

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERO E INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**TEMA:
ELABORACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE MICROENCAPSULADOS DE
ACEITES ESENCIALES DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*) Y HOJAS DE
ISHPINK (*Ocotea quixos*) COMO ADITIVOS NUTRICIONALES PARA
PISCICULTURA**

**AUTORES:
DIEGO JAVIER CAICEDO DE LA CRUZ
MARÍA NATALI CHAMBA SÁNCHEZ**

**TUTOR:
CHRISTIAN FABRICIO LARENAS URÍA**

Quito, marzo del 2016

Cesión de derechos de autor

Nosotros, Diego Javier Caicedo de la Cruz, con documento de identificación N° 1721357026, y María Natali Chamba Sánchez, con documento de identificación N° 0104800610, respectivamente manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Elaboración y estandarización de microencapsulados con aceites esenciales de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y hojas de Ishpink (*Ocotea quixos*) como aditivos nutricionales para piscicultura”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Diego Javier Caicedo De La Cruz

Cédula: 1721357026

Fecha: Marzo 2016

Nombre: María Natali Chamba Sánchez

Cédula: 0104800610

Fecha: Marzo 2016

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Elaboración y estandarización de microencapsulados con aceites esenciales de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y hojas de Ishpink (*Ocotea quixos*) como aditivos nutricionales para piscicultura”, realizado por Diego Javier Caicedo de la Cruz y María Natali Chamba Sánchez, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo del 2016



Christian Fabricio Larenas Uría

CI. 170558604-6

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mi Dios, quién sabe guiarme por el buen camino, dándome fuerzas, paciencia y sabiduría, enseñándome a enfrentar los tropiezos sin nunca perder y seguir en el intento. A mis hermanos; David, Francisco, Flia. Andrade, Flia. Tiutiu y amigos por estar siempre presentes, acompañándome en cada momento. A mis tres angelitos; mi hermano Luis, Amy y Camila, porque ellos me cuidan y me guiaran de aquí en adelante.

Diego Javier Caicedo De La Cruz

Dedico este trabajo de investigación a Dios y a la Virgen del Cisne porque no hubo un día en el que dejé de sentir su protección, a mi familia porque a pesar de cualquier circunstancia no dejaron de apoyarme, en forma especial a Verónica porque es la persona que más impulso logra dar a mi vida y a mi abuelita Teresa por ser el ejemplo más grande de madre, esposa, y abuela que todo mundo envidiaría y tuve el privilegio de tener.

María Natali Chamba Sánchez

Agradecimientos

Agradecemos al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI de la Universidad Politécnica Salesiana, especialmente a nuestro tutor Ing. Christian Fabricio Larenas Uría MSc. por confiar y creer en nosotros para la realización de esta investigación, como también al Ing. Edison Osorio por la paciencia y colaboración que supo ofrecernos durante todo este tiempo.

Igualmente a todas aquellas personas que directa o indirectamente fueron parte de esta aventura, entre ellos profesores, ayudantes de laboratorio y compañeros de curso.

Diego Javier Caicedo de la Cruz

María Natali Chamba Sánchez

Índice

Introducción	1
Capítulo 1.	4
Marco conceptual	4
1.1 Microencapsulación	4
1.2 Métodos de microencapsulación	5
1.3 Materiales usados para la microencapsulación	7
1.4 Polímero	7
1.5 Alginato	8
1.5.1 Estructura del alginato	9
1.5.2 Solubilidad	10
1.5.3 Viscosidad	10
1.5.4 Aplicaciones e importancia de alginatos	11
1.6 Gelificación iónica	11
1.7 Emulsiones	13
1.8 Tensioactivos	14
1.8.1 Características de Monoleato de Sorbitán Polioxietileno (Tween 80). ...	15
1.9 Recubrimientos	16
1.9.1 Goma arábica	16
1.9.2 Carboximetilcelulosa (CMC)	17
1.9.3 Almidón.	17
1.10 Análisis de microencapsulados a base de aceite esencial	18

1.11 Aceites esenciales.....	19
1.11.1 Métodos fundamentales para el análisis de aceites esenciales.....	20
1.11.2 Aceite esencial de Hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>).	21
1.11.3 Aceite esencial de Ishpink (<i>Ocotea quixos</i>)......	22
Metodología.....	24
2.1 Metodología para evaluación de aceites esenciales	24
2.2 Metodología para evaluación de materia prima	25
2.3 Metodología para elaboración de microcápsulas de aceite esencial de Hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>) y hojas de Ishpink (<i>Ocotea quixos</i>)	28
2.3.1 Preparación de solución madre.....	28
2.3.2 Estabilidad de emulsión por microscopio.	30
2.3.3 Preparación de solución de cloruro de calcio a concentración 1 Molar.....	30
2.3.4 Preparación de recubrimientos.....	31
2.3.5 Elaboración de microcápsulas de Alginato de sodio.....	31
2.4 Controles del producto terminado de microcápsulas de aceite esencial de Hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>) y hojas de Ishpink (<i>Ocotea quixos</i>)	33
2.4.1 Determinación del tamaño y la forma de las microcápsulas	33
2.4.2 Determinación del rendimiento de la producción de microencapsulados.....	34
2.4.3 Cantidad de principio activo encapsulado	35
2.4.4 Contenido de aceite total.....	35
2.4.5 Contenido de aceite superficial.....	35

2.5	Estabilidad del aceite microencapsulado	36
2.5.1	Preparación de la muestra.	36
2.5.2	Análisis de estabilidad de microencapsulados en agua.	37
	Resultados y discusión.....	38
2.6	Control de calidad de aceites esenciales.....	38
2.7	Control de calidad del alginato de sodio.....	41
2.7.1	Determinación de la cantidad de sodio del alginato.	42
2.8	Elección de polímero a utilizar para formulación de emulsiones.....	42
2.8.1	Emulsión madre.....	43
2.8.2	Emulsiones finales.	43
2.9	Elección de recubrimiento para microencapsulados	45
2.10	Control de producto terminado de microencapsulados	45
	Conclusiones.....	53
	Recomendaciones.....	55
	Referencias	57

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de microcápsulas, micro esferas y microcápsula homogénea....	5
Figura 2. Tipos de polímeros A: lineal B: Ramificado C: Reticulado	8
Figura 3. Características estructurales del alginato. (a) monómeros de alginato, (b) conformación de la cadena, (c) distribución de bloques.	9
Figura 4. Formación de alginato cálcico a partir de solución de alginato de sodio y adición de iones de calcio para la formación del gel.....	11
Figura 5. Mecanismo de gelificación iónica externa e interna A y B.....	13
Figura 6. Análisis de estabilidad de microencapsulados en agua	51
Figura 7. Análisis de estabilidad de microencapsulados en agua	52

Índice tablas

Tabla 1. Métodos de encapsulación	6
Tabla 2. Clases de material de recubrimiento	7
Tabla 3. Relación valores HLB, solubilidad y aplicaciones	15
Tabla 4. Concentraciones para la formación de emulsiones con solución madre de alginato de sodio y aceite esencial.	29
Tabla 5. Análisis de control de calidad del aceite esencial de Hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>) e Ishpink (<i>Ocotea quixos</i>) de CHANKUAP	38
Tabla 6. Resultado de Cromatografía de gases (GC-MS) de aceite esencial de Hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>)	39
Tabla 7. Resultado de Cromatografía de gases (GC-MS) de aceite esencial de Ishpink (<i>Ocotea quixos</i>)	40
Tabla 8. Análisis de las dos muestras de alginato de sodio.....	41
Tabla 9. Resultado de calidad de emulsión madre	43
Tabla 10. Resultado de calidad y estabilidad de emulsión concentración 2:1	43
Tabla 11. Resultado de calidad y estabilidad de emulsión concentración 3:1	44
Tabla 12. Características provistas por recubrimientos para microencapsulados	45
Tabla 13. Determinación de forma y tamaño de microcápsulas húmedas.....	45
Tabla 14. Determinación de forma y tamaño de microcápsulas secas	46
Tabla 15. Rendimiento de producción.....	46
Tabla 16. Cantidad de principio activo encapsulado	47
Tabla 17. Contenido de aceite superficial de microencapsulados	48
Tabla 18. Analisis de estabilidad al ambiente de microencapsulado por GC-MS.....	49
Tabla 19. Análisis en cámara de estabilidad de microencapsulados por GC-MS	50

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Porcentaje de cenizas sulfatadas	27
Ecuación 2. Factor de esfericidad	34
Ecuación 3. Rendimiento de producción	34
Ecuación 4. Porcentaje de principio activo	35
Ecuación 5. Eficiencia de microencapsulación.....	36

Resumen

La investigación se realizó en los Laboratorios del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI de la Universidad Politécnica Salesiana la cual consistió en microencapsular aceites esenciales de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) e Ishpink (*Ocotea quixos*) bajo la técnica de gelificación iónica para una futura aplicación en piscicultura, como complemento en las dietas con alimento balanceado.

