Para la determinación del aceite esencial de limón encapsulado, 100 mg de la muestra fueron triturados en etanol. La solución fue dejada en reposo durante 4 h y se realizó la lectura correspondiente de la absorbancia. La concentración fue calculada usando la curva de calibración. En el anexo 1 se muestra un ejemplo del cálculo. El coeficiente de correlación obtenido (r^2) fue 0.9992. Todas las lecturas fueron realizadas a 310 nm. La solución de blanco consistió en microcápsulas de los polímeros preparadas sin aceite esencial; tales microcápsulas fueron tratadas del mismo modo que las microcápsulas con aceite esencial. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. La eficiencia de la encapsulación (EE) fue determinada en base a la ecuación 1, donde C_{total} corresponde a la cantidad total de aceite esencial encapsulado en ppm (concentración resultante obtenida con ayuda de la curva de calibración) y

$C_{inicial}$ es la cantidad inicial del aceite esencial en ppm. El resultado se expresó en porcentaje:

$$EE(\%) = \frac{C_{total}}{C_{inicial}} \times 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

8.3 Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre las medias para los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA y la prueba de Tukey mediante el programa JMP® versión 8.0, con un nivel de significancia del 5%.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Diagramas de fase

9.1.1. Biopolímeros individuales

Los estados físicos de un componente o un sistema pueden ser representados mediante un diagrama de fase o de estado, donde el comportamiento es observado en función de la temperatura, concentración, tiempo, presión, entre otros factores (Slade y *col.*, 1989). En el caso de la gelificación iónica, el diagrama de fase involucra la variación de la concentración de los agentes poliméricos y del ión ligante teniendo como objetivo definir la región donde ocurre la formación física del gel entre el polisacárido y el ión; identificando también la región donde el sistema permanece en la fase sol y la región donde ocurre la sinéresis. La construcción de los diagramas es esencial para definir la concentración del agente polimérico y de la sal de calcio, donde la región de formación del gel propicia la formación de las cápsulas y las microcápsulas (Mukai-Correa, 2003).

De acuerdo con Perrechil y *col.* (2011), los diagramas de fase de la κ -carragenina y el caseinato de sodio con κ -carragenina que interaccionaron con el cloruro de potasio, fueron construidos con el propósito de establecer las concentraciones apropiadas de la sal y de los biopolímeros para la formación de los geles, y elegir las condiciones para la preparación de los microgeles.

Los diagramas de fases obtenidos de los polímeros individuales presentaron las fases sol, gel y sinéresis; las cuales fueron señaladas en café, azul y verde, respectivamente (fig. 7). De acuerdo con Draget y *col.* (1991), la sinéresis está fuertemente relacionada con la cantidad de calcio presente en el gel. En particular, la sinéresis es prominente cuando el contenido de calcio excede la cantidad de residuos de ácido gulurónico en el gel. La sinéresis fue observada en altas concentraciones de Ca^{2+} , indicando que los geles están próximos al límite de estabilidad, mientras ocurre la separación de fases. La sinéresis es un caso especial de separación de fases (Kramarenko y Khoknlov, 1998).

El sistema de alginato presentó regiones bien definidas de sol, gel y sinéresis (fig. 7). La gelificación fue posible a partir de la concentración de 0.5%

del polisacárido con 0.5% del cloruro de calcio; la región del gel termina en 2.5 % de concentración de alginato y 2.0 % de CaCl_2 . En concentraciones elevadas de la sal de calcio se obtuvo la fase de sinéresis (fig. 7a). En la figura 7b, se presenta el diagrama de fase del alginato obtenido por Mukai-Correa (2003). Los resultados obtenidos en el diagrama de fase del alginato fueron similares a los obtenidos por Mukai-Correa (2003), los puntos que presentaron similitud entre ambos diagramas se encuentran señalados con rojo (fig. 7c).

En cuanto al sistema de mucílago, solo presentó la fase sol. En dicho sistema no hay formación de gel y tampoco de sinéresis (fig. 7d). De acuerdo con Medina-Torres y col. (2000), el mucílago extraído del nopal de la especie comercial *O. ficus-indica* no posee la capacidad de formar geles. Estos resultados confirman la naturaleza no gelificante del mucílago de *O. ficus indica*, al menos en el rango de concentraciones reportadas en este trabajo y por Medina-Torres y col. (2000).

De forma similar, los diagramas de fase de los sistemas formados con pectina pueden ser obtenidos mediante la observación visual. Las muestras de pectina que interaccionaron con el calcio fueron clasificadas como sol o gel después de dejarlas en reposo durante 48 h a 20 °C (Haghighi y Rezaei, 2012).

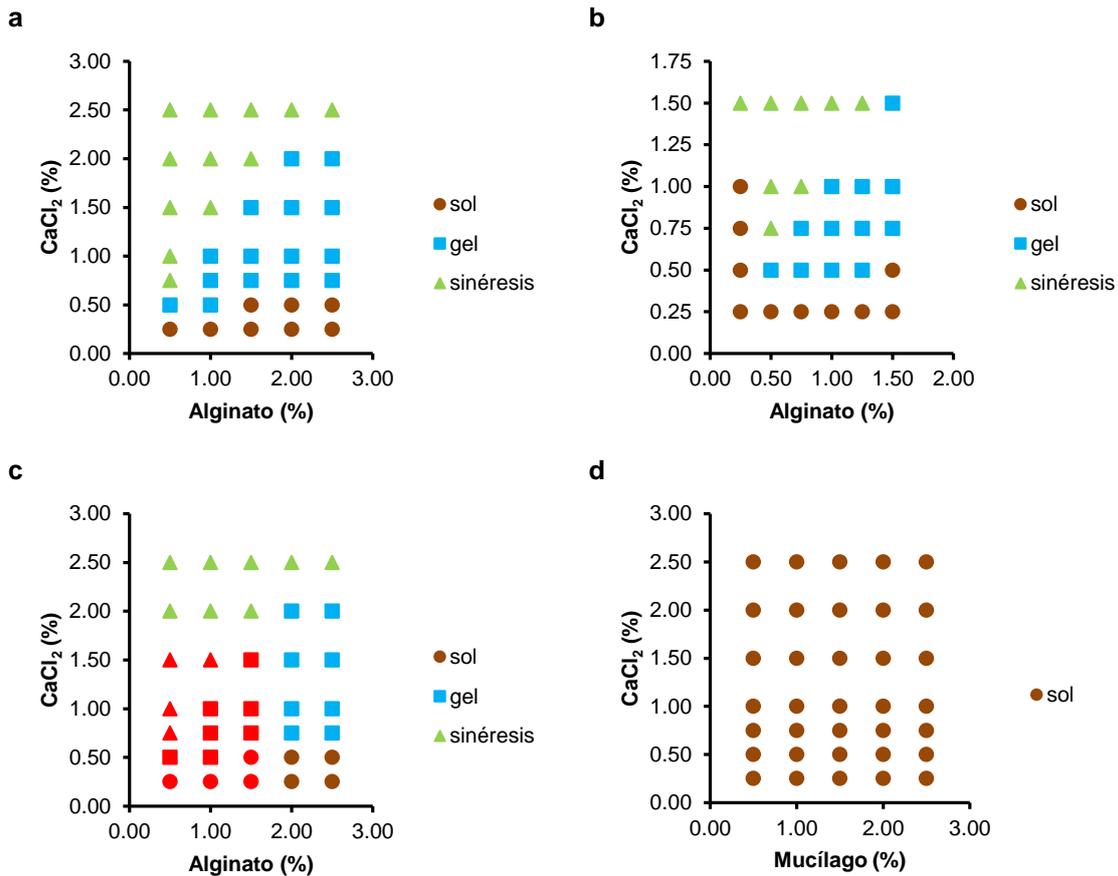


Figura 7. Diagramas de fase de polímeros individuales. Panel a, alginato (presente trabajo); Panel b, diagrama de fase de alginato obtenido por Mukai-Correa (2003); Panel c, puntos similares (señalados en rojo) en los diagramas de fase del alginato entre el presente trabajo y Mukai-Correa (2003); Panel d, mucílago.

La construcción de los diagramas de fase presentados en la figura 7 se realizó con el apoyo en las fotografías presentadas en las figuras 8 y 9, las cuales presentan las soluciones de alginato y las de mucílago que interaccionaron con la sal de calcio, en diversas concentraciones de la sal. La fase sol es una solución que se encuentra en la parte inferior de los tubos. Los geles formados se encuentran en la parte superior de los tubos. La fase de sinéresis se observa cuando cierta cantidad de líquido queda en la parte inferior y el gel en la parte superior del tubo.

La formación de las fases depende de la concentración del polímero y de la sal de calcio. En general, los geles de alginato presentaron pequeños grumos con coloración blanquizca (fig. 8). A medida que se incrementó la concentración de calcio en la solución se observó una tendencia de mayor

aglomeración. Por otra parte, el sistema de mucílago son soluciones que presentan un color verde claro, solo presentan la fase sol (fig. 9).

Como dato adicional, se encontró otro método similar al utilizado en el presente trabajo para construir los diagramas de fase en sistemas formados por pectina y calcio. La determinación de las fases también se realizó por medio de la observación visual. Las muestras preparadas con pectina y calcio fueron colocadas en tubos de ensayo. Estos fueron inclinados ligeramente donde se pudo apreciar las diferentes fases del sistema. Si la muestra fluía, se consideró como la fase sol. Si la muestra no fluye y no se deforma por su propio peso, el sistema se consideró como gel. La sinéresis fue detectada por la presencia de agua en la superficie del gel (Cardoso y *col.*, 2003).

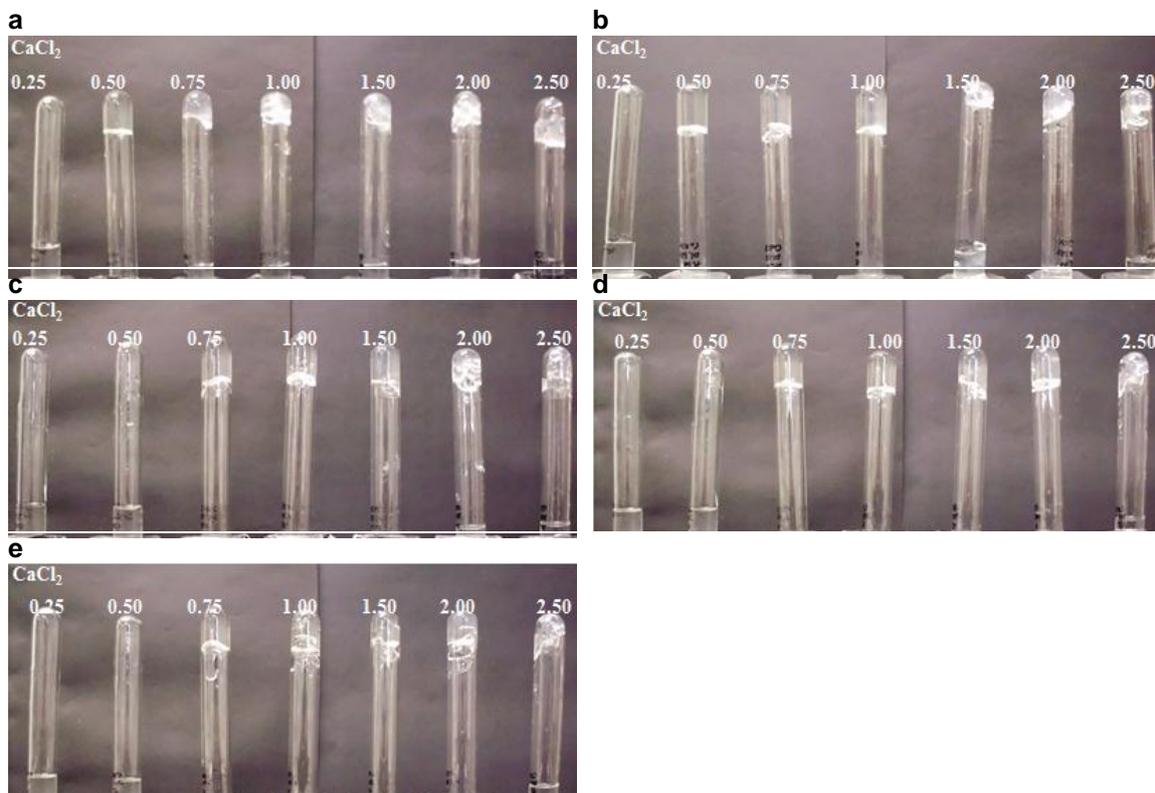


Figura 8. Fotografías del sistema alginato. Panel a, 0.5%; Panel b, 1.0%; Panel c, 1.5%; Panel d, 2.0%; Panel e, 2.5%.

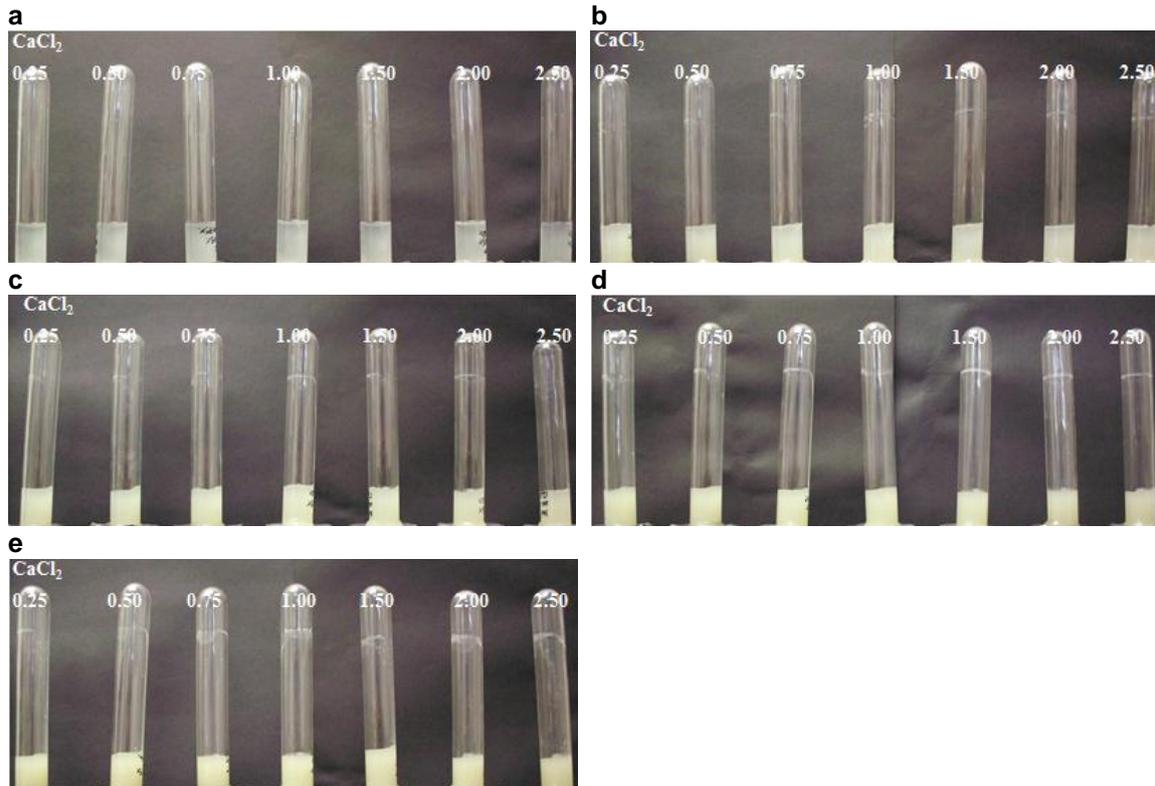


Figura 9. Fotografías del sistema mucílago. Panel a, 0.5%; Panel b, 1.0%; Panel c, 1.5%; Panel d, 2.0%; Panel e, 2.5%.

9.1.2. Diagramas de fase de las mezclas binarias

La mezcla de alginato-mucílago se preparó en diversas proporciones para determinar las condiciones donde ocurre la formación de los geles en base a la concentración de la mezcla polimérica y de la sal de calcio. Los diagramas de fases obtenidos de las mezclas binarias presentaron las fases sol, gel y sinéresis; las cuales fueron señaladas en café, azul y verde, respectivamente (fig. 10). Las mezclas binarias presentaron un comportamiento semejante al de los polímeros individuales, siendo marcada la influencia de un polímero en relación al otro. Esta influencia provocó un aumento en los puntos referentes al área de formación de gel de la mezcla alginato-mucílago en las proporciones 3:1, 2:1 y 1:1. Los sistemas de alginato-mucílago en las proporciones 3:1 (fig. 10a), 2:1 (fig. 10b) y 1:1 (fig. 10c) presentaron un comportamiento de fases semejante al diagrama del alginato (fig. 7a), sugiriendo de este modo mayor influencia ejercida por el alginato para estos sistemas.

Sin embargo, el sistema de alginato (fig. 7a) y los sistemas de alginato-mucílago en 3:1 (fig. 10a), 2:1 (fig. 10b) y 1:1 (fig. 10c) presentaron ciertas diferencias en los puntos de gelificación y los de sinéresis. Esto puede deberse a que los sistemas alginato-mucílago (fig. 10a-c) presentan una disminución de la cantidad de alginato (contiene ácido gulurónico), por lo que al interactuar con el Ca^{2+} existirá un exceso de la cantidad de calcio. En particular, la sinéresis es prominente cuando el contenido de calcio excede la cantidad de residuos de ácido gulurónico en el gel (Draget y *col.*, 1990).

Por otro lado, los sistemas de alginato-mucílago en las proporciones 1:2 (fig. 10d) y 1:3 (fig. 10e) presentaron un comportamiento semejante al diagrama del mucílago (fig. 7b). Los sistemas señalados presentaron la fase sol con ausencia de la gelificación, sugiriendo de este modo mayor influencia ejercida por el mucílago para dichos sistemas.