Los aceites esenciales obtenidos de la Fundación Chankuap ubicada en la ciudad de Macas provincia de Morona Santiago fueron utilizados como principio activo para elaborar microcápsulas mediante emulsiones a base de alginato de sodio, glicerina y tween 80 a diferentes concentraciones (2:1 y 3:1) en contacto con una solución de cloruro de calcio, además de un recubrimiento con goma arábiga. Mediante análisis de GC-MS realizado a los aceites esenciales al inicio de la investigación se consiguió información detallada de su composición química, misma que al ser comparada con los microencapsulados almacenados durante tres semanas se pudo verificar la conservación del principio activo al final del proceso a condiciones ambientales.

El sistema casero elaborado bajo las condiciones de laboratorio permitió obtener microcápsulas con una forma semiesférica, un diámetro no mayor a 800 μm en cápsulas húmedas y 700 μm en cápsulas secas. Así mismo la eficiencia de encapsulación fue del 70% en muestras con Ishpink (2:1 y 3:1), un rendimiento de producción del 85% y un porcentaje de encapsulación de principio activo del 45% en concentraciones 2:1 de Hierba luisa e Ishpink.

Palabras clave: microencapsulación, alginato de sodio, aceites esenciales, gelificación iónica, emulsión.

Abstract

The research was conducted in the laboratories of Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI of Universidad Politécnica Salesiana which consisted of microencapsulating essential oils of Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and Ishpink (*Ocotea quixos*) under the technic of ionic gels for a future application in pisciculture, as a supplement in pet food diets.

The essential oils obtained from “Fundación Chankuap” located in the city of Macas, province of Morona Santiago were used as the active ingredient to produce microcapsules through emulsions based on sodium alginate, glycerin and Tween 80 at different concentrations (2: 1 and 3: 1) in contact with a calcium chloride solution, plus a gum arabic coating. Through GC-MS analysis of the essential oils performed at the beginning of the research, detailed information of their chemical composition was obtained, and when compared with microencapsulated stored for three weeks it allowed to verify the conservation of the active ingredient at the end of the process in environmental conditions.

The homemade system developed under laboratory conditions allowed to obtain microcapsules with a hemispherical shape, a diameter no bigger than 800 μm in wet capsules and 700 μm in dry capsules. Also the encapsulation efficiency was 70% in samples with Ishpink (2: 1 and 3: 1) and the production yield of 80% and a percentage of active compound encapsulation of 45% in concentrations 2:1 of Lemon grass and Ishpink.

Keywords: microencapsulation, sodium alginate, essential oils, ionic gelation, emulsion.

Introducción

Ecuador posee un territorio privilegiado por estar ubicado geográficamente en el neotrópico, lo que ha permitido ser el hábitat de diversas especies vegetales, que hoy en día suman parte de la riqueza florística del país. Dentro de esta gran diversidad, las plantas medicinales han sido usadas ancestralmente para aliviar dificultades en la salud y ahora son aprovechadas como materia prima debido a sus principios activos para elaborar productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios (Buitrón C., 1999). Kuklinski (2000) menciona que los aceites esenciales son agentes activos propios de especies vegetales, los cuales proveen diversos efectos terapéuticos. El aceite esencial de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) contiene en su composición del 60-70% de citral (3,7 dimetil 2,6 octadienal) (Lewinsohn, y otros, 1998, pág. 1124), componente utilizado para provocar un efecto sedativo e histamínico, así como para la producción de ionona, beta-caroteno y vitamina A. Al componente mirceno se le atribuye un efecto analgésico y en si el aceite esencial de Hierba luisa según Carlson (2001, pág. 104) y Santin y otros (2009, pág. 653) posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas.

La acción antimicrobiana del aceite esencial de Ishpink (*Ocotea quixos*) ha sido estudiada debido a que actúa con un amplio espectro contra microorganismos patógenos como *Candida albicans*, *Streptococcus piogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre otras (Noriega & Dacarro, 2008, pág. 5). Además también actúa como un fitocompuesto antitrombótico, antiinflamatorio y antidiabético, en la industria alimenticia es usado como saborizante y en la cosmética se lo usa para formular cremas como también perfumes.

Estos beneficios son atribuidos en su mayoría al componente cinamaldehído, además de otros componentes de igual o mayor importancia como el eugenol, cinamato de

metilo, entre otros (Shaugnessy, 2006), (Ali, Kamal, & Mohamed, 2009), (Cabello, y otros, 2009.), (Ooi, y otros, 2006).

La microencapsulación es una técnica, que favorece a la protección y retención de sustancias líquidas, sólidas y gaseosas, mediante un polímero como es el alginato de sodio el cual forma una pared que evita que el principio activo se volatilice, desintegre o reaccione con otros compuestos externos, denominando su interior núcleo o centro activo (Parra H., 2010). El alginato de sodio por ser un polímero biodegradable y biocompatible, compuesto por algas marinas pardas de la familia *Phaeophyceae* actúa como agente estabilizante, aglutinante, espesante y gelificante, prolongando la vida útil de los productos y brindando una excelente capacidad de liberación del principio activo encapsulado (Avendaño, 2013).

En el presente estudio se utilizó el método de gelificación iónica externa debido a su fácil reproductividad a nivel de laboratorio, la cual consiste en la formulación de una emulsión a base de alginato de sodio como polímero encapsulante, la misma que al ser introducida en el sistema de goteo continuo formará microcápsulas al contacto con una solución de cloruro de calcio. Esta técnica ayudó a la obtención de un producto homogéneo que contenga como principio activo aceites esenciales que puedan incorporarse en la dieta de truchas y tilapias como complemento nutricional, dados los resultados positivos encontrados en la investigación de Ríos y otros (2014, págs. 64-65), en la cual concluyen que el aceite esencial de Hierba luisa mejora la crianza de alevines de trucha debido a que homogenizan su desarrollo, así también Salazar y otros (2015, págs. 61-63) mencionan que el aceite esencial de Hierba luisa y Cúrcuma en combinación mejoran considerablemente el peso y la longitud de alevines de tilapia roja. Por esta razón el presente estudio se enfocará en la elaboración y estandarización de microencapsulados de aceites esenciales con Hierba

luisa (*Cymbopogon citratus*) e Ishpink (*Ocotea quixos*) como aditivos nutricionales para piscicultura. Además se determinarán las condiciones óptimas de microencapsulación, empleando alginato de sodio como agente encapsulante y las características físico-químicas de los microencapsulados.

Capítulo 1.

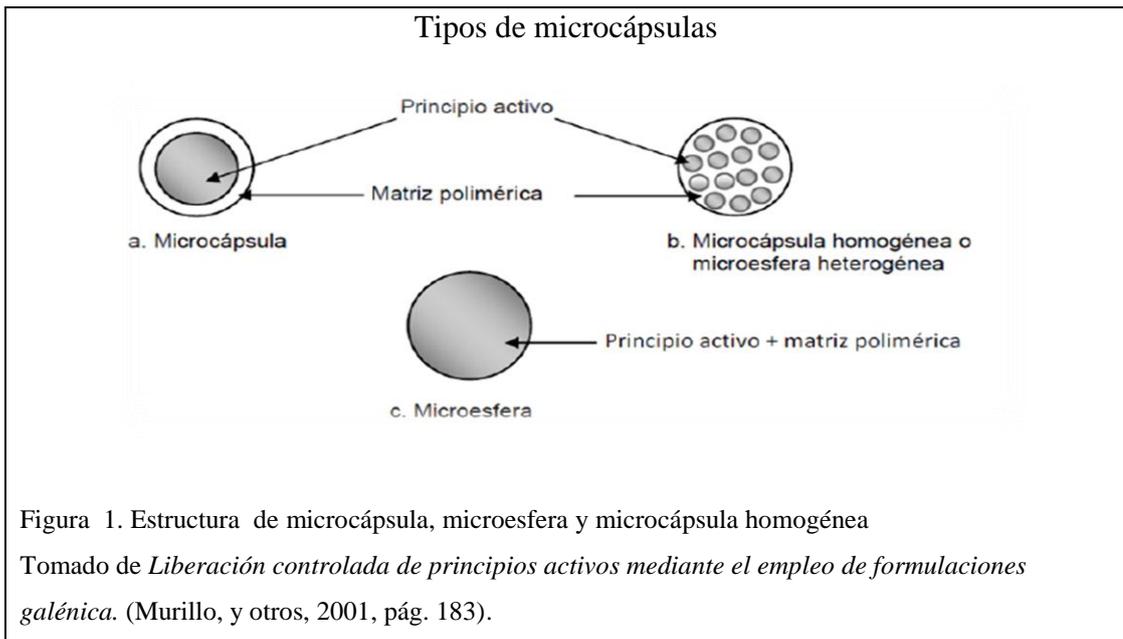
Marco conceptual

1.1 Microencapsulación

La microencapsulación es un proceso que permite recubrir un principio activo sea líquido, sólido o gaseoso formando una cubierta semipermeable, fuerte y delgada de un material polimérico, protegiéndolo de la luz, temperatura, oxígeno, pH, enzimas, entre otros. Además este proceso logra enmascarar aromas y sabores, disminuye la volatilidad, altera la densidad de un principio activo evitando la sedimentación en una suspensión, favorece una liberación controlada, brinda una mayor estabilidad en el producto aumentando la vida útil y previniendo la oxidación (Trindade, Pinho, & Rocha, 2008, pág. 104). El producto obtenido es llamado microcápsula, microesfera y microcápsula homogénea o heterogénea, las cuales se caracterizan por poseer un diámetro entre 1 a 1000 μm originando cápsulas con grandes utilidades a la industria (López & Villalta, 2009, pág. 39).

Las técnicas de microencapsulación según Saéz y otros (2004, pág. 87) se categorizan en función a su morfología como se muestra en la figura 1, siendo posible distinguir entre tres tipos de micropartículas: la primera se la conoce como microcápsulas: se presentan como partículas de forma esférica que integran o forman un recubrimiento sólido, que a su vez tiene una parte interna conformada por una sustancia densa, líquida o sólida, obteniendo un paquete de reservorio, el cual indica un estado de heterogeneidad máxima; la segunda son las microesferas: estas partículas están constituidas por una red ininterrumpida de polímeros, en la que la sustancia, que ayuda en la encapsulación se encuentra en un estado particular o sólido, por tanto en su estructura el sistema matricial debe ser lo más homogéneo posible; la tercera son las microcápsulas homogéneas: las cuales adquieren una forma

multinuclear o también se las denomina microesferas heterogéneas, definiéndoles como procedimientos intermedios entre dos estados posibles de heterogeneidad (microcápsulas) y homogeneidad (microesferas). Estas se identifican por la ausencia o presencia de zonas ricas en principio activo y por tener una estructura interna de tipo dispersión cristalina (Murillo, y otros, 2001, págs. 183, 184).



1.2 Métodos de microencapsulación

En la siguiente tabla se puede observar la clasificación de métodos o procesos de microencapsulación: físicos, físico-químicos y químicos. De igual manera los métodos de encapsulación se clasifican según el tipo de estructura formada: capsular o matricial.

Tabla 1. Métodos de encapsulación

Proceso	Método	Principio general	Material a encapsular	Sistema Formado	Tamaño de partícula
Físicos	Secado por aspersión	Pulverización y dispersión de la solución, seguido de evaporación solvente.	Varios	Matricial	-1-300 μm diámetro. -Geometría irregular
	Extrusión	Formación de una cápsula a partir de una emulsión, incorporación del material activo y encapsulante. No es apto para sustancias termolábiles.	Varios	Matricial	-1-1000 μm -Estructura irregular
	Aspersión por enfriamiento o congelación	Solidificación de líquido por reducción de temperatura.	Líquido	Matricial	-1-1000 μm diámetro
Físico-químico	Conservación compleja	Precipitación de dos polímeros y adsorción a la superficie de una fase dispersa.	Líquidos inmiscibles en agua	Capsular	-20-800 μm diámetro - Estructura de núcleo / envoltura - Sensible a la humedad
	Gelificación iónica	Reacción de gelificación iónica entre el polisacárido y un ión con carga opuesta.	Varios	Matricial capsular	>400 μm diámetro -Estructura porosa -Sensible al ambiente
Químico	Polimerización interfacial	Reacción química forma paredes a través de una polimerización de monómeros en la superficie de las gotas que contienen el material disperso.	Líquidos	Capsular	-20-30 μm de diámetro - Estructura de núcleo / envoltura - La geometría esférica - Superficie exterior lisa y uniforme
	Inclusión molecular	Asociación supramolecular de un ligando o ingrediente encapsulado dentro del material encapsulante.	Líquidos	Matricial	1-1000 μm diámetro
	Polimerización in situ	Mismo proceso que polimerización interfacial, pero este no incluye reactivos en el material del núcleo.	Líquidos	Capsular	1-1000 μm diámetro
	Incompatibilidad polímero-polímero	La separación de dos fases ricas en diferentes polímeros y la adsorción de una superficie de partículas sólidas.	Sólidos con un grado finito de solubilidad en agua	Capsular	-200-800 μm diámetro - Forma Irregular

Nota: Adaptado de (Valdés, 2005), (Martins, 2012), (Alonso, 2011), (Juarez, Fernandez, & Balart, 2015) por D. Caicedo y N. Chamba, 2016.

1.3 Materiales usados para la microencapsulación

De los métodos anteriormente mencionados, algunos son limitados debido a que existen varios materiales, usados para la microencapsulación, pero no todos tienen propiedades de recubrimiento necesarias por lo que se usan en combinación con otros materiales que lo modifiquen o complementen. Los agentes de encapsulación tienen algunas propiedades adicionales, de tal manera que en ciertas industrias se las usa para la eliminación de oxígeno, como agentes quelantes, antioxidantes y tensioactivos (Sandoval, Rodríguez, & Ayala, 2004, pág. 76). Los materiales para la microencapsulación o biomateriales más destacados para recubrimiento se los encuentra en la tabla 2.

Tabla 2.

Clases de material de recubrimiento

Clases de Material de recubrimiento	Tipos específicos de Recubrimiento
Gomas	Goma arábica, agar, alginato de sodio, carragenina.
Carbohidratos	Almidón, maltodextrinas, sacarosa, jarabe de maíz, ciclodextrinas.
Celulosas	Carboximetil celulosa, metil celulosa, etil celulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa.
Lípidos	Cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, cera de abejas, aceites, grasas.
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicato.
Proteínas	Gluteína, caseína, gelatina, albúmina.