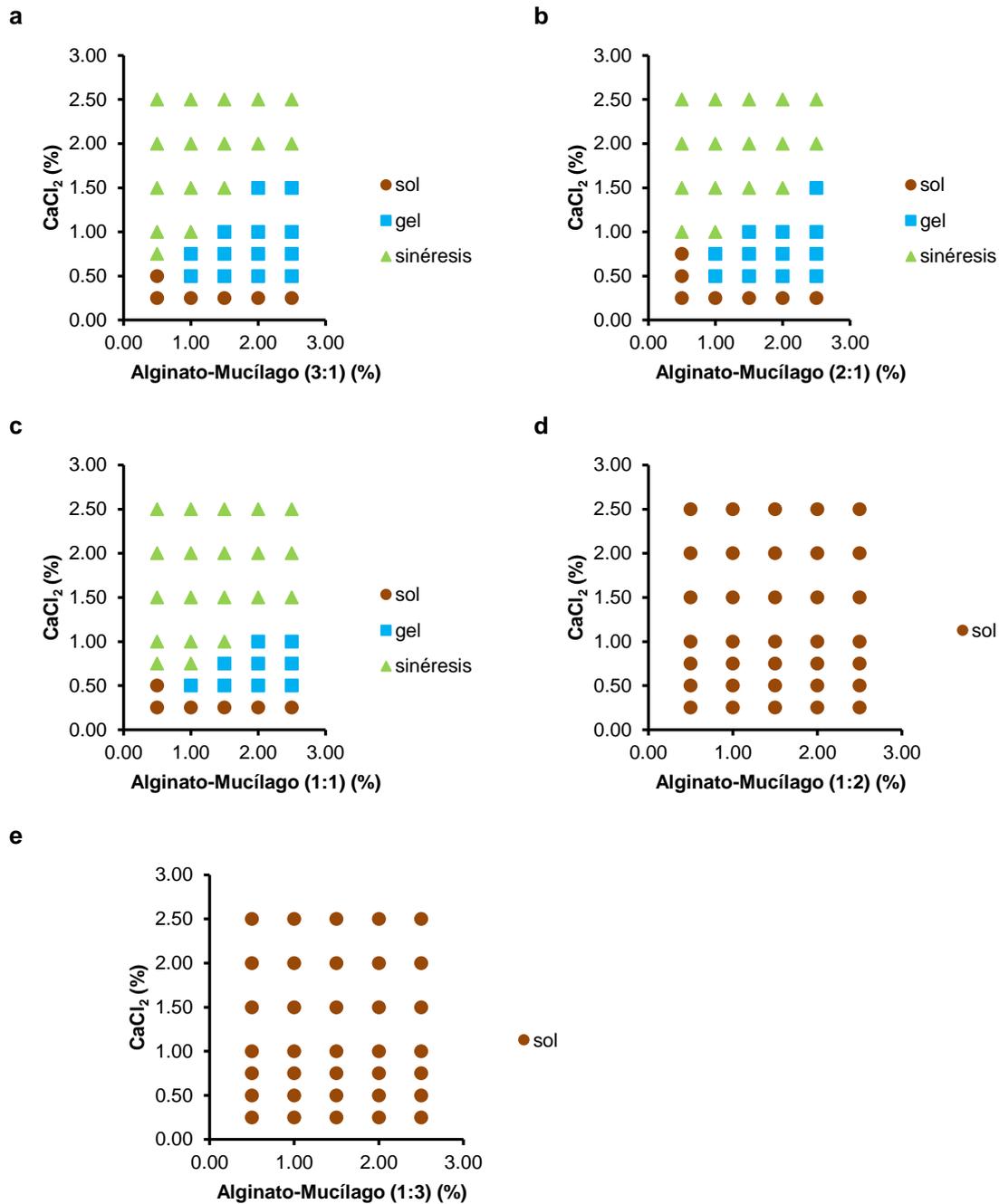


Figura 10. Diagramas de fase de los sistemas alginato-mucílago. Panel a, alginato-mucílago (3:1) (%); Panel b, alginato-mucílago (2:1) (%); Panel c, alginato-mucílago (1:1) (%); Panel d, alginato-mucílago (1:2) (%); Panel e, alginato-mucílago (1:3) (%).

Del mismo modo, la construcción de los diagramas de fase presentados en la figura 10 se realizó con el apoyo en las fotografías presentadas en las figuras 11, 12, 13, 14 y 15; las cuales presentan las soluciones de alginato-mucílago que interaccionaron con la sal de calcio en diversas concentraciones.

El criterio en la determinación de las fases aplicado en las figuras 8 y 9 fue utilizado para las mezclas binarias.

En general, los geles obtenidos en los sistemas alginato-mucílago en las proporciones 3:1 (fig. 11), 2:1 (fig. 12) y 1:1 (fig. 13) presentaron pequeños grumos con coloración blanquizca y verde claro dependiendo de la concentración de mucílago. Los sistemas alginato-mucílago en las proporciones 1:2 (fig. 14) y 1:3 (fig. 15) solo presentaron la fase sol.

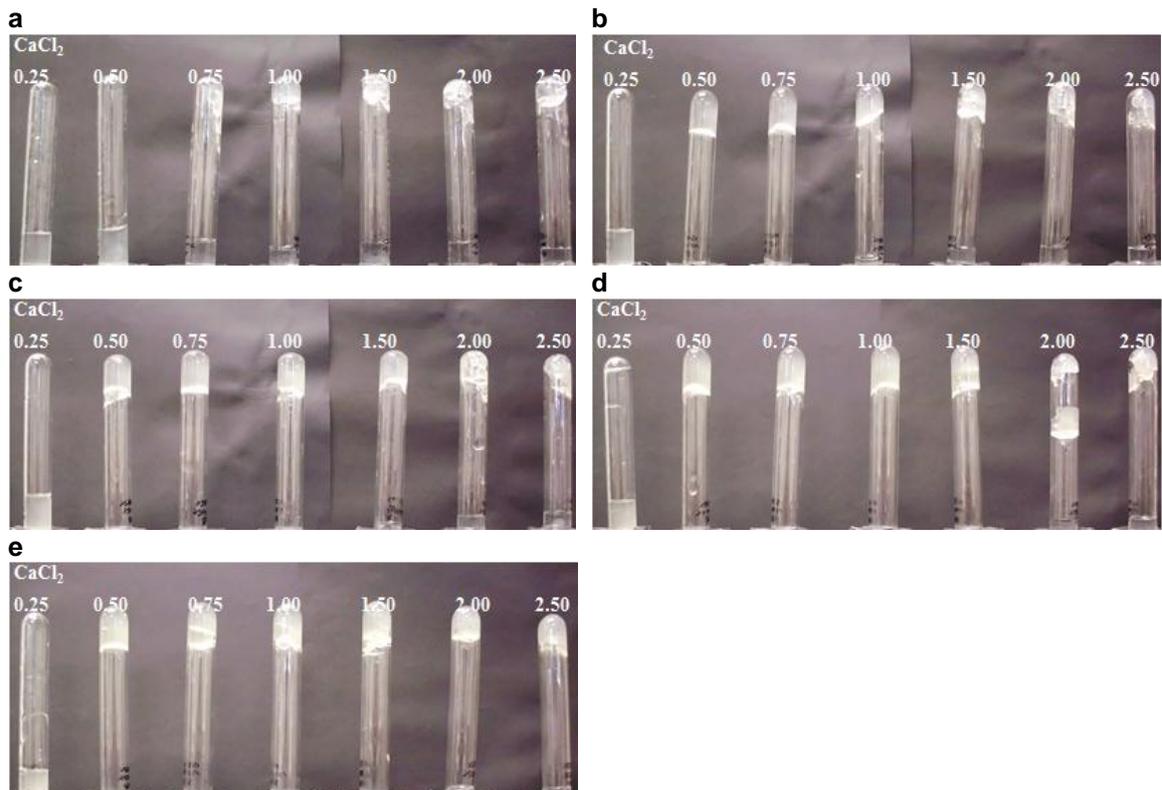


Figura 11. Fotografías del sistema alginato-mucílago (3:1). Panel a, 0.5%; Panel b, 1.0%; Panel c, 1.5%; Panel d, 2.0%; Panel e, 2.5%.

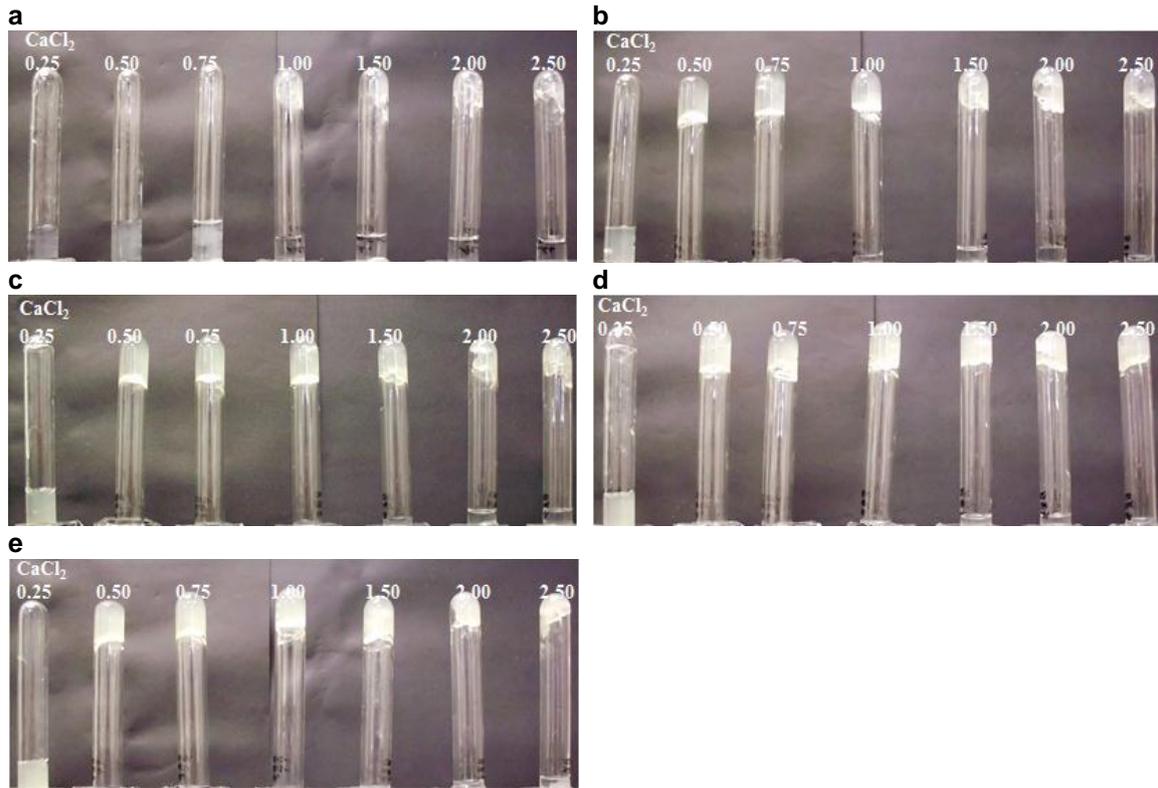


Figura 12. Fotografías del sistema alginato-mucílago (2:1). Panel a, 0.5%; Panel b, 1.0%; Panel c, 1.5%; Panel d, 2.0%; Panel e, 2.5%.

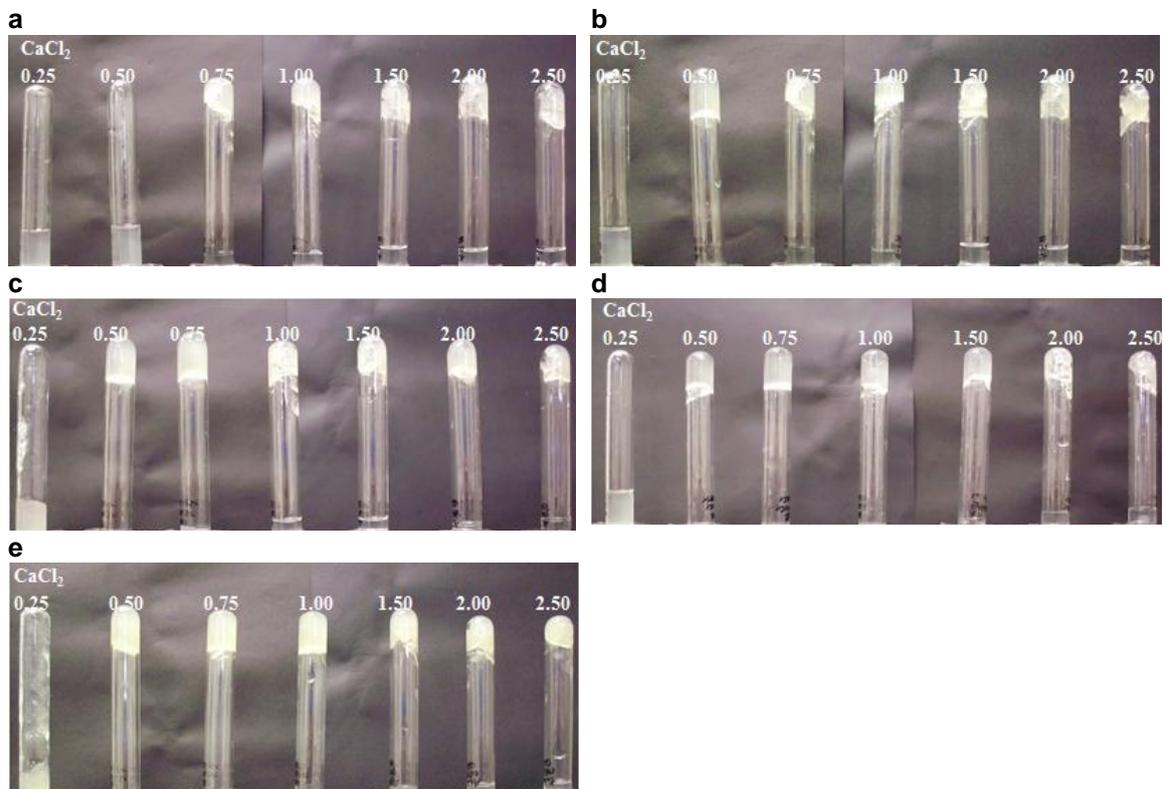


Figura 13. Fotografías del sistema alginato-mucílago (1:1). Panel a, 0.5%; Panel b, 1.0%; Panel c, 1.5%; Panel d, 2.0%; Panel e, 2.5%.

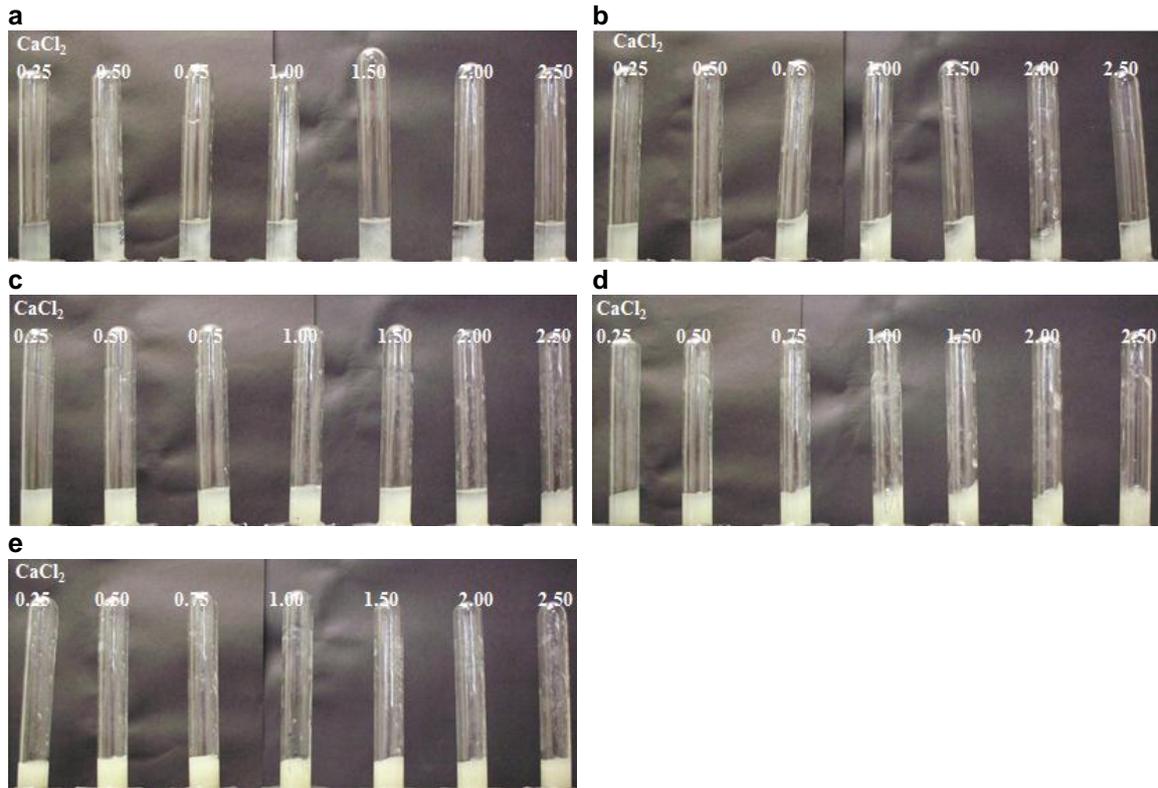


Figura 14. Fotografías del sistema alginato-mucílago (1:2). Panel a, 0.5%; Panel b, 1.0%; Panel c, 1.5%; Panel d, 2.0%; Panel e, 2.5%.

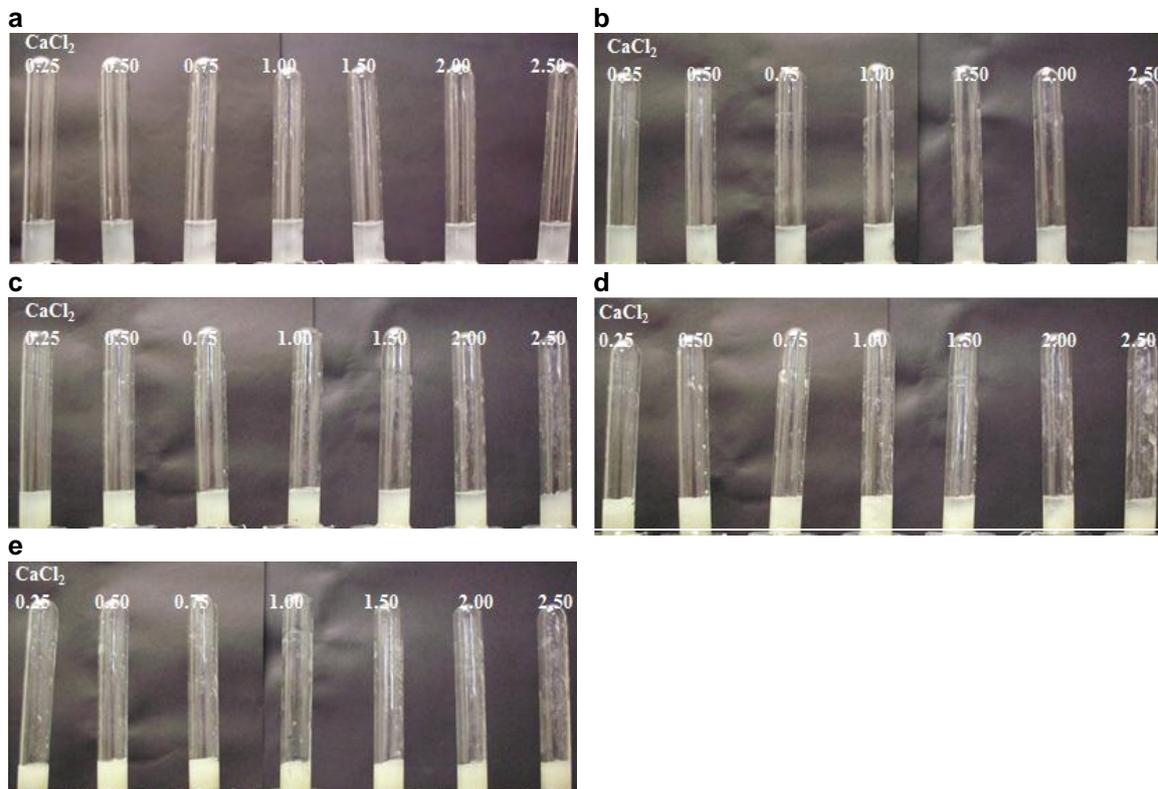


Figura 15. Fotografías del sistema alginato-mucílago (1:3). Panel a, 0.5%; Panel b, 1.0%; Panel c, 1.5%; Panel d, 2.0%; Panel d, 2.5%.

En base a los diagramas de fase presentados en la figura 10, los sistemas de alginato-mucílago en las proporciones 1:2 y 1:3 no presentaron la gelificación bajo ninguna condición, por lo tanto, no son aptos para la formación de las microcápsulas y fueron descartados. Además, la concentración de cloruro de calcio al 1.0% fue elegida porque el sistema puro (alginato) y los sistemas mixtos (alginato-mucílago) presentaron la formación de los geles bajo esta concentración de la sal. Al seleccionar dicha concentración de la sal, los geles fueron producidos a una concentración de los polímeros al 2.0 y 2.5%. De acuerdo con Perrechil y col. (2011), los sistemas de κ -carragenina y caseinato de sodio con κ -carragenina formaron geles cuando la concentración de los polímeros fue de 0.5 a 2.0% (p/v) y cloruro de potasio de 0.5 a 2.0% (p/v). Los autores eligieron la concentración de 0.5% de la sal para la preparación de los microgeles, porque todos los sistemas presentaron la formación de los geles bajo dicha concentración de la sal.