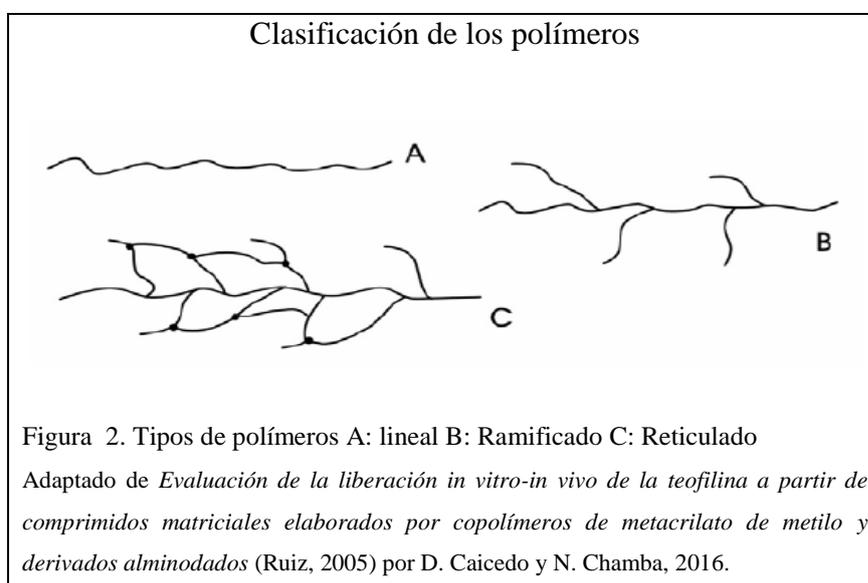
Nota: Adaptado de *Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos* (Sandoval, Rodríguez, & Ayala, 2004, pág. 77) por D. Caicedo y N. Chamba, 2016.

1.4 Polímero

El término polímero deriva de la palabra griega “*poly*” significa muchos y “*meros*” segmentos, por tanto es aquella estructura que está formada por muchos segmentos,

es decir estas son macromoléculas de alto peso molecular constituidas por la unión covalente de pequeñas unidades moleculares llamadas monómeros. Cuando en su constitución se halle un monómero del mismo tipo se lo denomina homopolímero y copolímero, si el polímero está constituido por varios o diferentes monómeros. Y a su vez estos copolímeros se pueden distribuir en distintas formas llamándolos como copolímero de bloque o de forma alternada (Villatoro, 2008, pág. 12).

En la siguiente figura se muestra la clasificación de los polímeros, ya sea de constitución homopolimérica o copolimérica.



1.5 Alginato

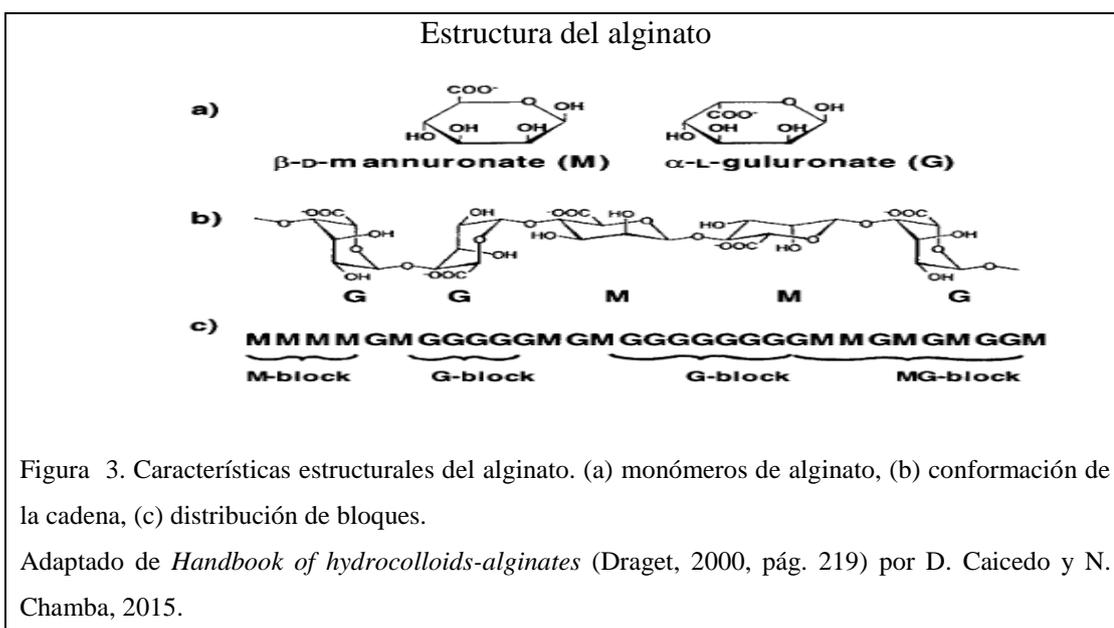
El alginato es un polisacárido extraído de algas marinas pardas en diferentes o iguales proporciones entre estas la familia destacada es la *Laminariaceae* como *Laminaria japónica*, *L. hyperborea* y *L. digitata*, *Macrocystis pyrifera*, además de especies como los géneros *Lessonia*, *Ascophyllum*, *Ecklonia*, *Durvillaea*. En su estado natural, se encuentran formando geles con iones (potasio, sodio, calcio, magnesio, estroncio y bario) (Mchugh, 1987). Estas algas se caracterizan por tener una función biológica, formando una estructura intracelular cuya matriz de gel

confiere a la planta maleabilidad y firmeza mecánica. Este polímero fue aislado por primera vez el en año de 1883 por el científico escoses el Dr. E.C.C. Stanford, el cual puso el nombre de ácido algínico (Draget, 2000).

1.5.1 Estructura del alginato.

El alginato está formado por dos unidades monoméricas (figura 3): ácido β -D-manurónico y el ácido α -L-gulurónico, unidos por enlaces glucosídicos: diecuatorial (MM), diaxial (GG), ecuatorial axial (MG) y axial ecuatorial (GM) (Draget, 2000, pág. 218).

La distribución de los bloques G y M pueden formar heteropolímeros variando bloques M y G (MGMG), a su vez homopolímeros M (MMM) y G (GGG) (figura 3) (Pawar & Edgar, 2012). Además la distribución y volumen de monómeros, como el volumen de grupos carboxílicos en la cadena polimérica conceden características de rigidez y flexibilidad según el contenido de bloques G. Sin embargo, un alto contenido de bloques M formará una cadena lineal, logrando un gel flexible, elástico y dúctil, capaz de soportar a las cadenas G (Cubero, 2002).



1.5.2 Solubilidad.

Los alginatos son solubles en agua cuando: Sus sales magnésica, sódica y potásica en disoluciones se encuentran a pH superiores de 3.5. Sus sales son cationes monovalentes como $[\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{NH}_4^+]$ del ácido algínico y su éster propilenglicol $(\text{CH}_2\text{OH})_3 \text{NH}^+$. Se encuentran en mezclas de agua y solventes orgánicos miscibles (Cubero, 2002).

Según González (2009, pág. 10) los alginatos son insolubles en: cationes polivalentes, que contengan iones de calcio, por ejemplo leche y aguas duras, así como en solventes miscibles con agua por ejemplo alcoholes (R-OH) y cetonas (R-CO-R).

1.5.3 Viscosidad.

Existe en el mercado alginatos, que presentan una alta viscosidad gracias a la concentración, distribución molecular y estado de polimerización los cuales interactúan con iones calcio generando características gelificantes, espesantes y estabilizantes en el medio (González, 2009, pág. 10). La viscosidad depende de varios factores como son: en soluciones decrece un 2.5% por cada grado de incremento en la temperatura. El proceso es reversible si se somete a la solución a un período de enfriamiento, por el contrario es irreversible si este supera los 50°C ya que se produce un estado de despolimerización. Además aumenta su viscosidad, cuando los valores de pH decrecen a valores de 4.5 producto de la disminución del ácido algínico en estado libre y no influyen a un pH de 5-10. Según Imeson (2010) también aumenta cuanto mayor sea la concentración del polímero y a un elevado peso molecular provoca un considerable efecto espesante en la solución.

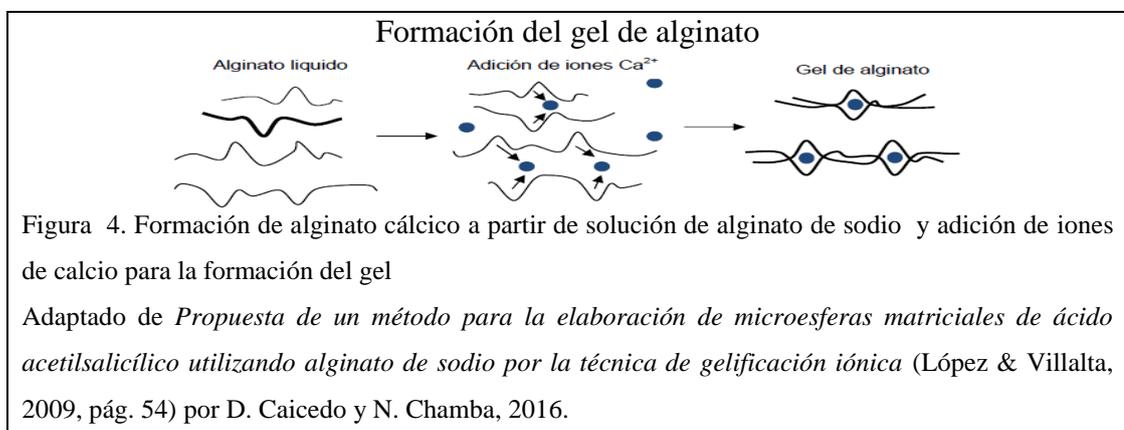
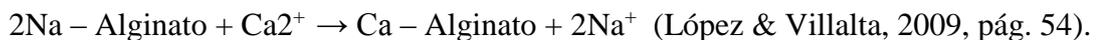
1.5.4 Aplicaciones e importancia de alginatos.

Hernández y otros (2012, pp. 156-157) explicaron que los alginatos son usados en diferentes industrias para: ayudar a estabilizar la espuma durante la elaboración de la cerveza, inmovilizar organismos benéficos para tratar aguas residuales, promotor del crecimiento de plantas, transportador de proteínas, intercambiador de metales y como materia prima para elaboración de microencapsulados. Los residuos algínicos son usados como fertilizantes y para elaborar bioetanol, entre otros.

1.6 Gelificación iónica

La gelificación es un método producto de una reacción química, que consiste en suspender el compuesto que se va a encapsular (principio activo) en la solución acuosa de alginato sódico (polianión), adicionando la mezcla por medio de goteo sobre una solución acuosa de cloruro cálcico (catión) la misma que está a una velocidad de agitación apropiada. Las mismas que al entrar en contacto producirán una pared cubierta de alginato cálcico como se puede observar en la figura 4, que es insoluble pero permeable en agua (López & Villalta, 2009, pág. 54).

La reacción química para la formación de gel de alginato es:

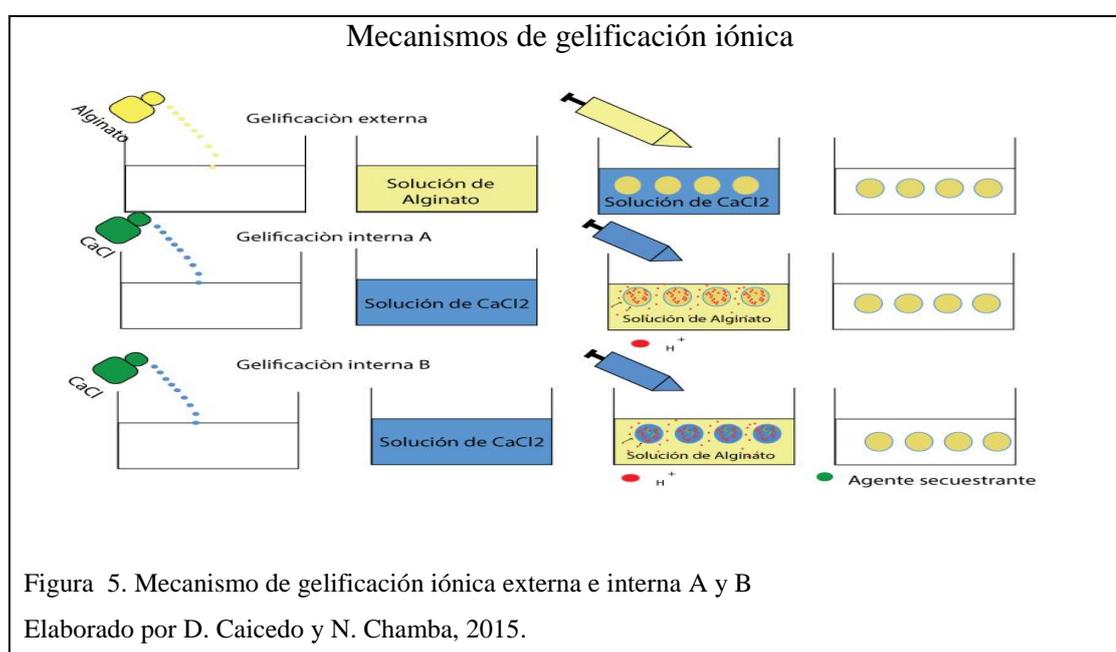


El método de gelificación iónica se ha desarrollado por dos mecanismos:

- Gelificación iónica externa: consiste en introducir la solución de alginato (pH neutro) en una solución externa con iones calcio provocando una difusión que dará lugar a la formación de gel producido en la interface y desplazándose hacia el interior por consumo de iones calcio como se lo puede observar en la figura 5, de manera que la sal de alginato es retirada con el catión solubilizado del agua conectando varias moléculas poliméricas por interacción de bloques G, dando como resultado un tamaño mínimo de 400 μm a un máximo de 1000 μm . La sal más usada es el cloruro de calcio (bajo costo y considerable cantidad de calcio) y otras como el acetato monohidratado, lactato de calcio, citrato tricálcico, fosfato dicálcico y fosfato tricálcico (Helgerud, Gazerod, Fjaeraide, Andersen, & Larsen, 2010, pág. 29). Según Draget (2000) los factores a considerar en control de transición sol-gel en gelificación iónica externa son: composición del polímero y concentración de calcio.
- Gelificación iónica interna: se basa en la liberación controlada de la sal de calcio en la solución de alginato de sodio, la cual debe estar previamente soluble o dispersa en el polímero. En la figura 5 se puede observar cómo el ion calcio puede liberarse de dos formas: (a) cuando la sal de calcio es insoluble a pH neutro pero soluble a pH ácido se puede adicionar un ácido orgánico como acético, adípico y el glucono delta-lactono los cuales acidificarán el medio logrando solubilizar los iones calcio. (b) cuando la sal de calcio es soluble se agrega a la solución alginato-calcio un agente secuestrante como el sulfato de calcio (ventajosa solubilidad y bajo costo), fosfato o citrato de

calcio, retrasando el proceso de formación de gel para permitir que el ácido orgánico libere los iones calcio logrando obtener un gel homogéneo (Helgerud, Gazerod, Fjaeraide, Andersen, & Larsen, 2010, págs. 29-30).

Según Draget (2000) los factores a considerar en control de transición sol-gel en gelificación iónica interna son: solubilidad, concentración de sal de calcio, concentración del agente secuestrante y del ácido orgánico empleado.