Para estudiar el efecto de la mezcla alginato-mucílago en el encapsulamiento del aceite esencial y compararlo con el sistema de alginato individual, se utilizaron las formulaciones de los sistemas presentadas en la tabla 2. Para la formación de las microcápsulas, todas las formulaciones fueron estandarizadas con una concentración de la solución de cloruro de calcio de 1.0%.

Tabla 2. Formulaciones de los sistemas. Alginato, AL; Alginato-Mucílago, AL-MU.

Formulación	Sistema	Proporción	Concentración (%)
1	AL	-	2.0
2	AL	-	2.5
3	AL-MU	3:1	2.0
4	AL-MU	3:1	2.5
5	AL-MU	2:1	2.0
6	AL-MU	2:1	2.5
7	AL-MU	1:1	2.0
8	AL-MU	1:1	2.5

9.2 Preparación de las microcápsulas

Las microcápsulas fueron preparadas de acuerdo a la técnica desarrollada por Mukai-Correa (2003), la cual fue diseñada para obtener microcápsulas por gelificación iónica con un tamaño medio de 150 μm y una distribución homogénea del aceite encapsulado. Sin embargo, se realizaron algunas modificaciones a la técnica las cuales se describen en el apartado 6.2.4. Se realizaron unas pruebas preliminares donde se determinó descartar la preparación de las microcápsulas al 2.5% de concentración del polímero, debido a la dificultad para alcanzar el flujo requerido.

Utilizando el dispositivo de atomización, la morfología y el tamaño de las microcápsulas está determinado por la presión de aire, altura del atomizador y el flujo de la solución. Se estudió el efecto de estos factores sobre el tamaño y morfología de las microcápsulas del alginato con la finalidad de obtener microcápsulas con una forma regular (la mayoría presenten la forma esférica) y un rango de tamaño pequeño (1-50 μm).

La esfericidad de las cuentas de alginato tiene un efecto notable en la estabilidad mecánica y química de las mismas. Se ha reportado que la forma no esférica de las cuentas reduce la fuerza del gel en comparación con las cuentas esféricas. En las cuentas no esféricas y con la forma de lágrima se pueden encontrar roturas y grietas, resultando en la liberación del encapsulante. Además, las cuentas de alginato con forma esférica mejoran la calidad estética de lo que podría ser una característica deseable para los productos farmacéuticos y alimenticios (Lee y *col.*, 2013).

Por otro lado, la distribución de tamaño y morfología superficial son criterios importantes para evaluar las características físicas de las micropartículas de alginato en aplicaciones farmacéuticas (Cui y *col.*, 2001).

9.2.1 Efecto de la presión en la morfología y en el tamaño de las microcápsulas

Uno de los factores más importantes para obtener microcápsulas con un tamaño pequeño en el proceso de atomización, es la presión de aire. La desintegración del líquido consiste en incrementar su área superficial, generalmente de la forma de hoja o barra cilíndrica hasta que se el líquido se

desintegra en forma de gotas (Herrero y col., 2006). Esto se puede lograr mediante la aplicación de aire a presión.

Para evaluar el efecto de la presión en la morfología y en el tamaño de las microcápsulas, la distancia y el flujo se mantuvieron constantes como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Variación de la presión de aire en la preparación de las microcápsulas de alginato.

Presión (lb/in²)	Distancia (cm)	Flujo (ml/min)
7.5	12	9
15	12	9
22.5	12	9

El efecto de la presión de aire sobre la morfología de las microcápsulas de alginato se muestra en las figuras 16, 17 y 18. Con la presión de trabajo de 7.5 lb/in², la mayoría de las microcápsulas presentaron un prolongamiento en una de las extremidades con forma de cola (fig. 16). Dicho efecto fue observado por Mukai-Correa (2003) con las microcápsulas de alginato producidas a una presión de 8.5 lb/in². Sin embargo, las microcápsulas producidas con una presión de 15 lb/in² presentaron menores irregularidades y en su mayoría presentaron un formato esférico (fig. 17). De acuerdo con Mukai-Correa (2003), las microcápsulas de alginato producidas a 12.8 lb/in² presentan en su mayoría un formato esférico y una distribución de tamaño muy homogénea. Con la presión de trabajo de 22.5 lb/in², las microcápsulas presentaron en su mayoría una forma esférica (fig. 18).

Para explicar el efecto de la presión de aire en la morfología de las microcápsulas se propone la siguiente explicación. Cuando la gota de líquido (alginato) se despega de un capilar, se aparece en forma de lágrima. Debido al efecto de la tensión superficial, la forma de la gota se vuelve esférica. Existe una distorsión de la forma de la gota cuando se varía la velocidad de aire. Cuando la velocidad de aire es baja, el tiempo es insuficiente para que las gotas adopten la forma esférica cuando caen antes de entrar en contacto con la solución de calcio debido a que las gotas fueron relativamente grandes y fueron aceleradas hacia abajo por medio de una velocidad de aire baja (Chan y col., 2012).

En el caso contrario, la elevada velocidad de aire puede aumentar el grado de impacto cuando las gotas del líquido chocan con la solución de calcio y causar la deformación de las gotas. Sin embargo, las gotas del líquido producidas a elevada velocidad de aire fueron más pequeñas en tamaño, esto modera el grado de impacto y por lo tanto, las partículas de alginato producidas fueron más redondas en su forma (Chan y col., 2012).

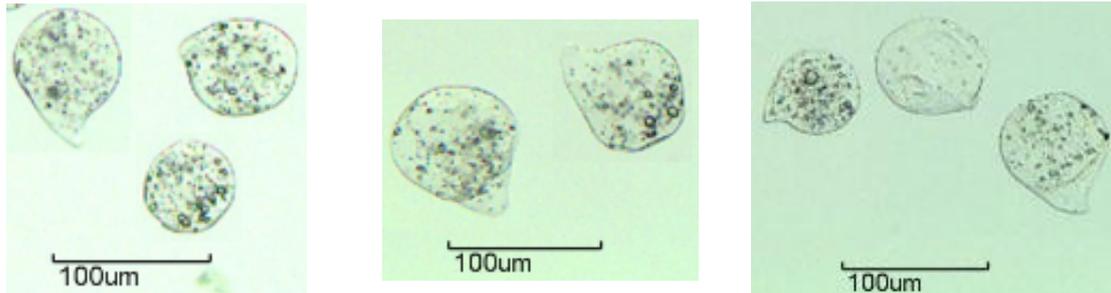


Figura 16. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 7.5 lb/in². La barra indica una distancia de 100 µm. Lente objetivo de 10X.

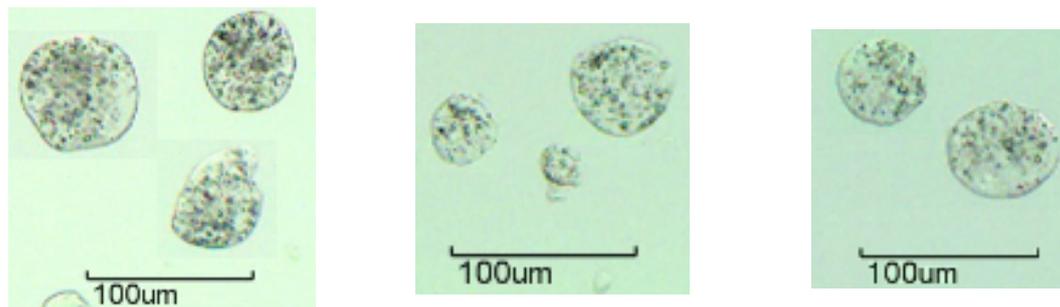


Figura 17. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 15 lb/in². La barra indica una distancia de 100 µm. Lente objetivo de 10X.

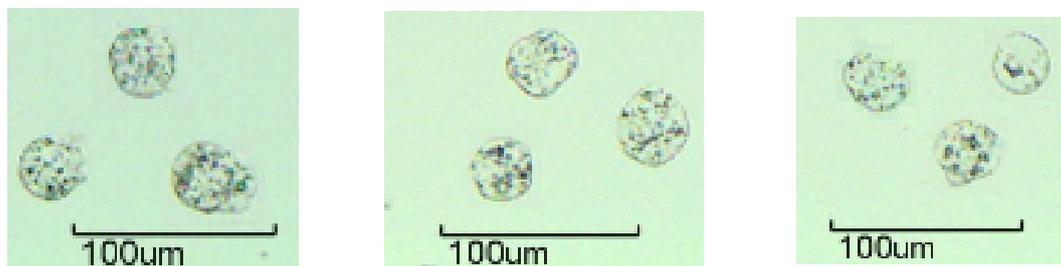


Figura 18. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 22.5 lb/in². La barra indica una distancia de 100 µm. Lente objetivo de 10X.

El efecto de la presión de aire en el tamaño de las microcápsulas de alginato se muestra en la tabla 4 y en la figura 19. Mientras la presión de aire

se incrementó, el tamaño de las microcápsulas presentó una tendencia a disminuir debido a que las gotas de la solución de alginato se vuelven más pequeñas. La media de los tamaños de las microcápsulas presentó diferencias significativas para las diferentes presiones de trabajo (tabla 4 y fig. 19). El efecto de la presión de aire en el tamaño y morfología de las microcápsulas de alginato fue estudiado por Cui y col. (2001); los autores reportaron que el incremento de la presión de aire influye en la reducción del tamaño de las microcápsulas de alginato. De acuerdo con Kwok y col. (1991), las microcápsulas de alginato con un rango de tamaño entre 5 y 15 μm pueden ser producidas con una presión de aire de 40 lb/in^2 .

Tabla 4. Efecto de la presión de aire en el tamaño de las microcápsulas de alginato. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$). El tamaño de las microcápsulas muestran los valores promedio con su desviación estándar ($n=3$).

Presión (lb/in^2)	Tamaño microcápsulas (μm)
7.5	75.77 \pm 2.16 ^a
15	57.69 \pm 1.89 ^b
22.5	32.04 \pm 2.07 ^c

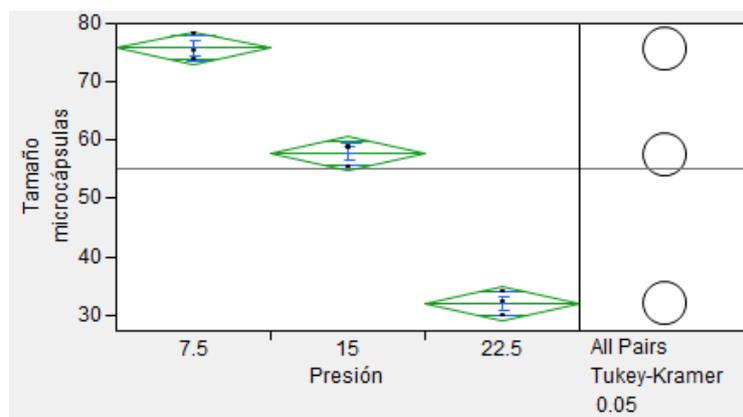


Figura 19. Análisis estadístico del efecto de la presión de aire en el tamaño de las microcápsulas de alginato.

La distribución de tamaño de las microcápsulas se presentó en forma de histogramas en la figura 20. Para la presión de 7.5 lb/in^2 , el histograma presentó una distribución de tamaño de 39 a 126 μm , la barra de 74 μm presenta la mayor frecuencia de los datos (fig. 20a). Para la presión de 15 lb/in^2 , el histograma presentó una distribución de tamaño de 25 a 87 μm , las

barras de 50, 56 y 62 μm presentan la mayor frecuencia de los datos (fig. 20b). En el caso de la presión de 22.5 lb/in², el histograma presentó una distribución de tamaño de 13 a 69 μm , las barras de 24 y 30 μm presentan la mayor frecuencia de los datos. Además, el histograma presentó una distribución de tamaño más estrecha (menor dispersión de los datos) (fig. 20c). Los histogramas presentaron una distribución unimodal con las barras máximas que representan el tamaño medio de las microcápsulas (fig. 20).

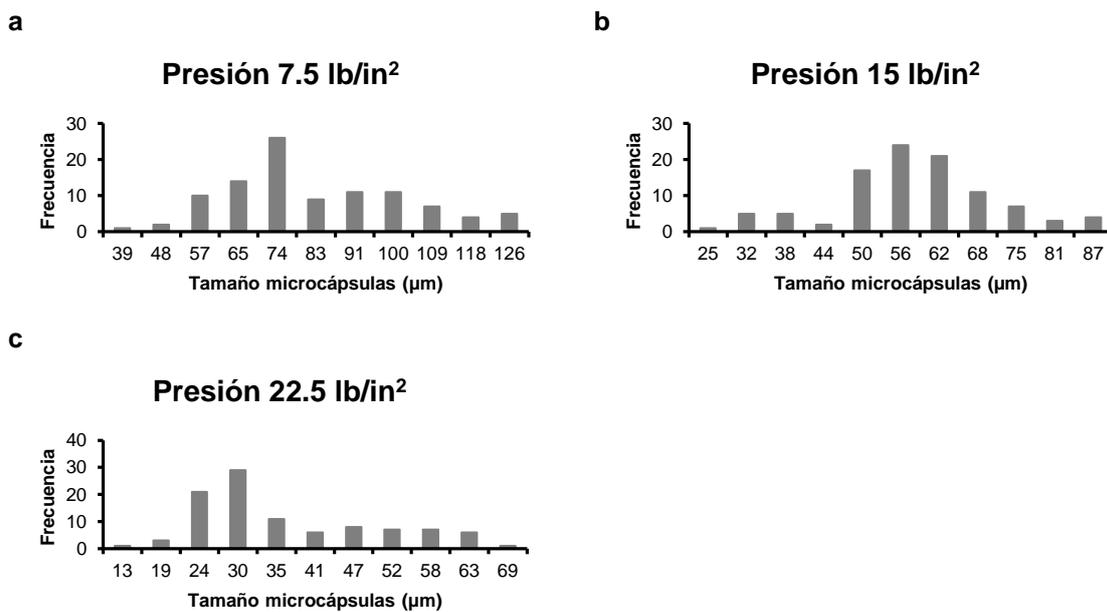


Figura 20. Efecto de la presión de aire en la distribución de tamaño de las microcápsulas de alginato.

9.2.2 Efecto de la distancia de atomización en la morfología y en el tamaño de las microcápsulas

La distancia entre el dispositivo de atomización y la solución de cloruro de calcio es un factor importante en la preparación de microcápsulas de alginato utilizando el método de atomización con aire (Cui y col., 2001). En la práctica, la distancia de atomización es frecuentemente determinada mediante la prueba y error ajustando la distancia entre el dispositivo de atomización y el baño con la solución de calcio.

Para evaluar el efecto de la distancia de atomización en la morfología y en el tamaño de las microcápsulas, la presión y el flujo se mantuvieron constantes como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Variación de la distancia de atomización en la preparación de las microcápsulas de alginato.

Presión (lb/in²)	Distancia (cm)	Flujo (ml/min)
7.5	12	9
7.5	20	9
7.5	28	9

El efecto de la distancia de atomización en la morfología de las microcápsulas de alginato se muestra en las figuras 21, 22 y 23. En las pruebas de pulverización, para la distancia de 12 cm, las microcápsulas presentaron la forma esférica y un prolongamiento en una de las extremidades con forma de cola (fig. 21). En este sentido, Cui y col. (2001) reportaron que el fenómeno de agregación ocurrió en el baño con la solución CaCl₂ cuando la distancia fue muy corta (15 cm) debido a la falta de la atomización apropiada. Por otra parte, las microcápsulas producidas a 20 cm presentaron menores irregularidades y en su mayoría presentaron un formato esférico (fig. 22). De acuerdo con Mukai-Correa (2003), las microcápsulas de alginato producidas a 18 cm presentaron en su mayoría un formato esférico. Con la distancia de 28 cm, las microcápsulas presentaron una forma esférica, oval y un prolongamiento en una de las extremidades formado una “lágrima” (fig. 23). De acuerdo con Mukai-Correa (2003), las microcápsulas de alginato producidas a 28 cm presentaron una forma esférica y de óvalo. Además, en la preparación de las microcápsulas a 28 cm, se observó la pérdida de cierta cantidad del material atomizado en la pared de la tina de plástico que contenía la solución de cloruro de calcio (fig. 24). Por otra parte, las gotas de alginato podrían perderse si la distancia de atomización estuviera más allá del rango apropiado o si la presión de aire es muy elevada (Cui y col., 2001).

De acuerdo con Lee y col. (2013), la distancia de colecta (entre el dispositivo de extrusión y la solución de calcio) de las cuentas de alginato producidas por extrusión presenta un efecto mayor en la forma de las cuentas. En general, las distancias de colecta pequeñas tienden a producir cuentas de alginato que presentan colas cortas y las partículas poseen forma de lágrima (la partícula es redonda en el fondo y estrecha en la parte superior con una

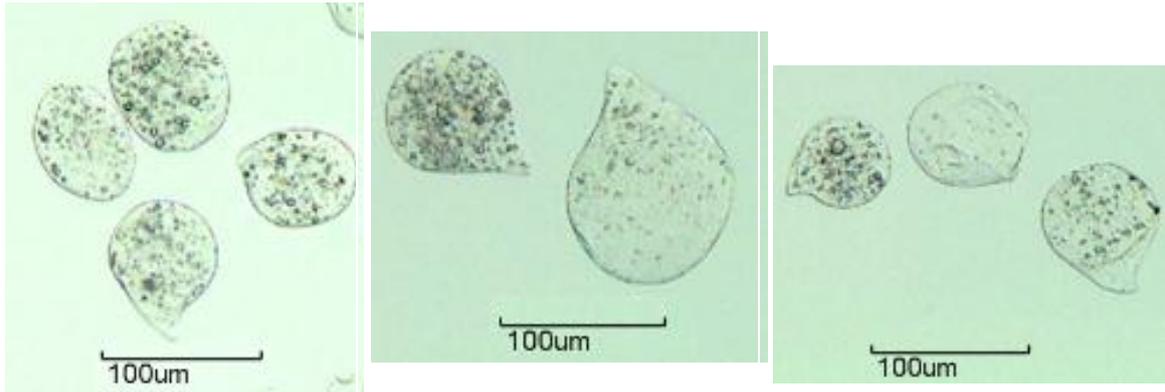


Figura 21. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 12 cm. La barra indica una distancia de 100 μm . Lente objetivo de 10X.

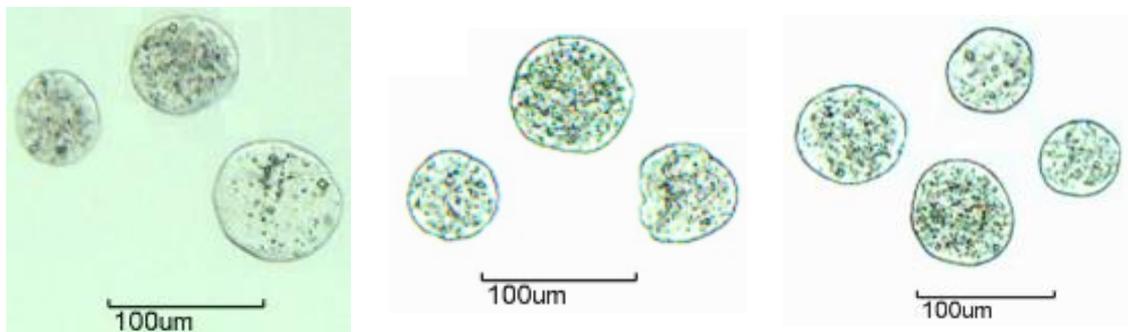


Figura 22. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 20 cm. La barra indica una distancia de 100 μm . Lente objetivo de 10X.