1.7 Emulsiones

Una emulsión es una mezcla coloide termodinámicamente inestable, que consta de dos fluidos inmiscibles entre sí, donde uno de ellos se encuentra disperso en el otro en forma de gotas muy delgadas cuyo diámetro en general es superior a 0,1 μm (Gómez & Munguia, 2014, pág. 24). Según Windhab y otros (2005, pág. 24) el tamaño de la gota en fase dispersa alcanza el proceso de homogenización y estos mencionan que las emulsiones se pueden clasificar como micro (10-100 nm), mini (100-1000 nm) y macroemulsiones (0.5-100 μm). Además por el tamaño de la partícula se puede catalogar a la emulsión según su apariencia como: $0 > 1 \mu\text{m}$

(blanco-lechosa), $1 < 0 > 0,1 \mu\text{m}$ (blanco-azul), $0,1 < 0 > 0,05$ (gris transparente) y $0 < 0,05$ (transparente) (Lupo, 2012, pág. 46).

Las emulsiones están formadas por dos o más fases líquidas, las cuales se presentan como gotas delgadas “fase dispersa” y la suspensión de esas gotas “fase continua”. A su vez estas forman diferentes tipos de emulsiones: (a) cuando el aceite (fase oleosa) está disperso en agua (fase acuosa) “O/W”, (b) cuando el agua (fase acuosa) se encuentra dispersa en aceite (fase oleosa) “W/O”, (c) mezclas complejas como aceite-agua-aceite “O/W/O” y agua-aceite-agua “W/O/W” (Gómez & Munguia, 2014, pág. 24), (Tanford, 1980). La mezcla de estas fases se debe a un proceso en el cual están involucrados equipos de agitación como homogeneizadores (Charcosset, 2009, pág. 24).

Una de las características importantes de las emulsiones alimenticias en su estabilidad es la capacidad de resistir cambios químicos, físicos y microbiológicos que modifiquen sus propiedades con el pasar del tiempo según la naturaleza del producto alimenticio utilizado. Esta estabilización se logra gracias a la incorporación de agentes emulgentes, tensioactivos, sales y polímeros (Gómez & Munguia, 2014, pág. 25).

1.8 Tensioactivos

Son sustancias con una estructura molecular hidrófila (grupos iónicos o polares) las cuales tienden a situarse en la interfase hacia el agua y una parte hidrófoba direccionada en sentido al aceite o aire (cadena hidrocarbonada lineal o ramificada) logrando disminuir la tensión superficial o interfacial afectando la energía de las superficies en contacto (Lupo, 2012, pág. 40).

El responsable de los fenómenos de la actividad superficial y de la agregación supramolecular de los tensioactivos se conoce como Balance Hidrófilo-Lipófilo (HLB). Este comprende valores adimensionales de 0-20 (tensioactivos no iónicos), los cuales proporcionan información sobre la solubilidad en W/O, mientras que valores menores a 9 son tensioactivos no solubles en disolventes apolares (tensioactivos lipófilicos), usados para estabilizar emulsiones W/O. Así mismo valores mayores a 9 en HLB presentan afinidad por disolventes polares usados para estabilizar emulsiones O/W (Schramm, 2005, pág. 206). En la siguiente tabla se puede observar las diferentes relaciones del HLB y sus aplicaciones.

Tabla 3.

Relación valores HLB, solubilidad y aplicaciones

HLB	Aplicaciones	Solubilidad en agua	Estado del tensioactivo en agua	EJEMPLO
3-6	Emulsiones W/O	1-4	No dispersable	Span 60, 80, 83, 85, 120.
7-9	Agente humectante	3-6	Poco dispersable	Span 20, 40.
8-15	Emulsiones O/W	6-8	Dispersión turbia inestable	Span 20. Tween 21, 60, 61, 65, 80.
13-15	Detergente	8-10	Dispersión turbia estable	Tween 21, 40, 60, 80.
15-18	Solubilizador	13	Solución transparente	Tween 20, 40, 80.

Nota: Adaptada de *Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales* (Lupo, 2012, pág. 43) por D. Caicedo y N. Chamba, 2016.

1.8.1 Características de monoleato de sorbitán polioxietileno (Tween 80).

Los tweens son derivados de los etoxilados, los cuales se producen por reacción del óxido de etileno con un grupo hidroxilo libre del grupo éster del sorbitán (Alegria & Amaya, 2007, pág. 362). Es así como, según Riojas (2011, pág. 578) al tween se le atribuye las siguientes características: insoluble en agua; soluble en disolventes orgánicos; no forma sales insolubles con iones calcio, férrico, entre otros; usado en soluciones acidas fuertes, baja toxicidad y fitotoxicidad; forma emulsiones estables;

agente espumante leve a moderado; eficaz biorremediador de suelo en un 99.6% por presencia de baja Concentración Micelar Crítica (CMC) 12g/L.

1.9 Recubrimientos

Los recubrimientos que se usan en microcápsulas o microesferas son: almidón, maltodextrinas, quitosano, ciclodextrinas, celulosa, carboximetilcelulosa, goma arábica entre otros, los cuales permiten que sean comestibles y biodegradables. Estos desarrollan una permeabilidad selectiva provocando una reducción de O₂ y un aumento del CO₂ en el ambiente, lo que conlleva a disminuir la pérdida de humedad, retrasa el transporte de solutos, inmovilizan compuestos volátiles y mejora las propiedades mecánicas para la manipulación (García & López, 2012).

1.9.1 Goma arábica.

Es un heteropolisacárido de alto peso molecular (350 kDa) extraído de la resina de los árboles del género Acacia, su estructura química está constituida por proteínas (1-3%) y carbohidratos (97%) dentro de ellas la D-galactosa y L-arabinosa (López, Goycolea, Valdez, & Calderón, 2006, pág. 184). Posee un carácter anfifílico que le permite absorber superficies lipofílicas y le confiere una efectiva protección contra la oxidación (García & López, 2012, pág. 90). Además según González (2014, pág. 302) la goma arábica funciona como agente estabilizante, emulsionante y espesante por su capacidad para formar soluciones con grandes concentraciones. También prevenir la cristalización del azúcar, el escurrimiento de grasas y evita la interacción con el ambiente frente a otros ingredientes formando una barrera protectora.

1.9.2 Carboximetilcelulosa (CMC).

Es un polímero derivado del éter de la celulosa obtenida mediante la adición de grupos carboximetilos a la molécula, posee un carácter higroscópico, alta viscosidad en soluciones diluidas, excelentes propiedades para formar películas, inocuidad y excelente comportamiento como coloide protector y adhesivo, no tóxico, de bajo costo y biodegradable (Enebro, Momcilovic, Siika-Aho, & Karlsson, 2007). En la industria alimenticia es usado como agente estabilizante, espesante, suspensor y evita la cristalización (Terán & Escalera, 2007, pág. 108). Las películas formadas son comestibles, resistentes, transparentes y pueden ser flexibles con la adición de plastificantes como glicerol (Boateg, y otros, 2009).

1.9.3 Almidón.

Son polisacáridos de reserva, es decir se localizan en forma de gránulos intracelulares compactos con estructura y dimensión propia (20-130 micrones) según el tejido de la planta (Miramont, 2012, pág. 17). Su composición está formada por amilosa “polímero lineal” (20-30%) y amilopectina “polímero ramificado” (70-80%), esta proporción permite que de la cantidad de amilosa dé como resultado una película frágil y quebradiza. Es biodegradable y de bajo costo por la abundancia de sus fuentes. Insoluble en agua fría, exhibe una elevada viscosidad a altas temperaturas (60-70°C), sirve como barrera (O₂ y lípidos), por ejemplo el almidón de yuca. Debido a sus propiedades hicrocoloides el almidón ejerce funciones, como agente de recubrimiento, espesante, estabilizante entre otros (Miramont, 2012, pág. 21), (Domínguez & Jiménez, 2012, pág. 115 y 116), (Qiu- Ping & Wen- Shui, 2008).

1.10 Análisis de microencapsulados a base de aceite esencial

Para análisis de las características morfológicas y de tamaño se realiza por el método de microscopía óptica o de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy) (Lozano, 2009), (Gordillo Galeano, 2013).

El rendimiento de producción de microencapsulados permite conocer el porcentaje de microcápsulas, obtenidas a partir cierta cantidad de principio activo y polímero. Este permite tener una visión económica en este tipo de producción para producirlo a mayor escala (Lozano, 2009).

La eficiencia de encapsulación es la cantidad de principio activo presente en las microcápsulas, dicho principio activo debe ser extraído del polímero, mediante un disolvente ante el cual presentan solubilidad e insolubilidad (Lozano, 2009).

Los polvos con mayor tamaño de partícula poseen menor aceite superficial debido a una menor área de superficie, sin embargo se advierten de otros factores que también controlan el contenido de aceite superficial en los microencapsulados (Kim. Y & Morr. C, 1996). Un alto contenido de aceite superficial puede causar no solo una mayor pérdida de componentes volátiles por evaporación, sino también una mayor inestabilidad si los compuestos son más propensos a la oxidación (Madai Bringas & Pino, 2012).

La estabilidad del producto indica la durabilidad de los componentes volátiles. La estabilidad oxidativa es un factor a considerar debido a que los aceites esenciales de cítricos y sus combinaciones pueden emitir olores ajenos durante su conservación (Madai Bringas & Pino, 2012). Este análisis se basa en acelerar el proceso oxidativo por medio de un aumento de la temperatura y concentración de oxígeno, anunciando así su durabilidad (Holgado Arroyo, 2011).

1.11 Aceites esenciales

Los aceites esenciales forman una mezcla compleja de diversos compuestos de aromas volátiles, entre ellos los compuestos terpénicos (alcoholes y fenoles; aldehídos y cetonas; ésteres; éteres e hidrocarburos) y no terpénicos (Reyes, Palou, & López, 2012). Poseen ciertas características entre las que destaca su baja densidad con respecto al agua; elevado índice de refracción; son volátiles; solubles en alcoholes, éter y cloroformo e insolubles en agua; incoloros, ligeramente amarillos y líquidos a temperatura ambiente (Albarracín & Gallo, 2003). Generalmente los aceites esenciales son extraídos de diferentes partes de la planta como las hojas, raíz, tallos, flores, fruto y otros. El rendimiento de extracción de aceites esenciales es bajo, oscila entre el 0,01% - 2%, esto depende de varios criterios como el origen, la especie, edad, órgano de la planta, condiciones climáticas, el lugar de crecimiento, temperatura, y otras (Bandoni, 2002).

Los aceites esenciales se clasifican de acuerdo a su origen: naturales, artificiales y sintéticos; según su consistencia: esencias, bálsamos y resinas; además se clasifica de acuerdo a sus componentes mayoritarios: monoterpenos, monoterpenoides, sesquiterpenos, fenilpropanos (Bandoni, 2002), (Albarracín & Gallo, 2003).

Existen varios métodos extractivos para aceites esenciales: con solventes volátiles, destilación con vapor de agua, entre otros (Eikani, Golmohammad, & Roswhanzamir, 2007), (Albarracín & Gallo, 2003). La destilación por arrastre con vapor de agua es la técnica más utilizada debido a su elevado rendimiento, pureza y sencillez de la técnica, además de ser un proceso económico y rentable. Esta técnica consiste en cortar en trozos pequeños la muestra vegetal fresca, y colocar en un recipiente cerrado, el cual será expuesto a una corriente con vapor de agua sobrecalentado, fluye mojado y a una presión relativamente baja, penetrando a la

muestra vegetal. La esencia es arrastrada, condensada en un refrigerante, recaudada en un vaso florentino y separada de la fase acuosa por diferencia de densidad (Bandoni, 2002), (Martinez M., 2003).

1.11.1 Métodos fundamentales para el análisis de aceites esenciales.

Los métodos fundamentales para el análisis de aceites esenciales son: determinaciones físicas (aroma, peso específico, índice de refracción, poder rotatorio, solubilidad en mezclas alcohol-agua) y determinaciones químicas: (índice de acidez libre, saponificación y éster, determinación de aldehídos y cetonas, índice de acetilo, técnicas cromatográficas; cromatografía de capa fina (CCF), gaseosa (CGL), líquida de alta resolución (HPLC), métodos espectroscópicos; espectrometría de masas (EM); espectroscopia infrarroja (IR); y sistemas cromatográficos acoplados a técnicas espectroscópicas, especialmente la cromatografía de gases acoplada a la espectroscopia infrarroja (GC-FTIR) y la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS). Este último es un método de separación de componentes adecuado para la identificación, debido a que los aceites son volátiles y de bajo peso molecular (< 300g/mol). La sustancia o esencia se inyecta directamente en el cromatógrafo, sin ningún tratamiento previo, lo cual elimina posibles modificaciones en la composición de la muestra o en la estructura de sus constituyentes debido a un pretratamiento. Harvey (2000, págs. 580-581) menciona que en el cromatógrafo los componentes de la esencia o sustancia se separan en dos fases, una estacionaria (sólida o líquida) y otra móvil (gas N₂, He, H₂) tras lo cual penetran en el espectrómetro de masas, permitiendo registrar los espectros de cada una de las sustancias separadas por medio de 34 patrones de fragmentación, que se observan en sus espectros de masas, obtenidos por las técnicas de: ionización

química e impacto electrónico, ya que el espectrómetro de masas es el que posee una biblioteca interna debido a su índice de retención; éste es aquel que permite identificar los espectros de los compuestos en aceites esenciales (Albarracín & Gallo, 2003), (Bandoni, 2002).

El índice de retención de Kováts es un método en el que produce una retención cualitativa, comparando los valores o la posición del pico del compuesto de interés con los valores calculados o proporcionados a los picos de hidrocarburos modelo, ayudando a identificar los componentes de la mezcla (1965).

El espectro infrarrojo permite detectar la presencia de anillos aromáticos, grupos hidroxilo, carbonilo, enlaces dobles C=C, etc. Para determinar el espectro se coloca una pequeñísima cantidad (gota) del componente en una celda de NaCl y se introduce en el espectrofotómetro. El espectro IR de una molécula es como su DNI o medición espectral, característico de ella y se puede comparar con una base de datos de espectros (Bandoni, 2002).

1.11.2 Aceite esencial de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*).

Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) es una hierba perenne, perteneciente a la familia *Poacea*, contiene en sus hojas aceites esenciales que son considerados como desecho del metabolismo de la planta cuya composición química es muy compleja, es por ello que mediante análisis fitoquímicos se ha podido identificar diferentes componentes como: citral, citral a, citral b, citronelol, acetato de citronelol, acetato de geraniol, 6-metil-hepta-5-en-2-ona, limoneno, oxido de linaldol, mentol, a-pineno, b-pineno, sesquiterpeno, oxi-bisaboleno, b-cardineno, humuleno, alcanos-3-metil-hepta-2-ona, metil-heptenol, entre otros (Kaoba, y otros, 2006).

El citral (3,7 dimetil 2,6 octadienal) representa del 60-70% en la composición del aceite esencial de Hierba luisa, asimismo posee dos isómeros geométricos conocidos como α -citral “geranial” el cual representa una mayor proporción y β -citral “neral”, su diferencia radica en la posición del doble enlace en el átomo de carbono terminal (Lewinsohn, y otros, 1998, pág. 1124).