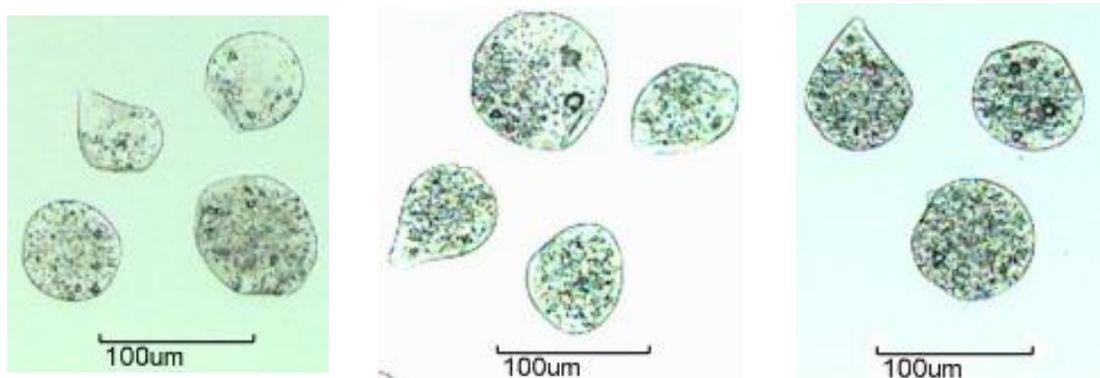


Figura 23. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 28 cm. La barra indica una distancia de 100 μm . Lente objetivo de 10X.

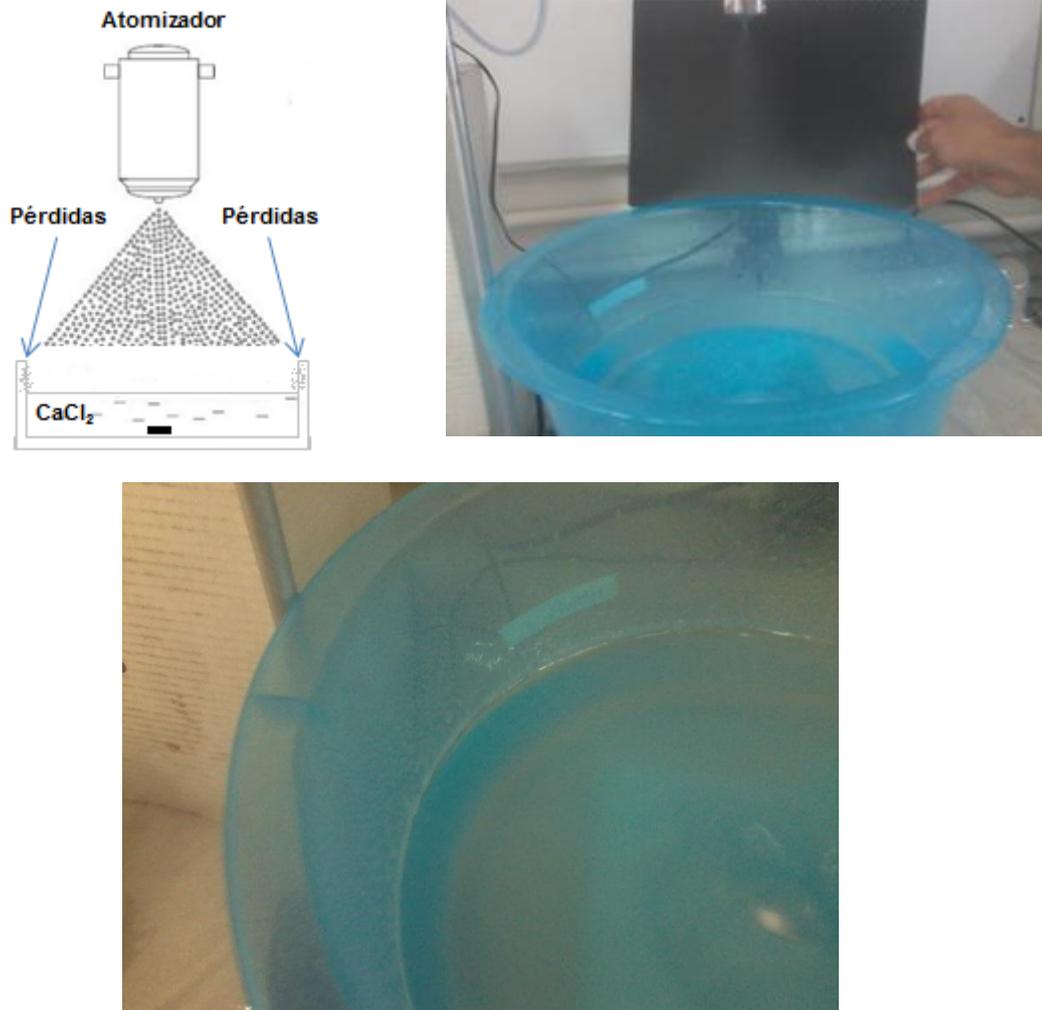


Figura 24. Microcápsulas de alginato producidas a 28 cm.

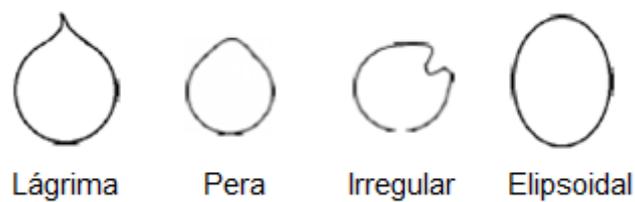


Figura 25. Forma de las cuentas de alginato producidas por extrusión. Tomada de Lee y col. (2013).

El efecto de la distancia de atomización en el tamaño de las microcápsulas producidas con alginato se muestra en la tabla 6 y en la figura 26. La distancia de atomización no tiene efecto sobre el tamaño de las microcápsulas de alginato. La media de los tamaños de las microcápsulas no presentó diferencias significativas para las diferentes distancias de trabajo (tabla 6 y fig. 26). El efecto de la distancia de atomización en el tamaño y

morfología de las microcápsulas de alginato fue estudiado por Cui *y col.* (2001); los autores reportaron que no hay relación directa entre la distancia de atomización y el tamaño de las microcápsulas de alginato. De acuerdo con Lee *y col.* (2013), la distancia de colecta (entre el dispositivo de extrusión y la solución de calcio) de las cuentas de alginato producidas por extrusión presentaron un efecto mínimo en el tamaño de las cuentas.

Tabla 6. Efecto de la distancia de atomización en el tamaño de las microcápsulas de alginato. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$). El tamaño de las microcápsulas muestran los valores promedio con su desviación estándar ($n=3$).

Distancia (cm)	Tamaño microcápsulas (μm)
12	75.77 ± 2.16^a
20	73.53 ± 1.38^a
28	72.32 ± 1.81^a

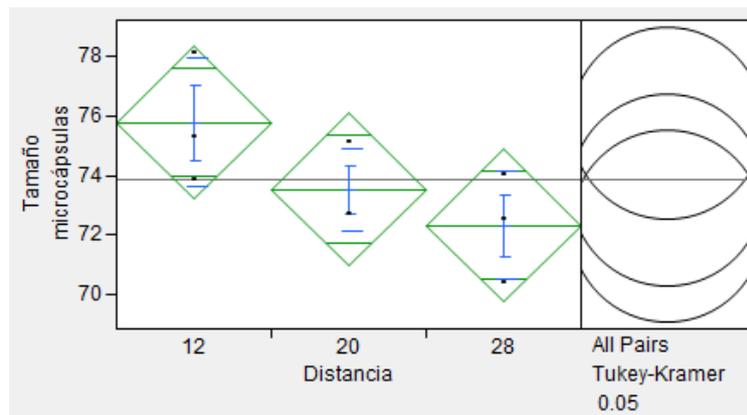


Figura 26. Análisis estadístico del efecto de la distancia de atomización en el tamaño de las microcápsulas de alginato.

La distribución de tamaño de las microcápsulas se presentó en forma de histogramas en la figura 27. Para la distancia de 12 cm, el histograma presentó una distribución de tamaño de 39 a 126 μm , la barra de 74 μm presenta la mayor frecuencia de los datos (fig. 27a). Para la distancia de 20 cm, el histograma presentó una distribución de tamaño de 47 a 118 μm , las barras de 68, 75 y 82 μm presentan la mayor frecuencia de los datos (fig. 27b). En el caso de la distancia de 28 cm, el histograma presentó una distribución de tamaño de 48 a 108 μm , las barras de 72, 78 y 84 μm presentan la mayor frecuencia de los datos (fig. 27c). Los histogramas presentaron amplia

dispersión de los datos con una distribución unimodal, las barras máximas representan el tamaño medio de las microcápsulas (fig. 27).

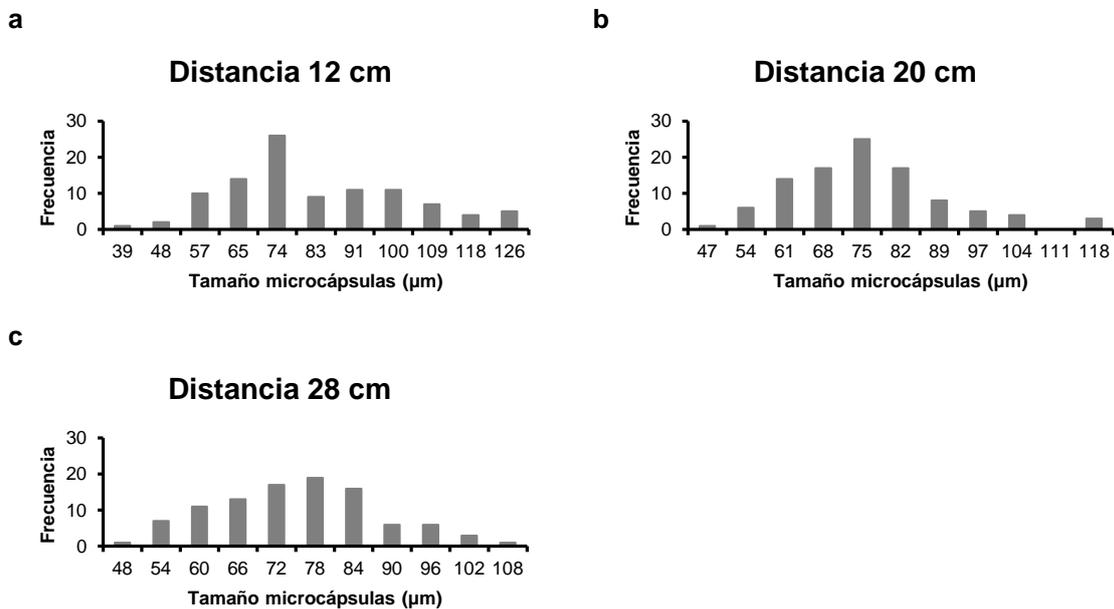


Figura 27. Efecto de la distancia de atomización en la distribución de tamaño de las microcápsulas de alginato.

9.2.3 Efecto del flujo en la morfología y en el tamaño de las microcápsulas

Para evaluar el efecto del flujo en el tamaño y morfología de las microcápsulas, la presión y la distancia de atomización se mantuvieron constantes como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Variación del flujo en la preparación de las microcápsulas de alginato.

Presión (lb/in ²)	Distancia (cm)	Flujo (ml/min)
7.5	12	3
7.5	12	6
7.5	12	9

El efecto del flujo en la morfología de las microcápsulas de alginato se muestra en las figuras 28, 29 y 30. En las pruebas, para el flujo de 3 y 6 ml/min, las microcápsulas presentaron menores irregularidades y la mayoría de las microcápsulas presentaron una forma esférica (fig. 28 y 29). Por otra parte, con

el flujo de 9 ml/min, las microcápsulas presentaron una forma esférica y un prolongamiento en una de las extremidades formado una “lágrima” (fig. 30). En este experimento se utilizó una presión baja (7.5 lb/in²) y una distancia corta (12 cm). Se observó que las microcápsulas producidas a 9 ml/min presentaron prolongamientos en forma de “colas”, dicha morfología puede ser debido a que el tiempo es insuficiente para que las gotas adopten la forma esférica cuando caen antes de entrar en contacto con la solución de calcio. Además, las gotas fueron relativamente grandes y fueron aceleradas hacia abajo por medio de una velocidad de aire baja (Chan y col., 2012). Por otra parte, las microcápsulas producidas a 3 y 6 ml/min presentaron en su mayoría la forma esférica.

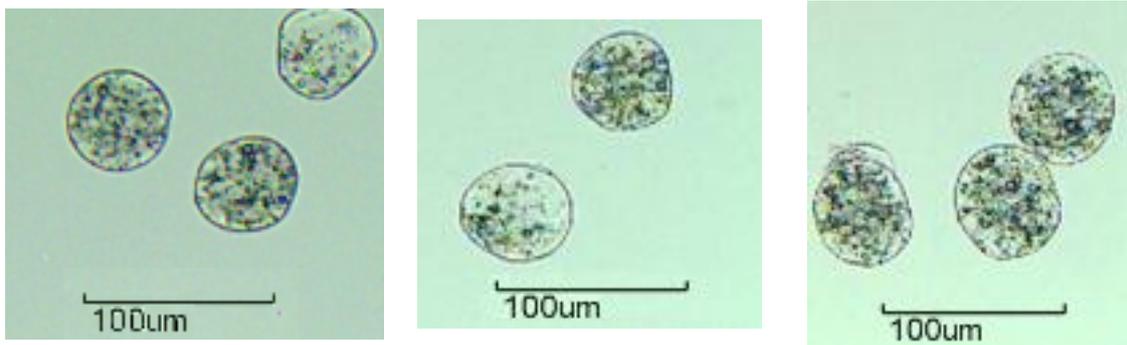


Figura 28. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 3 ml/min. La barra indica una distancia de 100 μ m. Lente objetivo de 10X.

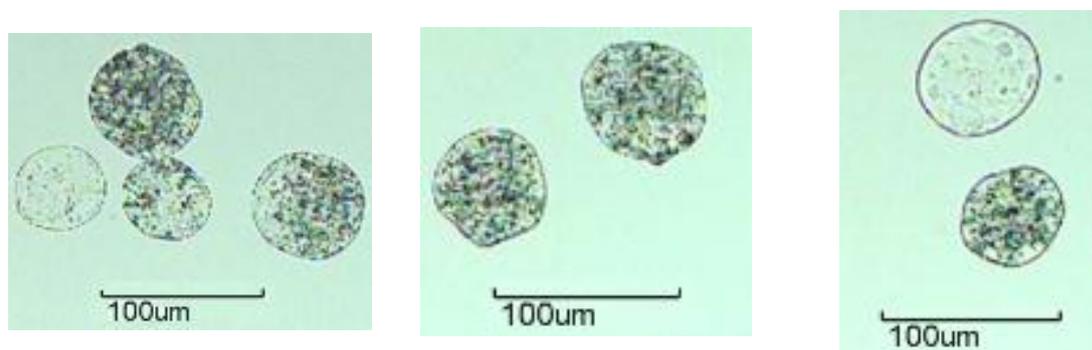


Figura 29. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 6 ml/min. La barra indica una distancia de 100 μ m. Lente objetivo de 10X.

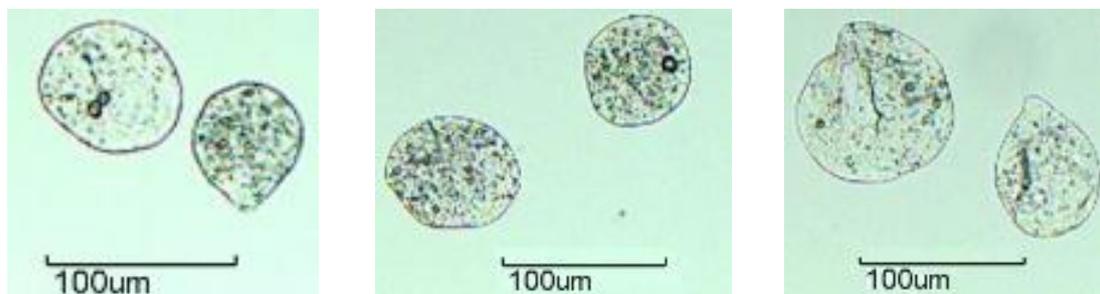


Figura 30. Morfología de las microcápsulas de alginato producidas a 9 ml/min. La barra indica una distancia de 100 μ m. Lente objetivo de 10X.

El efecto de flujo en el tamaño de las microcápsulas producidas con alginato se muestra en la tabla 8 y en la figura 31. Existe una relación directa entre el flujo y el tamaño de las microcápsulas; mientras el flujo de la emulsión se incrementó, el tamaño de las microcápsulas de alginato presentó una tendencia a incrementarse. La media de los tamaños de las microcápsulas presentó diferencias significativas para los diferentes flujos evaluados (tabla 8 y fig. 31). De acuerdo con Cui y *col.* (2001) y Herrero y *col.* (2006), el tamaño de

las microcápsulas de alginato se incrementó con el aumento del flujo de la solución de alginato.

Tabla 8. Efecto del flujo en el tamaño de las microcápsulas de alginato. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$). El tamaño de las microcápsulas muestran los valores promedio con su desviación estándar ($n=3$)

Flujo (ml/min)	Tamaño microcápsulas (μm)
9	75.77 \pm 2.16 ^a
6	64.80 \pm 1.66 ^b
3	54.81 \pm 0.77 ^c

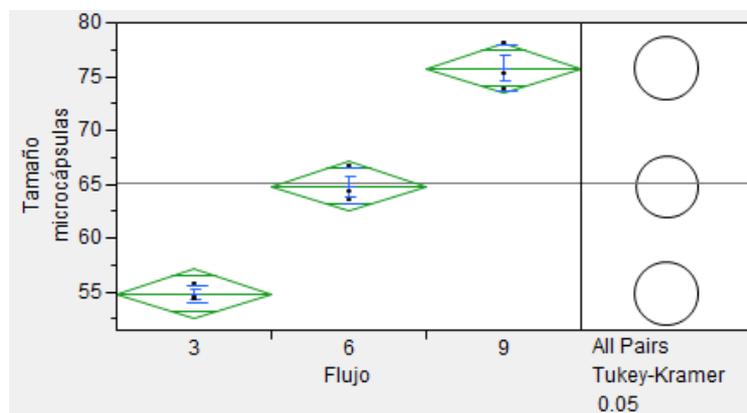


Figura 31. Análisis estadístico del efecto del flujo en el tamaño de las microcápsulas de alginato.

La distribución de tamaño de las microcápsulas se presentó en forma de histogramas en la figura 32. Para el flujo de 3 ml/min, el histograma presentó una distribución de tamaño de 21 a 77 μm , la barra de 54 μm presenta la mayor frecuencia de los datos. Además, el histograma presentó una distribución de tamaño más estrecha (menor dispersión de los datos) (fig. 32a). Para el flujo de 6 ml/min, el histograma presentó una distribución de tamaño de 44 a 105 μm , la barra de 62 μm presenta la mayor frecuencia de los datos (fig. 32b). En el caso del flujo de 9 ml/min, el histograma presentó una distribución de tamaño de 39 a 126 μm , la barra de 74 μm presenta la mayor frecuencia de los datos (fig. 32c). Los histogramas presentaron una distribución unimodal con las barras máximas que representan el tamaño medio de las microcápsulas (fig. 32).

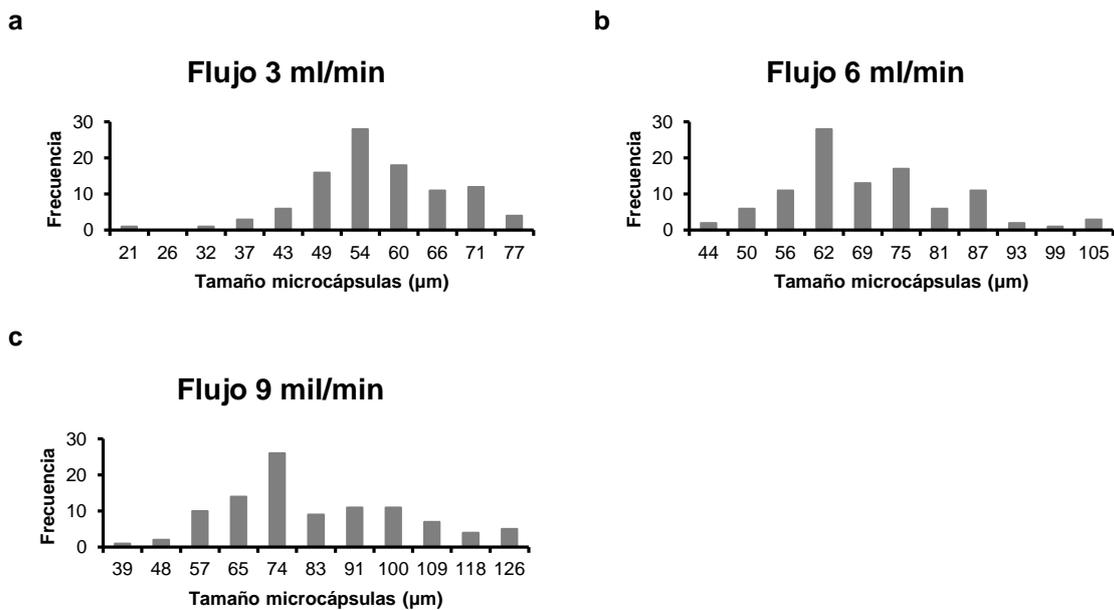


Figura 32. Efecto del flujo en la distribución de tamaño de las microcápsulas de alginato.

9.2.4 Selección de las mejores condiciones para la caracterización de las microcápsulas

Park y *col.* (2001) encapsularon el aceite de limón en microcápsulas de urea y formaldehído mediante la polimerización interfacial. Los autores estudiaron el efecto de los parámetros del proceso (velocidad y tiempo de agitación, tipo y concentración del emulsificante) en la morfología y la distribución de tamaño de las microcápsulas. Los autores seleccionaron a las mejores condiciones en base a las microcápsulas que presentaron una distribución de tamaño estrecha (40-80 µm) y la forma esférica; tales condiciones fueron emulsificante tipo SDS y la concentración del emulsificante al 5%.

En base a los resultados obtenidos, se eligió la presión de 22.5 lb/in² y el flujo de 3 ml/min debido a que las microcápsulas presentaron un tamaño medio muy pequeño; la distribución de tamaño de las microcápsulas fue muy estrecha con escasa dispersión de los datos. Además, las microcápsulas presentaron en su mayoría la forma deseada (esférica).

Es importante resaltar que la distancia de atomización presentó un efecto menor en el tamaño de las microcápsulas; y bajo ninguna de las condiciones de distancia, se obtuvo una distribución de tamaño estrecha. Por lo tanto, la elección de la distancia se realizó en base a la morfología de las

microcápsulas. En este sentido, se escogió la distancia de 20 cm porque se obtuvieron las microcápsulas con la morfología deseada (esférica).

Es evidente que la morfología y el tamaño de las microcápsulas pueden ser optimizadas mediante la combinación apropiada de los parámetros del proceso tales como la presión de aire, la distancia y el flujo de la solución.

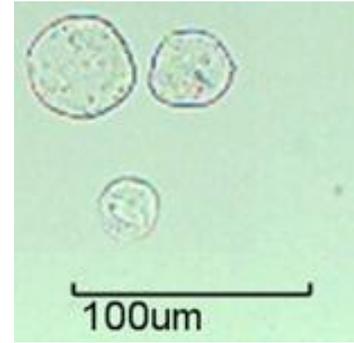
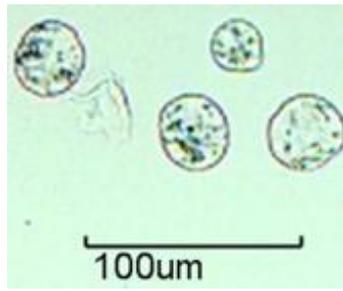
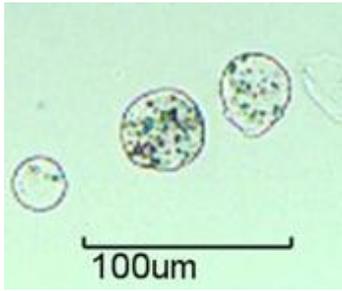
9.3 Caracterización de las microcápsulas

En esta sección se estudió el efecto del mucílago en las diferentes formulaciones sobre las características de las microcápsulas (tamaño, morfología superficial y eficiencia de encapsulación).

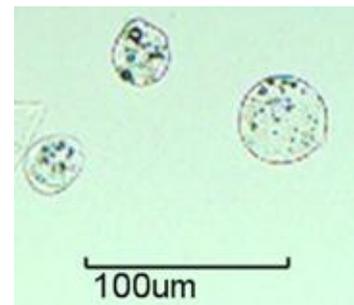
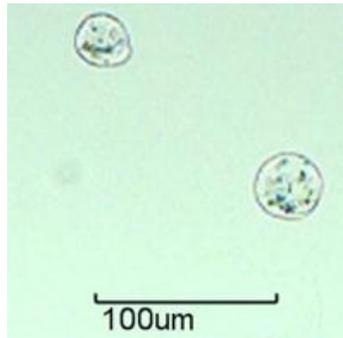
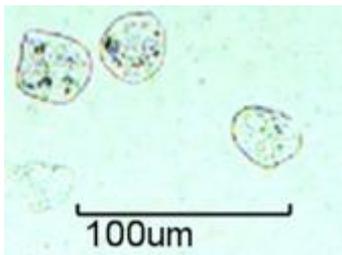
9.3.1 Morfología de las microcápsulas por Microscopía Óptica (MO)

Las microcápsulas preparadas a diferentes formulaciones fueron observadas y analizadas por microscopía óptica (fig. 33). En general, las microcápsulas presentaron en su mayoría la forma esférica; por lo tanto, las condiciones del proceso elegidas fueron las adecuadas para obtener las microcápsulas con la morfología deseada. Además, se observó que el aceite esencial de limón se encuentra disperso en las microcápsulas. Por otro lado, las microcápsulas fueron traslúcidas en las diversas formulaciones, esto es característico de las microcápsulas de alginato. Al enfocar en el microscopio, se observó microcápsulas traslúcidas con fondo claro. Sin embargo, las imágenes obtenidas con el software presentaron un fondo verde claro, esto se debe a la cámara acoplada al microscopio.

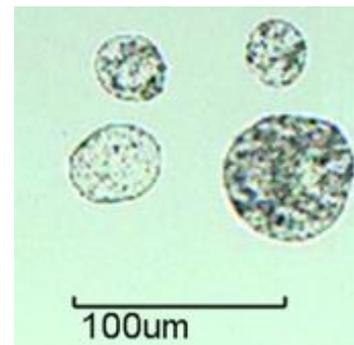
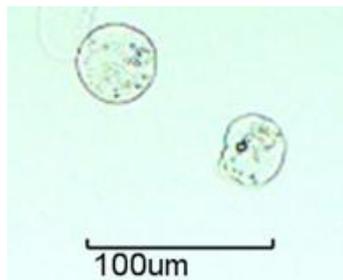
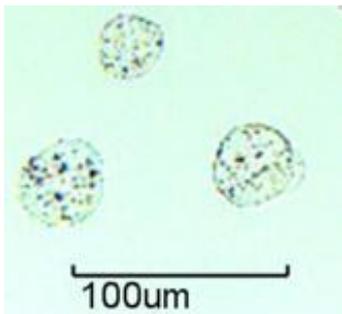
Alginato (a)



Alginato-mucílago 3:1 (b)



Alginato-mucílago 2:1 (c)



Alginato-mucílago 1:1 (d)

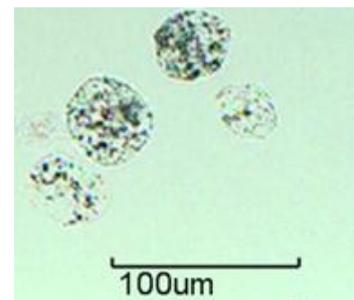
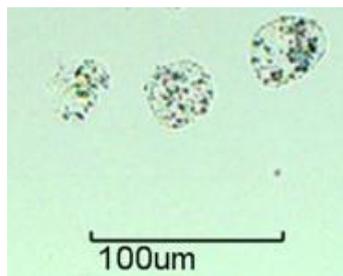
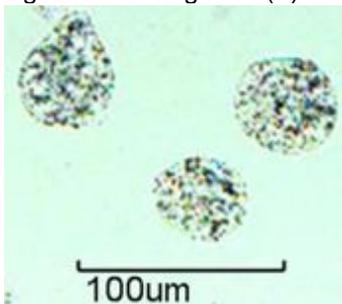


Figura 33. Morfología de las microcápsulas a diferentes formulaciones por microscopía óptica. La barra indica una distancia de 100 µm. Lente objetivo de 10X.

9.3.2 Tamaño de las microcápsulas

El efecto del mucílago en el tamaño de las microcápsulas preparadas a diversas formulaciones se muestra en la tabla 9 y en la figura 34. El tamaño de las microcápsulas disminuye ligeramente conforme se reduce la cantidad de mucílago en las formulaciones. La media de los tamaños de las microcápsulas presentó diferencias significativas para las diversas formulaciones evaluadas (tabla 9 y fig. 34). Koo y col. (2013) encapsularon el aceite de menta en microcápsulas formadas con alginato y pectina. Los autores realizaron diversas formulaciones variando la proporción de los polímeros y obtuvieron microcápsulas con un tamaño desde 1.58 a 3.24 μm ; su tamaño fue inversamente proporcional a la relación alginato-pectina; es decir, el tamaño de las microcápsulas aumento conforme se incrementó la cantidad de pectina en las formulaciones. En el presente trabajo, el tamaño de las microcápsulas se incrementó ligeramente conforme se aumentó la cantidad de mucílago en la formulación (tabla 9). Nayak y col. (2013a-b) reportaron un resultado similar en las cuentas de alginato con mucílago de semillas de fenogreco y alginato con mucílago de la cáscara de *ispaghula* (*Plantago ovata F.*), respectivamente. Los autores obtuvieron un incremento en el tamaño de las cuentas al aumentar la cantidad de mucílago en las formulaciones. Los autores atribuyen dicho resultado al incremento de la viscosidad de la mezcla polimérica con el aumento de la cantidad de mucílago en las formulaciones; a su vez, al aumentar la viscosidad se incrementó el tamaño de gota de la solución polimérica al adicionarse a la solución de entrecruzamiento (CaCl_2). Este razonamiento puede explicar el aumento de tamaño de las microcápsulas al incrementar la cantidad de mucílago en las formulaciones (tabla 9).

Tabla 9. Efecto del mucílago en el tamaño de las microcápsulas en las formulaciones. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$). El tamaño de las microcápsulas muestran los valores promedio con su desviación estándar ($n=3$).

Formulación	Tamaño microcápsulas (μm)
Alginato-Mucílago (1:1)	39.31 \pm 1.31 ^a
Alginato-Mucílago (2:1)	36.37 \pm 0.63 ^{ab}
Alginato-Mucílago (3:1)	33.13 \pm 2.25 ^{bc}
Alginato	29.18 \pm 1.60 ^c

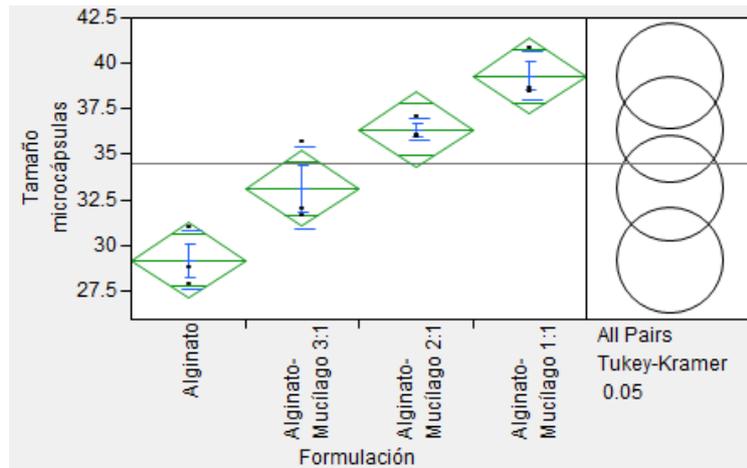


Figura 34. Análisis estadístico del efecto del mucílago en el tamaño de las microcápsulas en diversas formulaciones.

La distribución de tamaño de las microcápsulas en las diversas formulaciones se presentó en forma de histogramas en la figura 35. Para las microcápsulas de alginato, el histograma presentó una distribución de tamaño de 16 a 53 μm , la barra de 27 μm presenta la mayor frecuencia de los datos (fig. 35a). Para las microcápsulas de alginato-mucílago en 3:1, el histograma presentó una distribución de tamaño de 16 a 66 μm , la barra de 31 μm presenta la mayor frecuencia de los datos (fig. 35b). En el caso de las microcápsulas de alginato-mucílago en 2:1, el histograma presentó una distribución de tamaño de 19 a 62 μm , las barras de 32, 36 y 41 μm presentan la mayor frecuencia de los datos (fig. 35c). Con las microcápsulas de alginato y mucílago en 1:1, el histograma presentó una distribución de tamaño de 21 a 75 μm , las barras de 32 y 37 μm presentan la mayor frecuencia de los datos (fig. 35d). Los histogramas presentaron una distribución unimodal con las barras máximas que representan el tamaño medio de las microcápsulas. Se observó que el valor de las barras con los picos máximos es mayor conforme se incrementó la cantidad de mucílago en las formulaciones (fig. 35).

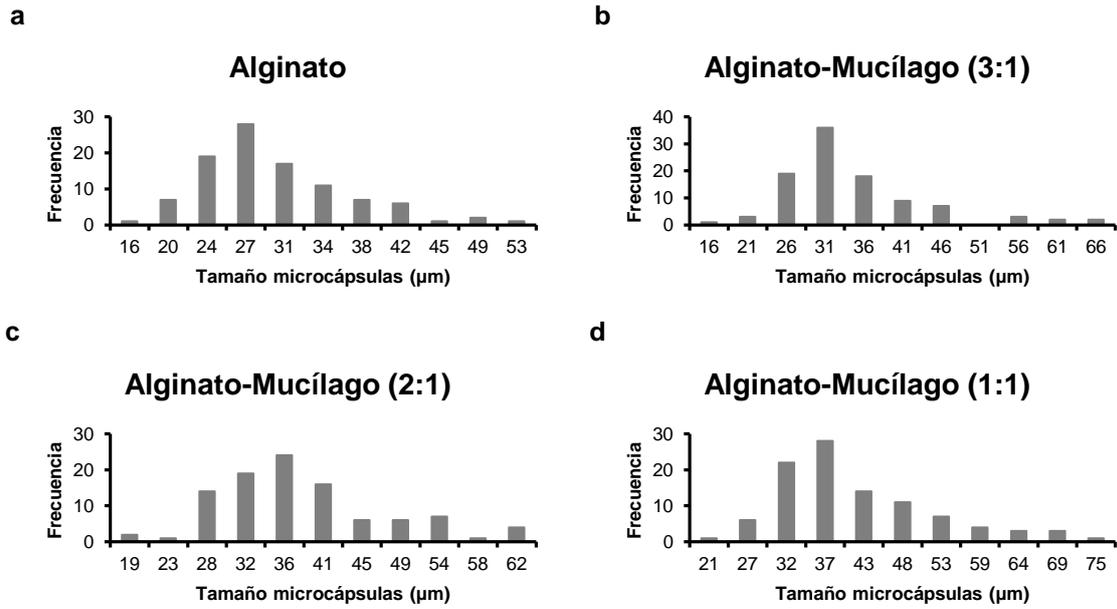


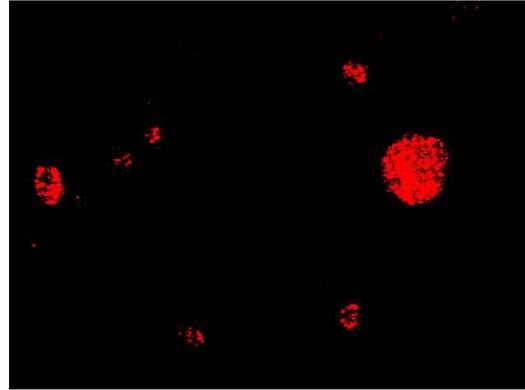
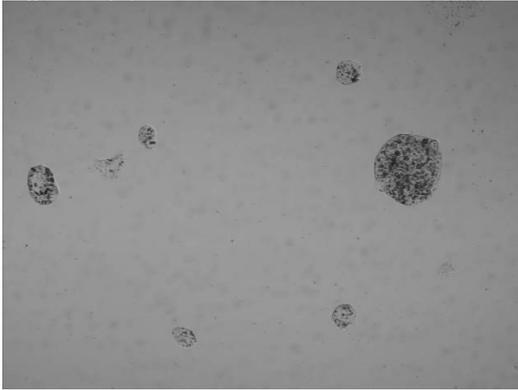
Figura 35. Efecto del mucílago en la distribución de tamaño de las microcápsulas.

9.3.3 Microscopía Confocal (MC)

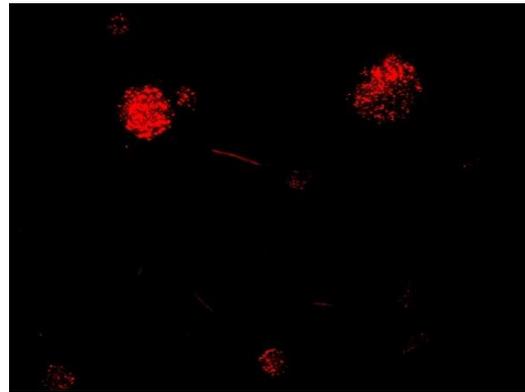
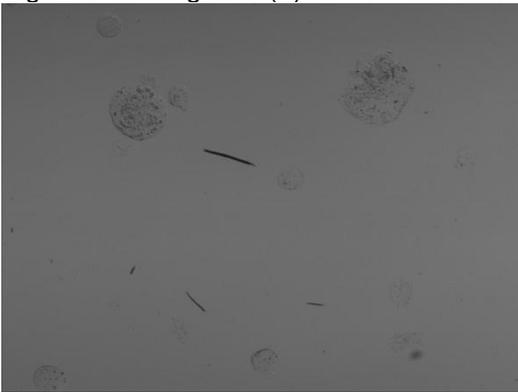
La microscopía confocal permite examinar de una manera no destructiva a través del material pared de las microcápsulas. El análisis de las imágenes permite la inspección de las estructuras no sólo en la superficie sin también dentro del material (Lamprecht y *col.*, 2000). El análisis por microscopía confocal permitió una mejor visualización de las microcápsulas, siendo posible, localizar el aceite esencial de limón distribuido en las microcápsulas debido a la especificidad del colorante. El colorante Rojo Nilo fue utilizado para identificar el aceite esencial de limón en las microcápsulas porque es un colorante específico para la coloración de los lípidos. De acuerdo con Obendland y *col.* (1997), el Rojo Nilo puede ser utilizado para visualizar el aceite esencial de limón en la cáscara del fruto mediante la microscopía confocal.

Las microcápsulas obtenidas a diferentes formulaciones fueron observadas por microscopía confocal (fig. 36). En las imágenes obtenidas, la fluorescencia del Rojo Nilo se observó en color rojo. Al comparar las imágenes de la microscopía nomarski (fondo gris) y la microscopía confocal (fondo negro), se observó el aceite disperso homogéneamente en las microcápsulas. Además, los puntos en rojo de las imágenes de microscopía confocal corresponden con los puntos más oscuros en las microcápsulas de las imágenes por contraste por interferencia diferencial; estos puntos corresponden al aceite disperso en las microcápsulas (fig. 36). La observación por microscopía confocal permitió identificar, por su afinidad al Rojo de Nilo, el aceite esencial de limón disperso en las microcápsulas, resultado también observado en la microscopía óptica.

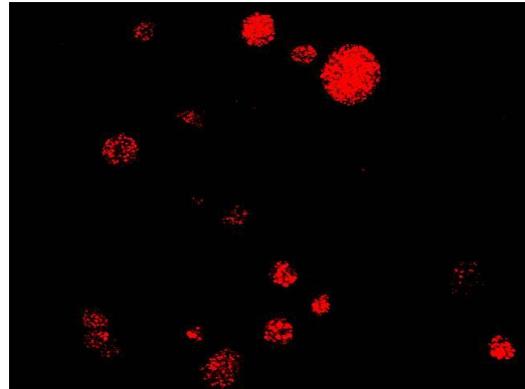
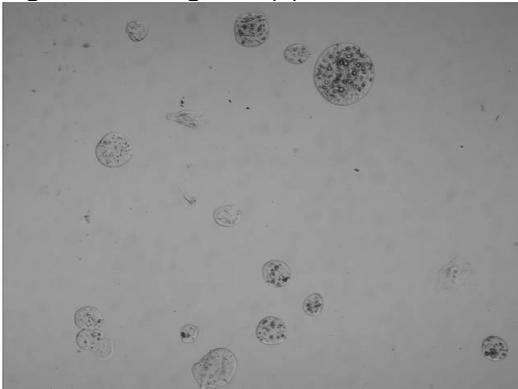
Alginato (a)



Alginato-mucílago 3:1 (b)



Alginato-mucílago 2:1 (c)



Alginato-mucílago 1:1 (d)

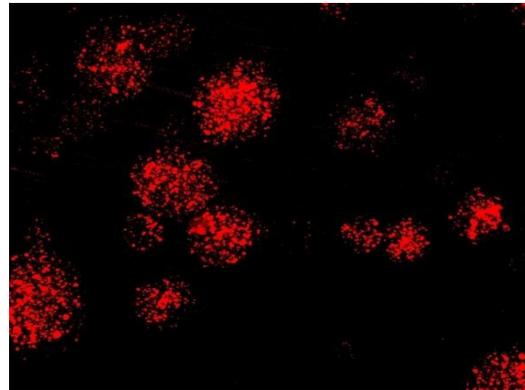
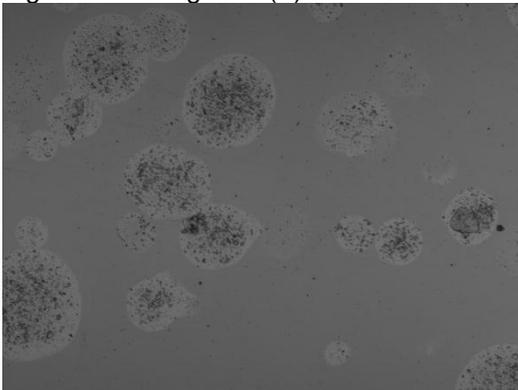


Figura 36. Microcápsulas a diversas formulaciones por microscopía de nomarski y microscopía confocal. Lente objetivo de 10X.

9.3.4 Morfología superficial de las microcápsulas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La morfología de las microcápsulas liofilizadas fue analizada por MEB y las imágenes se presentan en las figuras 37 y 38. La superficie arrugada de las microcápsulas puede atribuirse a la pérdida de agua por la liofilización (Koo y *col.*, 2013). En general, el aspecto de los materiales obtenidos se observó como una aglomeración de las microcápsulas llevando a una pérdida aparente de la forma esférica (fig. 37). En tanto, a una observación en un mayor aumento, se observaron algunos fragmentos que mantuvieron el contorno esférico con cierta porosidad (fig. 38). En este sentido, las microcápsulas de alginato individual y alginato-mucílago en 3:1 mantuvieron la forma esférica después de la liofilización (fig. 38a-b). Sin embargo, las microcápsulas producidas con alginato-mucílago en 2:1 y 1:1 presentaron cierta pérdida en la forma esférica después de la liofilización (fig. 38c-d). Los materiales utilizados presentaron continuidad y una estructura sólida, aunque no presentan una superficie lisa. En base a estos resultados, la forma esférica de las microcápsulas se debe a la presencia del alginato (fig. 38). De acuerdo con Koo y *col.* (2013), la superficie de las microcápsulas liofilizadas preparadas con alginato-pectina en diversas proporciones mostró ser rugosa y; en general, presentaron la forma esférica con ciertas arrugas en la superficie debido al proceso de liofilización. Las mejores condiciones obtenidas por los autores fueron las microcápsulas preparadas con alginato100-pectina0, alginato80-pectina20 y alginato60-pectina40, donde las microcápsulas fueron casi esféricas y ligeramente arrugadas por la liofilización. Las microcápsulas preparadas con alginato40-pectina60, alginato20-pectina80 y alginato0-pectina100 no presentaron la forma esférica. En este sentido, al incrementar la cantidad de pectina en la mezcla polimérica (alginato-pectina), las microcápsulas liofilizadas presentaron menor simetría (menos esféricas) y una superficie rugosa (Islan y *col.*, 2012).

Además, las microcápsulas presentaron un tamaño aproximado de 30 μm (fig. 38), este resultado concuerda con los obtenidos por la microscopía óptica.

Las microcápsulas presentaron una superficie porosa, esto puede atribuirse a que las microcápsulas contienen el aceite esencial de limón (fig. 38). La explicación más probable para estas estructuras porosas se debe a la evaporación del aceite esencial de la superficie de las microcápsulas (Hosseini y *col.*, 2013a). Estos resultados también fueron obtenidos por Jiamrungraksa y Charunchinda (2010), en las microcápsulas de alginato con aceite esencial de galanga. De forma similar, Paula y *col.* (2011) han sugerido que la principal causa de porosidad de las cápsulas con quitosano y goma de marañón que contienen el aceite esencial de *Lippia sidoides*, se debe a la encapsulación de dicho aceite.

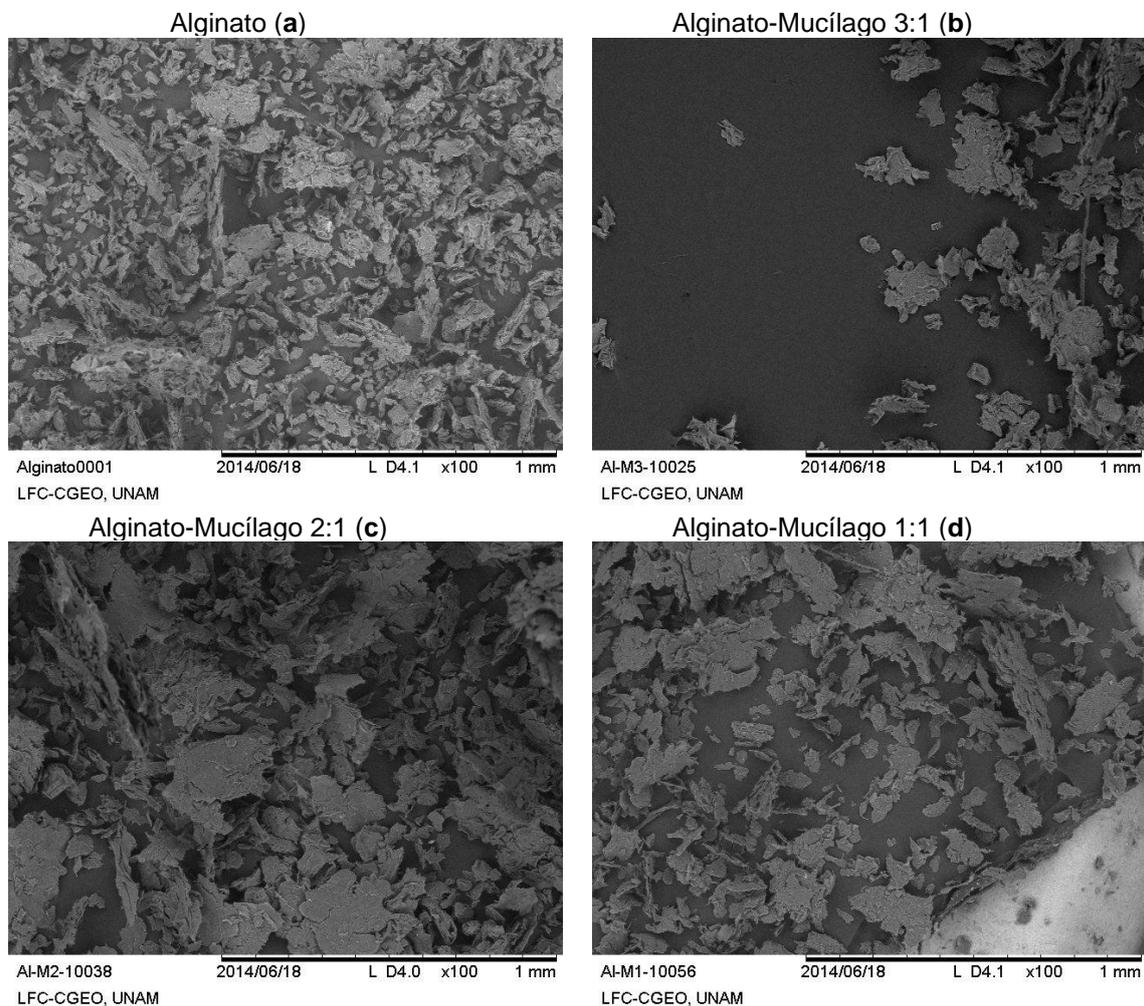


Figura 37. Morfología de las microcápsulas (liofilizadas) por MEB (100X).

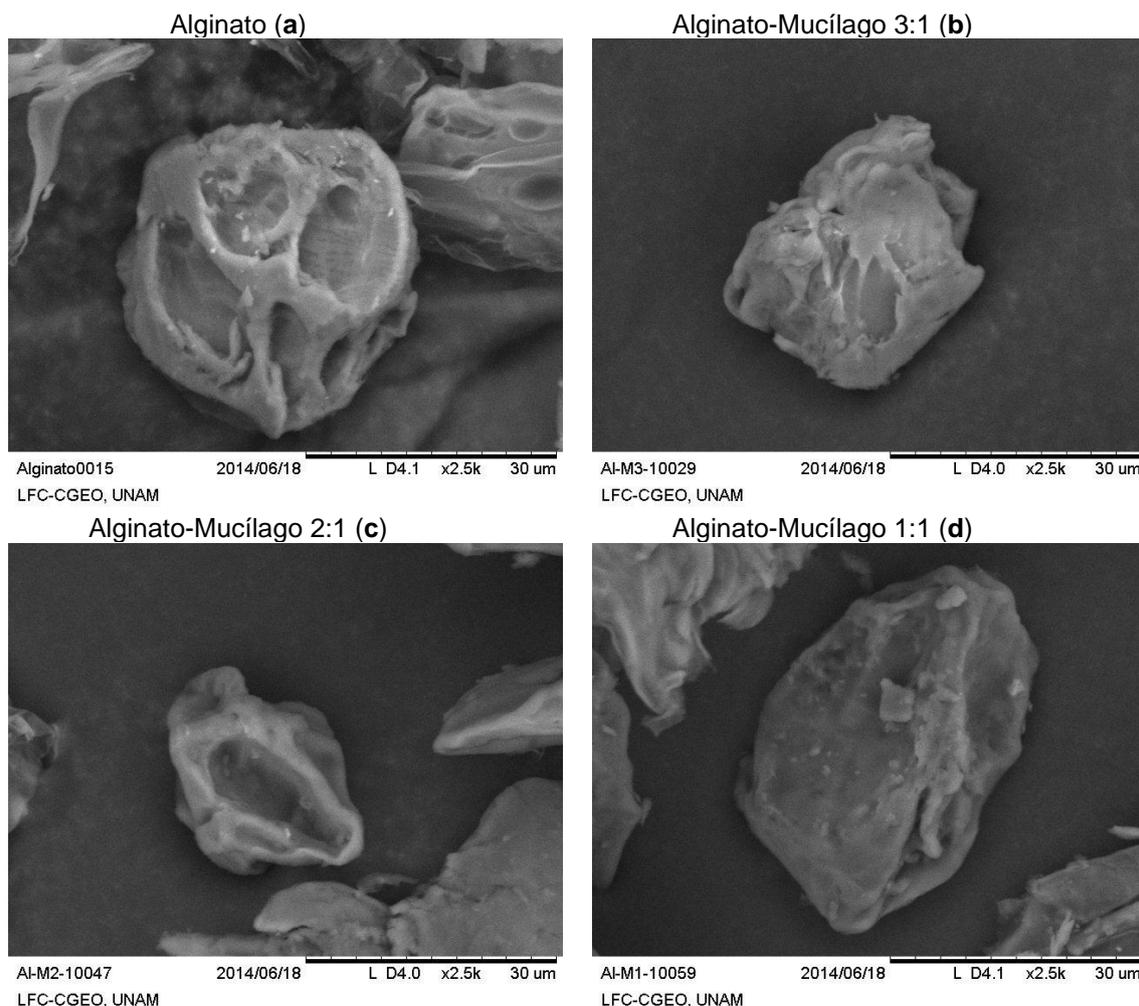


Figura 38. Morfología de las microcápsulas (liofilizadas) por MEB (2500X).

En los análisis por MEB, las microcápsulas sin liofilizar fueron dispersadas en etanol, esto se realizó para observar con mayor claridad el efecto de la incorporación del mucílago en la superficie de las microcápsulas (fig. 39 y 40). A diferencia de las microcápsulas liofilizadas (fig. 37 y 38), las microcápsulas dispersadas en etanol presentaron menor aglomeramiento (fig. 39), por lo cual, las microcápsulas pueden distinguirse con claridad. Además, las microcápsulas presentaron la forma esférica con ligero colapsamiento causado por el solvente (fig. 40). De forma similar a las microcápsulas liofilizadas, las microcápsulas dispersadas presentaron una superficie porosa, esto puede atribuirse a que las microcápsulas contienen el aceite esencial de limón (fig. 38 y 40). De acuerdo con Paula y col. (2011), la principal causa de porosidad de las cápsulas con quitosano y goma de marañón se debe a la encapsulación del aceite esencial de *Lippia sidoides*. Además, las microcápsulas formuladas con alginato-mucílago en 3:1 presentaron una

superficie con apariencia más suave que las microcápsulas preparadas con solo alginato (fig. 40a-b). Esto no pudo apreciarse en las microcápsulas con alginato mucílago en 2:1 y 1:1 debido a la pérdida de agua en las microcápsulas (fig. 40c-d). De acuerdo con Zamora-Vega y col. (2012), las microcápsulas formuladas con alginato, mucílago e inulina presentaron una superficie suave mientras que las microcápsulas formadas solo con alginato presentaron una superficie heterogénea, rugosa y fracturada. Además, Sheu y Marshal (1993) reportaron que la superficie suave puede tener una influencia positiva en las evaluaciones sensoriales en los productos alimenticios, a los que se les han añadido cápsulas con la propiedad de superficie suave.

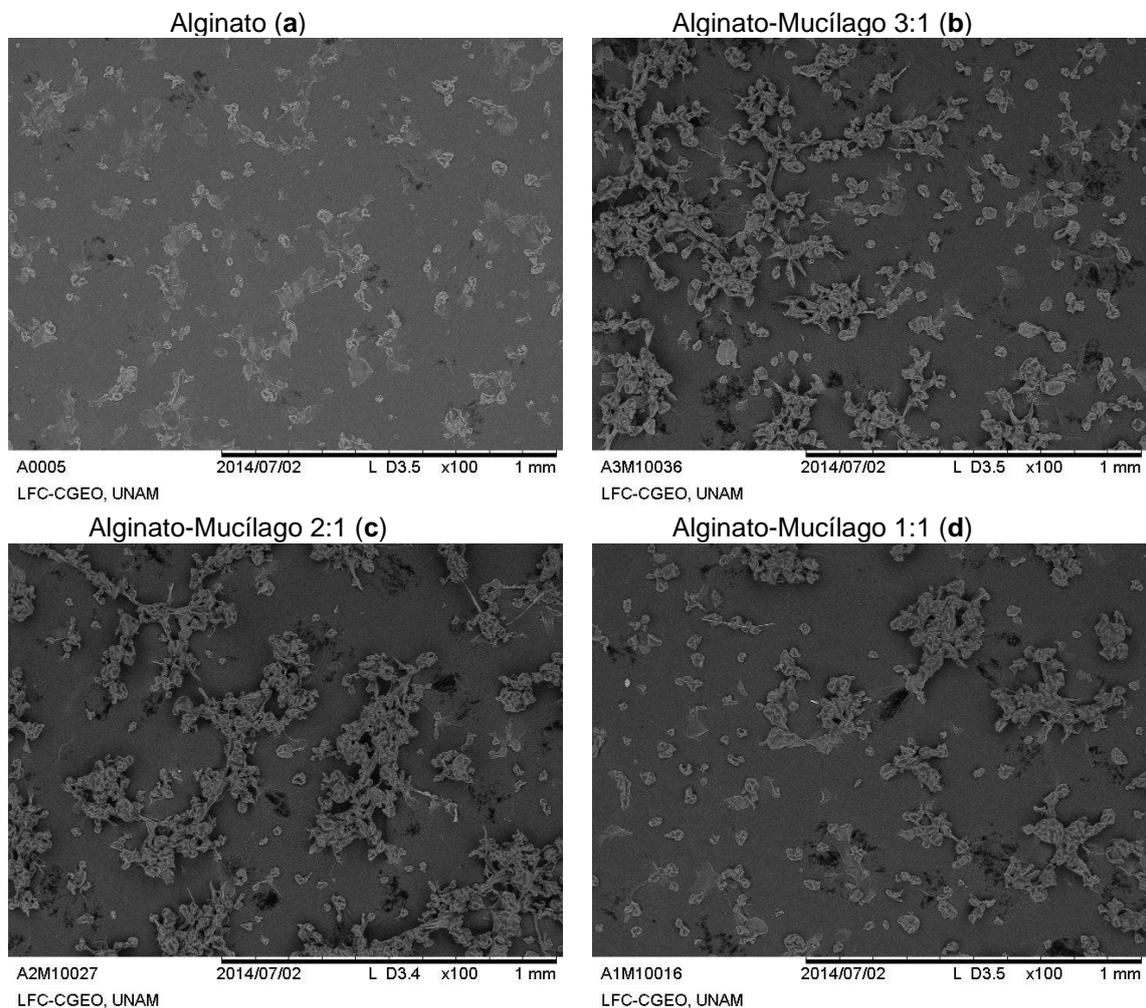


Figura 39. Morfología de las microcápsulas sin liofilizar por MEB (100X).

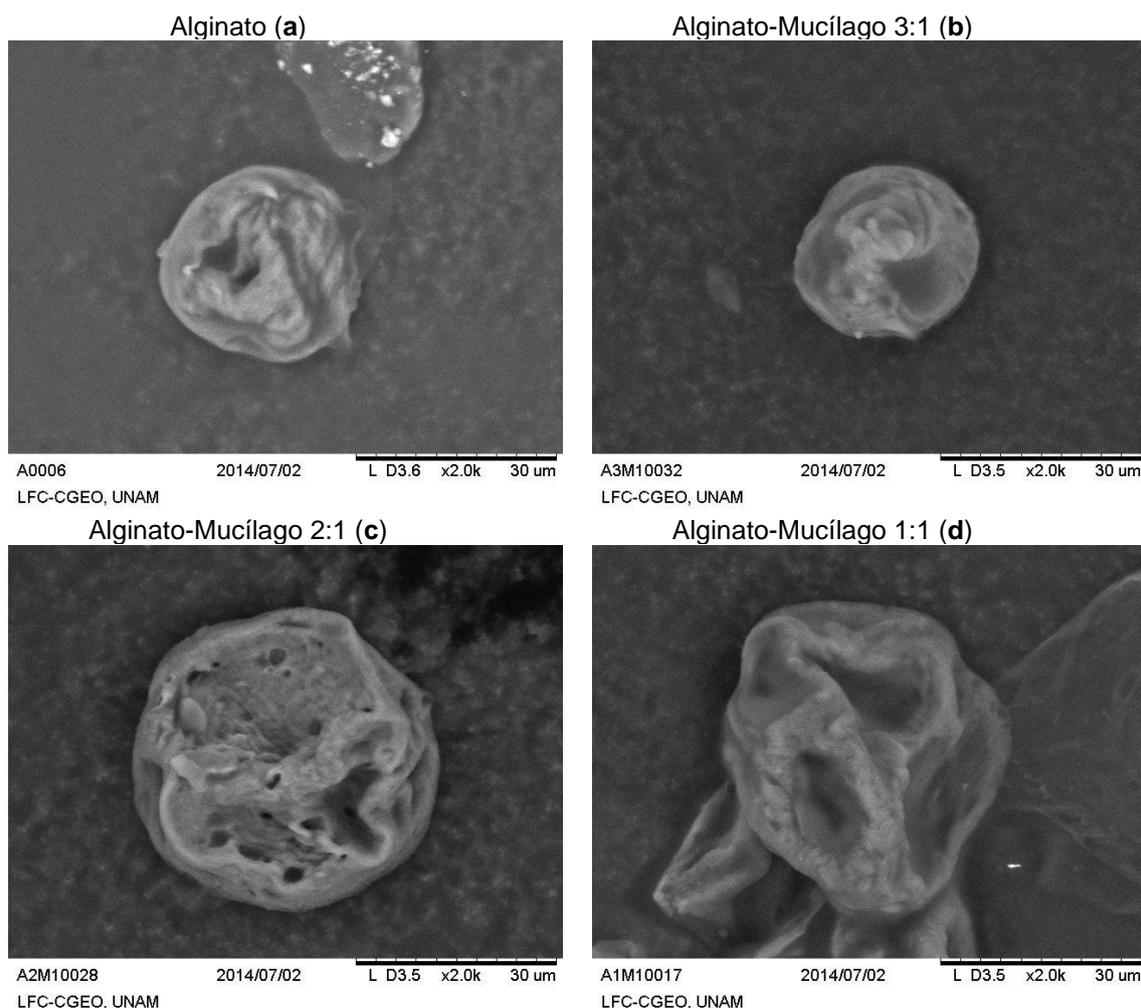


Figura 40. Morfología de las microcápsulas sin liofilizar por MEB (2000X).

9.3.5 Análisis por Espectroscopía en Infrarrojo (FT-IR)

Los análisis por IR fueron realizados para determinar la posible interacción entre los biopolímeros y la presencia del aceite esencial en las microcápsulas liofilizadas. Los espectros IR de los ingredientes (alginate, mucílago y pectina en polvo; el aceite esencial de limón), las microcápsulas producidas sólo con alginato y la mezcla de polimérica que contienen el aceite esencial de limón se presentaron en la figura 41.

El espectro IR del alginato en polvo presentó bandas de absorción destacables en 3419 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento O-H), 2934 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento C-H), 1612 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento asimétricas COO^-), 1417 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento simétricas COO^-) y 1028 cm^{-1} (vibración de estiramiento C-O-C) (fig. 41a). De acuerdo con Hosseini y *col.* (2013a) y Khaksar y *col.* (2014), el espectro IR del alginato de

sodio mostró bandas de absorción de estiramiento en 3421, 2934, 1658, 1469 y 1034 cm^{-1} ; las cuales están relacionadas con O-H, C-H, COO^- (asimétrico), COO^- (simétrico) y C-O-C, respectivamente. El espectro IR del alginato de sodio obtenido en este trabajo presentó resultados similares a los reportados por los autores. Por otro lado, la vibración de estiramiento C-O-C (1028 cm^{-1}) de las microcápsulas de alginato y la mezcla polimérica se desplazó a 1030 cm^{-1} y se observó una disminución en la intensidad del pico (fig. 41a, e-h). De acuerdo con Angadi y col. (2012), estos cambios pueden estar relacionados con el enlace covalente parcial entre el calcio y los átomos de oxígeno. Dicho desplazamiento también fue observado por Hosseini y col. (2013a) en microcápsulas de alginato que contienen el aceite esencial de *Satureja hortensis*.

El espectro IR del mucílago en polvo (*O. ficus-indica*) presentó bandas de absorción destacables en 3386 cm^{-1} (vibraciones O-H), 2934 cm^{-1} (vibraciones C-H), 1728 cm^{-1} (vibraciones C=O de ácidos y grupos carboxílicos esterificados), 1625 y 1417 cm^{-1} pueden corresponder a la ionización de las moléculas de ácidos y grupos carboxílicos no esterificados. Esto indica que la molécula de mucílago de *Opuntia* es de bajo grado de esterificación de acuerdo con Sáenz (2004) y Cárdenas y col. (2007). Las bandas de 1076 a 1043 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de C-C y C-O (fig. 41b). De acuerdo con Rodríguez-González (2013), el espectro IR del mucílago nopal de *O. ficus-indica* presentó bandas de absorción en 3405 , 2933 , 1749 , 1625 , 1423 y 1084 a 1046 cm^{-1} . El espectro IR de mucílago obtenido en este trabajo presentó similitud con el obtenido por Rodríguez-González, (2013).

El espectro IR de la pectina presentó bandas de absorción destacables en 3384 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento O-H), 2939 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento C-H), 1751 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento asimétricas COO^-), y 1641 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento simétricas COO^-) (fig. 41c). De acuerdo con Munarim y col. (2010), el espectro IR de la pectina mostró bandas representativas en 3700 - 2500 , 1735 y 1630 cm^{-1} ; las cuales están relacionadas con el estiramiento del O-H, vibraciones de absorción de C=O y estiramiento antisimétrico COO^- , respectivamente. Además, Khaksar y col. (2014) reportaron que el espectro de la pectina presentó dos picos representativos en 1746 y

1627 cm^{-1} , atribuidos a los grupos carbonil éster (C=O) y a la banda de estiramiento del ión carboxilo (COO^-), respectivamente.

Los espectros IR del alginato y el mucílago en polvo presentaron gran similitud entre ambos (fig. 41a-b). En los espectros IR de las microcápsulas de alginato-mucílago no se apreció el cambio en la intensidad en los picos representativos o alguna interacción significativa entre los polímeros. Sin embargo, en dichos espectros se apreció un aumento en el número de onda, específicamente de 1417 cm^{-1} (fig. 41a-b) a 1423 cm^{-1} (fig. 41f-h); aunque este aumento en el número de onda no es similar con los reportados en la literatura. De acuerdo con Khaksar y *col.* (2014), la interacción del alginato y la pectina puede atribuirse al incremento en la intensidad del pico del grupo hidroxilo y el desplazamiento del pico a un número de onda menor. Al mismo tiempo, el pico de COO^- cambió de 1654 y 1464 cm^{-1} a 1641 y 1453 cm^{-1} , respectivamente. Sin embargo, el espectro IR de las cuentas con alginato y el mucílago de semillas de fenogreco no presentó interacción significativa entre los polímeros (Nayak y *col.*, 2013a); resultado que concuerda con el obtenido en la presente investigación.

El espectro IR del aceite esencial de limón puro presentó vibraciones características en 3084 cm^{-1} (banda relacionada con el γ -terpineno), 2964 a 2920 cm^{-1} (estiramiento C-H), 1645 cm^{-1} (banda de absorción de alqueno (C=C) relacionada con el limoneno), 1436 cm^{-1} (flexión C-H₂), 914 y 889 cm^{-1} (flexión C-H relacionadas con el β -mirceno) (fig. 41d). De acuerdo con Lee y Yi (2013), el espectro IR del aceite esencial del fruto *Citrus unshiu* presentó vibraciones características en 3077, 2964 a 2835, 1643, 913 y 886 cm^{-1} ; correspondientes a la presencia del γ -terpineno, vibraciones de estiramiento C-H en series de alcanos, presencia de alqueno (C=C) relacionada con el limoneno y vibraciones de flexión C-H contituyentes del β -mirceno. El espectro IR del aceite esencial de limón utilizado en el presente trabajo presentó similitud con los espectros reportados por Park y *col.* (2001), Food Chemicals Codex (2010) y Lee y Yi (2013).

La incorporación del aceite esencial de limón a las microcápsulas en las diversas formulaciones resultó en picos característicos del aceite esencial con baja intensidad. Probablemente, las bandas se empalmaron con las señales de los espectros de las microcápsulas en 2931, 1612, 1425 y 889 cm^{-1} (fig. 41e-h).

De acuerdo con de Oliveira *y col.* (2014), las bandas características del aceite esencial de *Lippia sidoides* (1440, 1580 y 1600 cm^{-1}) presentaron baja intensidad y probablemente se empalmaron con otras señales en los espectros IR de las microcápsulas producidas con alginato y goma de marañón.

Estos resultados revelaron la presencia del aceite esencial de limón en las microcápsulas producidas en diversas formulaciones; además, no fueron detectadas interacciones químicas entre el aceite esencial y la matriz polimérica. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Hosseini *y col.* (2013 a-b).

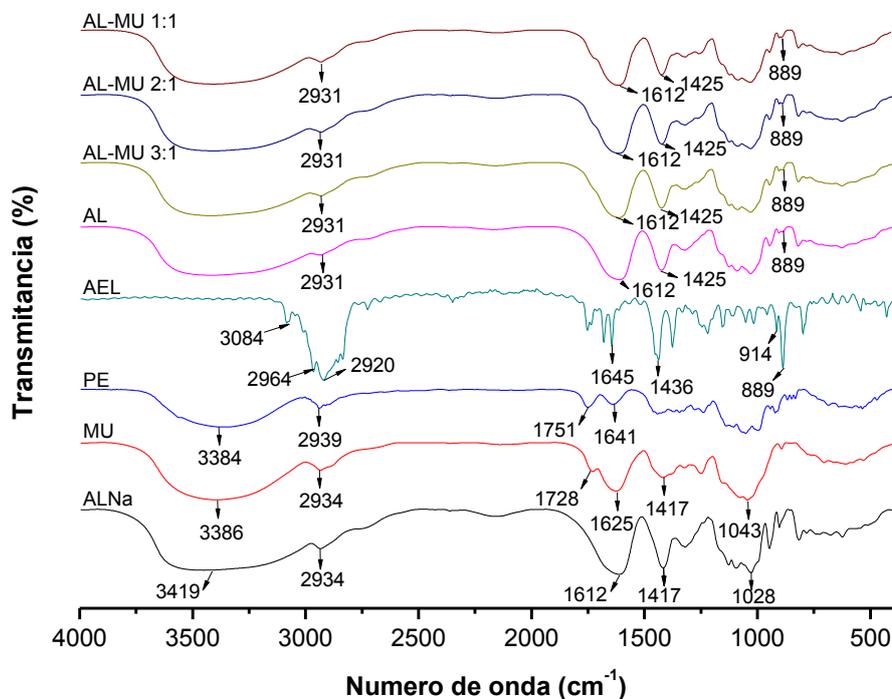


Figura 41. Espectros IR de los ingredientes y las microcápsulas. Ingredientes: (ALNa) Alginato de sodio, (MU) Mucílago, (PE) Pectina, (AEL) Aceite esencial de limón. Microcápsulas que contienen AEL: (AL) Alginato, (AL-MU 3:1) Alginato-Mucílago 3:1, (AL-MU 2:1) Alginato-Mucílago 2:1, (AL-MU 1:1) Alginato-Mucílago 1:1.

9.3.6 Eficiencia de encapsulación por Espectroscopía de Absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Finalmente, se investigó el efecto de las diferentes formulaciones de los biopolímeros en la eficiencia de encapsulación del aceite esencial de limón. La eficiencia de encapsulación es el porcentaje de la cantidad de aceite encapsulado con respecto a la cantidad inicial de aceite incorporado a las microcápsulas. En general, la eficiencia de la encapsulación disminuyó al incrementarse la cantidad de mucílago en las formulaciones (fig. 42 y 43). La eficiencia de encapsulación máxima (18.39%) corresponde a las microcápsulas formadas con alginato individual, seguida de las microcápsulas de alginato-mucílago en 3:1 (18.06%). Este valor presentó gran similitud con el obtenido con las microcápsulas de alginato individual. Las microcápsulas formadas con alginato-mucílago en 1:1 encapsularon el 12.48% del aceite esencial de limón. En base a los resultados obtenidos, el alginato presentó un mayor efecto en la eficiencia de la encapsulación del aceite esencial que el mucílago. De acuerdo con Koo y *col.* (2013), al aumentar la cantidad de pectina en las formulaciones se reduce la eficiencia de la encapsulación del aceite de menta. Los autores obtuvieron una eficiencia de encapsulación máxima con alginato₈₀-pectina₂₀ (85.15%), seguida de alginato (80.38%). La eficiencia de la encapsulación disminuyó cuando las formulaciones fueron preparadas con valores superiores al 40% de pectina. Las microcápsulas de pectina encapsularon el 26.68% del aceite de menta. Sin embargo, en el presente trabajo se obtuvo una baja eficiencia de encapsulación con las formulaciones utilizadas, posiblemente debido a la saturación del aceite esencial en las microcápsulas. Las microcápsulas fueron preparadas incorporando la cantidad de aceite esencial al 50% de sólidos de los biopolímeros. De acuerdo con Khaksar y *col.* (2014), la eficiencia de la encapsulación de la nisina en microcápsulas de alginato tiende a reducirse conforme se incrementó la concentración inicial de nisina. La disminución de la eficiencia de encapsulación puede atribuirse a la saturación de la nisina en las microcápsulas. De forma similar, la eficiencia de la encapsulación del aceite esencial de oregano en nanocápsulas de quitosano disminuyó de 24.72 a 5.45%, conforme se incrementó la cantidad de aceite de 0.1 a 0.8 g/g quitosano. La disminución de la eficiencia de la encapsulación

para las muestras preparadas usando una elevada relación inicial en peso del quitosano y el aceite de oregano, puede ser explicada debido a la saturación del aceite en las nanocápsulas de quitosano (Hosseini y col., 2013b).

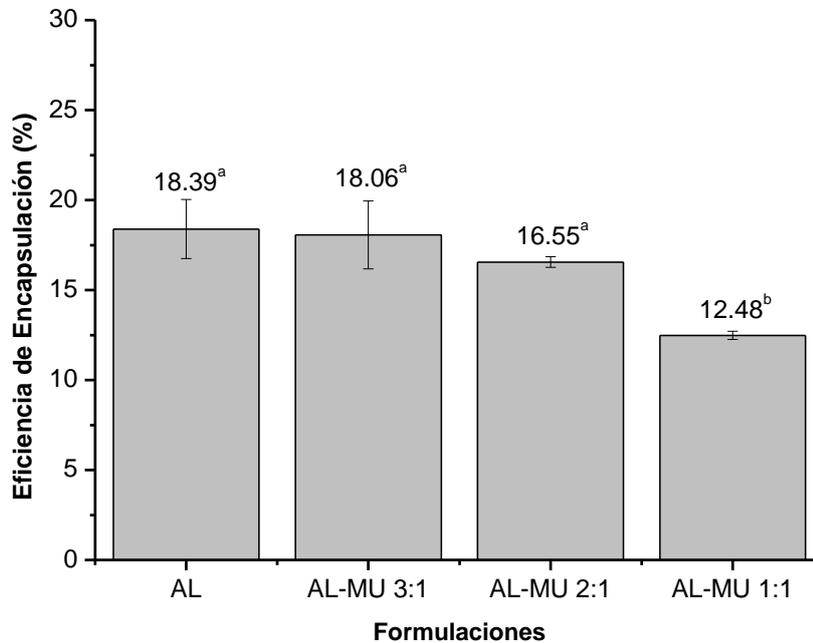


Figura 42. Eficiencia de la encapsulación de las microcápsulas a diversas formulaciones. Alginato (A); Alginato-Mucílago 3:1 (AL-MU 3:1); Alginato-Mucílago 3:1 (AL-MU 3:1) y Alginato-Mucílago 3:1 (AL-MU 3:1). Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$). Los resultados fueron expresados con la media y su desviación estándar respectiva ($n=3$).

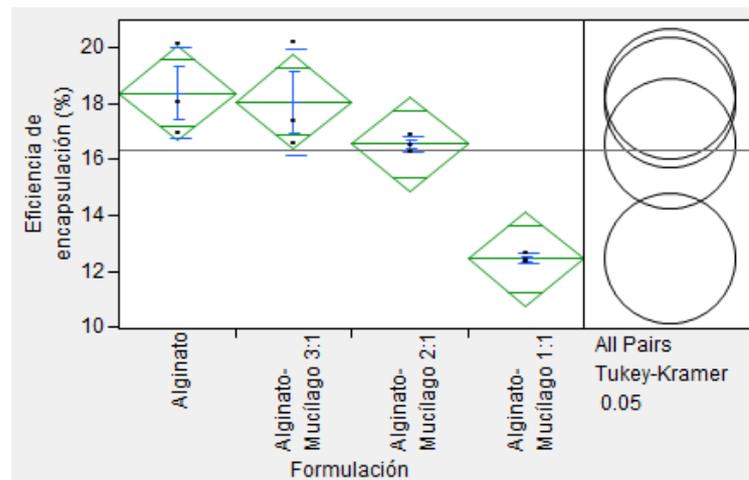


Figura 43. Análisis estadístico de la eficiencia de encapsulación de las microcápsulas en las diversas formulaciones.

10. CONCLUSIONES

La gelificación iónica por medio de la atomización es un método sencillo y de gran utilidad para encapsular el aceite esencial de limón con biopolímeros como el alginato y el mucílago.

Entre los biopolímeros utilizados, el alginato fue el principal para la formación de las microcápsulas debido a la interacción entre los iones calcio y los grupos gulurónicos del biopolímero.

Las microcápsulas con las características deseadas (morfología y tamaño) fueron obtenidas mediante la combinación adecuada de los parámetros del proceso de atomización; presión (22.5 lb/in²), distancia (20 cm) y flujo (3 ml/min). Las microcápsulas presentaron una distribución de tamaño de 16 a 75 µm, donde las barras con la mayor frecuencia de los datos representaron el tamaño medio de las microcápsulas (histogramas). Si se requiere disminuir el tamaño de las cápsulas, la presión de aire deberá incrementarse y disminuir el flujo de la solución. Sin embargo, el tiempo de atomización se incrementará al disminuir el flujo de la solución.

El aceite esencial de limón se encontró disperso homogéneamente en las microcápsulas, esto se atribuye a la emulsión formada antes de la producción de las microcápsulas. La presencia del aceite esencial de limón en las microcápsulas fue confirmada por la microscopía confocal y espectroscopía en IR. Los biopolímeros utilizados en la microcápsulación no presentaron interacción química. Además, el aceite esencial de limón no presentó interacción química con los biopolímeros (FT-IR), esto es característico de las microcápsulas formadas con alginato.

Las microcápsulas liofilizadas presentaron una superficie rugosa, con cierta porosidad y colapsamiento. Por el contrario, las microcápsulas sin liofilizar dispersadas en etanol presentaron cierta porosidad, menor colapsamiento y una superficie menos rugosa. La porosidad de las microcápsulas se atribuye al aceite encapsulado (MEB).

Las formulaciones de alginato-mucílago presentaron cierto efecto en el tamaño de las microcápsulas (MO) y en la eficiencia de la encapsulación (UV-Vis). En general, las microcápsulas en las diversas formulaciones presentaron

11. ANEXOS

A continuación se presenta la curva de calibración del aceite esencial de limón a partir de diversas disoluciones. La ecuación de la recta y el coeficiente de regresión se presentan en el gráfico (fig. 44).

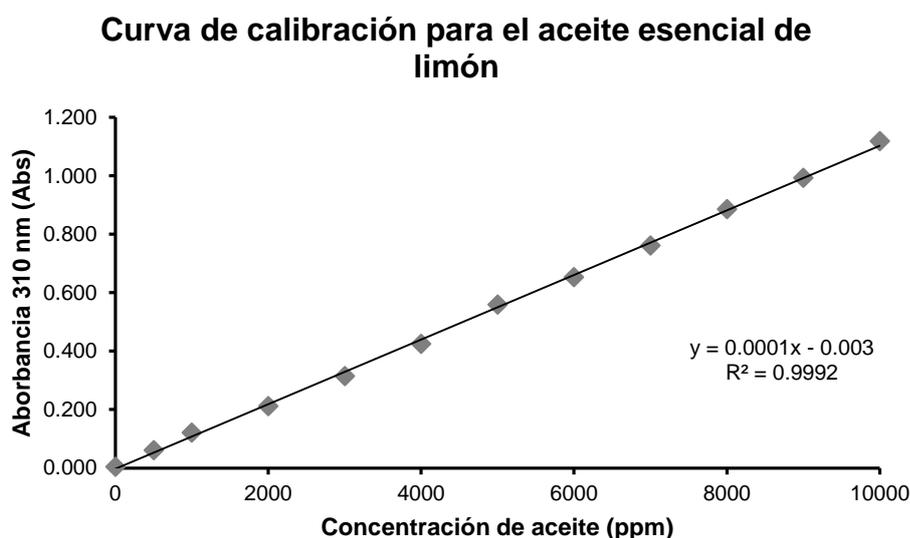


Figura 44. Curva de calibración del aceite esencial de limón. Los resultados fueron expresados con la media ($n=3$).

A partir de la ecuación de la recta y la ecuación 1, se calculó la concentración del aceite esencial de limón encapsulado en las muestras y la eficiencia de la encapsulación. A continuación se muestra un ejemplo del cálculo con microcápsulas de alginato individual.

Se sustituyeron las variables “ y ” y “ x ” por la absorbancia (Abs) y la concentración total (C_{total}) en la ecuación obtenida de la curva de calibración, después, se despejó la concentración total en la ecuación.

$$y = 0.0001x - 0.003$$

$$y = Abs; x = C_{total}$$

$$C_{total} = \frac{Abs + 0.003}{0.0001}$$

El promedio de las absorbancias (0.181) obtenido de las microcápsulas de alginato con aceite esencial se sustituyó en la ecuación anterior y se obtuvo la cantidad de aceite encapsulado (C_{total}) en ppm.

$$Abs = 0.181$$

$$C_{total} = \frac{0.181 + 0.003}{0.0001}$$

$$C_{total} = 1840$$

Finalmente, se calculó la eficiencia de la encapsulación en porcentaje a partir de la concentración inicial (10000 ppm) y la concentración obtenida en la ecuación anterior. La cantidad inicial de aceite esencial de limón en las emulsiones fue al 50% de sólidos. Las emulsiones fueron preparadas con 2 g de biopolímeros equivalentes a 1 g de aceite, dicha cantidad equivale a 10000 ppm.

$$EE(\%) = \frac{C_{inicial}}{C_{total}} \times 100$$

$$C_{inicial} = 10000$$

$$EE(\%) = \frac{1840}{10000} \times 100$$

$$EE(\%) = 18.4$$

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraján, V.M.A. (2008). Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*Opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. Tesis de doctorado. Departamento de tecnología de alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España, pp 22-25.
- Álvarez, O.C., Díaz, S.C., Ramírez, V.D., Yáñez, F.J. (2007). Secado por Aspersión de Mucílago de Nopal. Memorias en extenso del IX Congreso de ciencia de los alimentos y V foro de ciencia y tecnología de alimentos. Departamento de Bioingeniería. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. IPN. Guanajuato, Guanajuato, México, pp 277.
- Amrita, K., Dabur, R.S. y Kapoor, C.M. (1999). Application of microencapsulation technology in dairy industry. *Indian Food Industry* 18, 57-64.
- Angadi, S.C., Manjeshwar, L.S. y Aminabhavi, T.M. (2012). Novel composite blend microbeads of sodium alginate coated with chitosan for controlled release of amoxicillin. *International Journal of Biological Macromolecules* 51, 45-55.
- Atalah, E. y Pak, N. (1997). Aumente el consumo de verduras, frutas y legumbres. In: Castillo, C., Uauy, R., Atalah, E. (Eds.), Guías de alimentación para la población chilena. Santiago, Chile, pp 164.
- Augustin, M.A., Sanguansri, L., Margetts, C. y Young, B. (2001). Microencapsulation of food ingredients. *Food Australia* 53, 220-223.
- Bhandari, B, D'Arcy, B. y Bich, L.L.T. (1998). Lemon oil to β -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of β -ciclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1494-1499.
- Bruzzone, I (2009). Cadenas alimentarias: aceite esencial de limón. *Alimentos Argentinos*, 37-39.
- Burey, P., Bhandari, B.R., Howes, T. y Gidley, M.J. (2008). Hydrocolloid gel particles: formation, characterization and application. *Critical reviews in food science and nutrition* 48, 361-377.
- Can-Baser, K.H. y Buchbauer, G. (2010). Handbook of Essential Oils. Science , Technology and Applications. Taylor and Francis Group, LLC, 83-119.
- Cárdenas, A., Higuera-Ciaparra, I. y Goycoolea, F. (1997). Rheology and aggregation of cactus (*Opuntia ficus indica*) mucilage in solution. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 2, 152-159.
- Cardoso, S.M., Coimbra, M.A. y Lopes da Silva, J.A. (2003). Calcium-mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydrate Polymers* 52, 125-133.
- Cerutti, M. y Neumayer, F. (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. *Invenio*, 149-155.
- Chamblee, T.S., Clark, B.C., Brewster, G.B., Radford, T. y Iacobucci, G.A. (1991). Quantitative analysis of the volatile constituents of lemon peel oil. Effects of silica gel chromatography on the composition of its hydrocarbon and oxygenated fractions. *J. Agric. Food Chem.* 39, 162-169.
- Chan, E.S., Lim, T-K., Ravindra, P., Mansa, R. F. y Islam, A. (2012). The effect of low air-to-liquid mass flow rate ratios on the size, size distribution and shape of calcium alginate particles produced using the atomization method. *Journal of Food Engineering* 108, 297-303.
- Cui, J.H., Goh, J.S., Park, S.Y., Kim, P.H. y Lee, B.J. (2001). Preparation and physical characterization of alginate microcapsules using air atomization method. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 27, 309-319.

de Oliveira, E.F., Paula, H.C.B. y de Paula, R.C.M. (2014). Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 113, 146-151.

Donsi, F., Annunziatab, M., Sessaa, M. y Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology* 44, 1908-1914.

Draget, K.I. Oestgaard, K. y Smidsroed, O. (1991). Homogeneous alginate gels: A technical approach. *Carbohydrate Polymers* 14, 159-178.

Draget, K. I. (2000). Alginates. *In Handbook of hydrocolloids*, 379-395.

Dziezak, J.D. (1998). Microencapsulation and encapsulation ingredients. *Food Technology* 42, 136-151.

Ferhat, M.A., Meklati, B.Y. y Chemat, F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 494-504.

Gacesa, P. (1988). Alginates. *Carbohydrate Polymers* 8, 161-182.

Gamarra, F.M.C., Sakanaka, L.S., Tambourgi, E.B. y Cabral, F.A. (2006). Influence on the quality of essential lemon (*Citrus aurantifolia*) oil by distillation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 23(1), 147-151.

Granados-Sánchez, D. y Castañeda-Pérez, A.D. (1997). El nopal. Historia, fisiología, genética e importancia fructícola. Trillas, México, pp 21.

Grant, G.T., Edwin, R., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS LETT* 32(1), 195-198.

Green, B.K. y Scheicher, L. (1955). Pressure sensitive record materials. US Patent no. 2,217,507, Ncr C.

Guenther, E. (1955). Essential oils, vol. III, Ed. Fritzsche Brothers INC, New York, USA, pp 777.

Helgerud, T., Gåserød, O., Fjæreide, T., Andersen, P. O. y Larsen, C. K. (2010). Alginates. *In Food stabilizers, thickeners and gelling agents*, 50-72.

Herrero, E.P., Martín del Valle, E.M. y Galán, M.A. (2006). Development of a new technology for the production of microcapsules based in atomization processes. *Chemical Engineering Journal* 117, 137-142.

Hosseini, S.M., Hosseini, H., Mohammadifar, M.A., Mortazavian, A.M., Mohammadi, A., Khosravi-Darani, K., Shojaee-Aliabadi, S., Dehghan, S. y Khaksar, R. (2013a). Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *International Journal of Biological Macromolecules* 62, 582-588.

Hosseini, S.F., Zandi, M., Rezaei, M. y Farahmandhavi, F. (2013b). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers* 95, 50-56.

Islan, G.A., De Verti, I.P., Marchetti, S.G. y Castro, G.R. (2012). Studies of ciprofloxacin encapsulation on alginate/pectin matrixes and its relationship with biodisponibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 1408-1420.

Jiamrungraksa, T. y Charunchinda, S. (2010). Preparation and Characteristics of Galangal Essential Oil/Alginate Microcapsules. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 20, 89-92.

- Khaksar, R., Hosseini, S.M., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., Mohammadifar, M.A., Mortazavian, A.M., Khosravi-Darani, K., Javadi, N.H.S. y Komeily, R. (2014). Nisin-loaded alginate-high methoxy pectin microparticles: preparation and physicochemical characterisation. *International Journal of Food Science and Technology* 1, 1-7.
- King, W., Trubiano, P. y Rerry, P. (1976) Modified Starch Encapsulation Agents offer superior Emulsification, Film Forming and Low Surface Oil. *Food Prod. Dev.* 10, 56-57.
- King, A.H. (1988). Flavor Encapsulation with Alginates. *Flavor Encapsulation* 13, 122-125.
- Koo, S.Y., Cha, K.H., Song, D., Chung, D y Pan, C. (2013). Microencapsulation of peppermint oil in an alginate-pectin matrix using a coaxial electrospray system. *International Journal of Food Science and Technology* 49, 733-739.
- Kramarenko, E. y Khokhlov, A.R. (1998). *Polym Gels Networks* 6, 45-56.
- Kwok, K.K., Groves, M.J. y Burgess, D.J. (1991). Production of 5-15 μm Diameter Alginate-Polylysine Microcapsules by an Air-Atomization Technique. *Pharmaceutical Research* 8, 341-344.
- Lamprecht, A., Schafer, U.F. y Lehr, C.M. (2000). Visualization and quantification of polymer distribution in microcapsules by confocal laser scanning microscopy (CSLM). *International Journal of Pharmaceutics* 196, 223–226.
- Lee, A.R. y Yi, E. (2013). Bioactive Properties of Citrus unshiu's Essential Oil for Its Application to Textiles. *Fibers and Polymers* 14, 1295-1300.
- Lee, B.B., Ravindra, P. y Chan, E.S. (2013). Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. *Chemical Engineering Technology* 36, 1627-1642.
- Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongaroonngamsang, N., Rojsitthisak, P. y Nimmannit, U. (2008). Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydrate Polymers* 74, 209–214.
- Liu, L., Fishman, M.L., Kost, J. y Hicks, K.B. (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials* 24, 3333-3343.
- Lupo-Pasin, B., González-Azón, C. y Maestro-Garriga, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 3, 130-151.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. y Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 1–21.
- Martins, I.M., Barreiro, M.F., Coelho, M. y Rodrigues, A.E. (2014). Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal* 245, 191-200.
- McPherson, R. (1992). Dietary fiber-a perspective. In: Gene A. Spiller (Ed.), *Dietary Fiber in Human Nutrition*, 2nd Edition. CRC Handbook, Boca Raton, FL, pp 7-11.
- Medina-Torres, L., Brito-De La Fuente, E., Torrestiana- Sánchez, B. y Katthain, R. (2000). Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food Hydrocolloids* 14, 417–424.
- Medina-Torres, L., García-Cruz, E.E., Calderas, F., González Laredo, R.F., Sánchez-Olivares, G., Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E. y Rodríguez-Ramírez, J. (2013). Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *LWT - Food Science and Technology* 50(2), 642–650.

- Mukai-Correa, R. (2003). Producao e caracterizacao de microcapsulas obtidas por gelificacao ionica para alimentacao de larvas de peixe. Campinas. Dissertacao-Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, Brasil.
- Munarin, F., Petrini, P., Fare, S. y Tanzi, M.C. (2010). Structural properties of polysaccharide-based microcapsules for soft tissue regeneration. *J Mater Sci: Mater Med* 21, 365–375.
- Nayak, A.K., Pal, D., Pradhan, J. y Hasnain, M.S. (2013a). Fenugreek seed mucilage-alginate mucoadhesive beads of metformin HCl: Design, optimization and evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules* 54, 144-154.
- Nayak, A.K., Pal, D. y Santra, K. (2013b). Plantago ovata F. Mucilage-Alginate Mucoadhesive Beads for Controlled Release of Glibenclamide: Development, Optimization, and In Vitro-In Vivo Evaluation. *Journal of Pharmaceutics* 1, 1-11.
- Nguyen, H., Campi, E.M., Jackson, W.R. y Patti, A.F. (2009). Effect of oxidative deterioration on flavor and aroma components of lemon oil. *Food Chemistry* 112, 388-393.
- Obenland, D.M., Margosan, D.A., Houck, L.G. y Aung, L.H. (1997). Essential oils and chilling injury in lemon. *HortScience* 32, 108-111.
- Paula, H.C.B., Sombra, F.M., Cavalcantea, R.D.F., Abreu, F.O.M.S., de Paula, R.C.M. (2011). Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. *Materials Science and Engineering: C* 31, 173-178.
- Park, S.J., Shin, Y.S. y Lee, J.R. (2001). Preparation and Characterization of Microcapsules Containing Lemon Oil. *Journal of Colloid and Interface Science* 241, 502-508.
- Perrechil, F.A., Sato, A.C.K. y Cunha, R.L. (2011). κ -Carrageenan–sodium caseinate microgel production by atomization: Critical analysis of the experimental procedure. *Journal of Food Engineering* 104, 123-133.
- Rehm, B.H.A. (2009). Alginates: Biology and Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1-53.
- Rodríguez-González, S. (2010). Efecto de la incorporación de mucílago de nopal sobre las propiedades sensoriales y texturales de una pasta a base de huitlacoche *Ustilago maydis*. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. UMSNH. Morelia, Mich. México, pp. 35.
- Rodríguez-González, S. (2013). Caracterización química del mucílago de seis especies de *Opuntia oedocadas* en Morelia, Michoacán y municipios aledaños. Tesis de maestría. Facultad de Químico Farmacobiología. UMSNH. Morelia, Mich. México, pp 69.
- Rubiolo, P., Sgorbini, B., Liberto, E., Cordero, C. y Bicchi, C. (2010). Essential oils and volatile: sample preparation and analysis. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 282-290.
- Ruiz, H.F. y Guerrero, B.J.A. (2009). Aplicación de las películas comestibles a base de quimostato y mucílago de nopal en fresa (*Fragaria ananasa*) en refrigeración. Tesis de maestría. Ciencia en alimentos. Universidad de las Américas Puebla. Puebla, pp 21-23.
- Saag, K.M.L., Sanderson, G., Moyna, P. y Ramos, G. (1975). Cactaceae mucilage composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26, 993-1000.
- Sáenz, C., Sepúlveda, E. y Matsuhiro, B. (2004). *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments* 57, 275-290.
- Schieberle, P y Grosch, W. (1989). Potent odorants resulting from the peroxidation of lemon oil. *Z Lebensm Unters Forsch* 189, 26-31.

Shahidi, F. y Han, X. (1993). Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33, 501-547

Sheu, T.Y. y Marshall, R.T. (1993). Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *J Food Sci* 58, 557-561.

Slade, L.; Levine, H.; Finley, J.W. (1989). Protein-water interactions: water as plasticizer of gluten and other protein polymers In: Protein quality and the effects of processing. D. Phillips, Finley, Marcell Dekker: NY, pp 9-124.

Smrdel, P., Bogataj, M., Zega, A., Planinsek, O. y Mrhar, A. (2008). Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation* 25, 90-105.

United States Pharmacopeia Convention. (2010). Food Chemicals Codex. Seventh edition p: 574-575. Disponible en http://books.google.es/books?id=zNr3YaoNZvQC&pg=PA575&lpg=PA575&dq=lemon+oil+ir+spectrum&source=bl&ots=ZtbX64H-_c&sig=uo2cjixjUhf2NFA8e4heM5fyqqw&hl=es&sa=X&ei=4BujU7SjLomRqAbclIKwBQ&ved=0CE0Q6AEwBjgo#v=onepage&q=lemon%20oil%20ir%20spectrum&f=false. Consultado el 19 de junio del 2014.

Unlemann, J., Schleifenbaum, B. y Bertram, H.J. (2002). Flavor encapsulation technologies: an overview including recent developments. *Perfumer Flavorist* 27, 52-61.

Van Straten, S. y Maarse, H. (1983). Volatile compounds in food, Division for Nutrition and Food Research, TNO:Zeinst.

Vekiari, S.A., Protopapadakis, E.E., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C., Vamvakias, M. (2002) Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a cretan lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 147-153.

Yañez, F.J., Salazar Montoya, J., A. Chaires M., L. Jiménez H., J. Márquez R., M., Ramos, R.E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva* 21, 313-319.

Zambón, A.A., Rodríguez, M.M., Miguel, V.U. y Errazu, A.F. (2002). Producción de alginatos comerciales a partir de algas pardas patagónicas. *Industria y Química*, 344.

Zamora-Vega, R., Montañéz-Soto, J.L., Martínez-Flores, H.E., Flores-Magallón, R., Muñoz-Ruiz, C.V., Venegas-González, J. y Ariza-Ortega, T. (2012). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 63, 930-935.

Zeller, B.L. y Salieb, F.Z. (1996). Production of microporous sugars for adsorption of volatile flavours. *Journal of Food Science* 61, 749-759.

Zuidam, N.J. y Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In: Zuidam, N.J. y Nedovic, V.A. editors. *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*, Dordrecht, The Netherlands: Springer; p. 3-30.