Algunas de las características y usos importantes de *Cymbopogon citatus* son: el olor característico a limón, su color amarillo fuerte, forman compuestos cíclicos debido a la sensibilidad que presenta por lo ácidos, provee un efecto sedativo e histamínico específicamente por la presencia del monoterpeno citral que a su vez es usado en la producción de ionona, beta-caroteno y vitamina A, además es analgésico por contener mirceno y posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas por los aceites esenciales (Carlson, Machad, Pereira, & Bolsan, 2001, pág. 104), (Santin, y otros, 2009, pág. 653).

1.11.3 Aceite esencial de Ishpink (*Ocotea quixos*).

El aceite esencial de Ishpink (*Ocotea quixos*) es extraído del tallo y hojas del árbol femenino perteneciente a la familia *Lauracea* se caracteriza por poseer un olor particular a canela, dicho árbol florece y fructifica cada dos años cuando alcanza mínimo veinte años de madurez (Noriega & Dacarro, 2008), (Cárdenas, Castaño, SUA, & Quintero, 2015). Análisis fitoquímicos muestran un sinnúmero de compuestos como: canfeno, cariofileno, linalol, 4 terpineol, eremofilo, acetol, alfa terpineol, alfa humuleno, trans-cinamaldehído, benzaldehído, en trazas aparecen otros fenilpropanoides (safrol y ésteres del ácido cinámico), mono y sesquiterpenos, que aunque solo aparecen en trazas contribuyen al sabor y olor de manera importante (Cazorla, 2013, pág. 30).

Noriega y otros (2008, pág. 5) determinaron que el aceite esencial de Ishpink actúa como agente antimicrobiano frente a ciertos microorganismos patógenos, entre los que se menciona a *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus piogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* (0.09-1.25% concentración) y *Escherichia coli* (1.25% concentración). Además actúa como un fitocompuesto antitrombótico, anticoagulante, vaso relajante, antiinflamatorio y antidiabético (Domingo & López , 2003).

El trans-cinamaldehído del Ishpink es un producto natural del Cinamaldehído con un grupo fenol unido a un aldehído insaturado, actúa como saborizante en la industria alimenticia, además contiene propiedades antimutágenas, antioxidantes, anticancerígenas, antifúngicas y antimicrobianas (Shaugnessy, 2006), (Ali, Kamal, & Mohamed, 2009), (Cabello, y otros, 2009.), (Ooi, y otros, 2006).

Capítulo 2.

Metodología

Para la realización del presente trabajo se emplearon aceites esenciales de Hierba luisa e Ishpink, con las características que se pueden observar en la ficha técnica del anexo 1, estos aceites se obtuvieron de la Fundación Chankuap ubicada en la provincia de Macas en el Oriente Ecuatoriano. Como polímeros encapsulantes se empleó alginato de sodio de diferentes casas comerciales, a las que se denominó como muestra 1 (M1) (anexo 2) y muestra 2 (M2) (anexo 3). Antes de la elaboración de microencapsulados se evaluó la materia prima proporcionada por el Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana.

2.1 Metodología para evaluación de aceites esenciales

Para la evaluación de aceites esenciales de Hierba luisa e Ishpink se procedió a analizar su composición mediante Cromatografía de Gases acoplada a Masas (GC-MS), el equipo trabajó con las siguientes características y parámetros:

- Equipo: Varian modelo 3900 y Varian Saturn 2100D
- Parámetros del GC/MS:
 - Flujo de gas Helio 1mL x min
 - Temperatura del inyector a 280°C
 - Split Ratio a 50
- Columna capilar:
 - Temperatura inicial 55°C,
 - Temperatura media 100°C (1°/min)
 - Temperatura final 250°C (5°/min)

- Tiempo de espera a 250°C (15 min)
- Tiempo total de análisis (90 min)
- Rango de masa de 35 a 400 m/z
- $\sum i=70$ eV

Para ello se preparó la muestra a inyectar tomando 1mL de diclorometano con 10 uL de aceite esencial Hierba luisa e Ishpink respectivamente y se colocó en un frasco ámbar de 1mL de capacidad, se tomó 2 uL de la muestra preparada e inyectó en el (GC-MS), se observó y registró los espectros obtenidos.

Así mismo se confirmó los datos registrados de composición mediante el análisis de FIT-IR, por lo cual se procedió a llenar con aceite esencial una celda ATR, controlando no sobrepasar su capacidad.

La densidad relativa se evaluó mediante el densitómetro (Mettler Toledo modelo DM40) y por el método IUPAC 2. 101 con su respectivo factor (Dieffenbacher & Pocklington, 1992, pág. 33). Para el índice de refracción se midió en el equipo ATAGO NAR-1T LIQUID. Además se aplicó el ensayo organoléptico para observar su apariencia, color y olor.

2.2 Metodología para evaluación de materia prima

A la muestra M1 y M2 se les realizó varios análisis referentes a su composición y características fisicoquímicas para establecer la calidad y pureza del polímero, determinando cuál sería el más idóneo para cumplir con nuestro objetivo. Cabe mencionar que los procedimientos han sido implementados por diversos autores y algunos han sido modificados de acuerdo a nuestras condiciones.

Se realizaron diferentes pruebas para la identificación y pureza de la materia prima, dentro de ellas se desarrolló el ensayo de solubilidad, donde se pesó 2 g de muestra M1 y M2 de alginato de sodio en una balanza analítica añadiéndose la muestra en los diferentes tubos de ensayo, cada uno con un volumen de 20 mL de agua destilada, etanol, cloroformo y éter de petróleo, además se observó el color de cada solución formada y si cada una es soluble e insoluble. Para las pruebas de pureza del polímero se determinó por medio del ensayo organoléptico, el cual consistió en pesar 2 g de muestra M1 y M2 en una balanza analítica en estado sólido, con ayuda de una espátula y caja Petri se evidenció su apariencia, color, olor y presencia de partículas extrañas. Posteriormente se evaluó el contenido de humedad pesándose 2 g de la muestra M1 y M2, llevándolas a una estufa de secado a una temperatura de 105°C durante 4 horas para obtener el porcentaje de pérdida de agua. Así mismo se realizó una solución de 2 g por cada muestra de M1 y M2 en 400 mL de agua destilada para verificar su pH, conductividad eléctrica, densidad y viscosidad (Torres E., 2014).

Según Mercosur (2015) para el análisis de pureza con cenizas sulfatadas se pesó entre 1 a 2 g de M1 y M2 de alginato de sodio en crisoles previamente tarados a ignición por 30 min en una mufla, se los enfrió en un desecador y se registró sus pesos. Se añadió 1 mL de ácido sulfúrico a cada muestra ingresándolas nuevamente a la mufla a una temperatura hasta llegar a su carbonización. El residuo se enfrió y humedeció con 1 mL de ácido sulfúrico, se calentó levemente hasta que no se desprendan humos blancos y luego se carbonizó (incinerar a $600 \pm 50^\circ\text{C}$ entre 2 y 3 horas). Se enfrió, pesó e incineró por 30 min más. Se repitió el proceso hasta que la diferencia entre pesos sucesivos no sea mayor a 0.5 mg.

Se calculó el porcentaje del residuo según la siguiente fórmula:

Ecuación 1. Porcentaje de cenizas sulfatadas

$$\% \text{ residuo de ignición (cenizas sulfatadas)} = \frac{P2-P1}{P3} \times 100$$

Fuente: (Mercosur, 2015).

Donde:

P1= Peso del crisol después de la calcinación y enfriamiento.

P2= Peso del crisol con muestra después de la calcinación y enfriamiento.

P3= Peso inicial de la muestra.

Posteriormente se evaluó la estructura molecular del alginato de sodio de cada una de las muestras mediante el método de la pastilla de bromuro de potasio (KBr), para lo cual se pesó 5 mg de muestra M1 y M2 con 100 mg de KBr respectivamente. También se determinó la cantidad de sodio presente en las muestras para ello se pesó 300 mg de (M1) y (M2), se colocó en los tubos digestores y se añadió a cada uno 5 mL de ácido nítrico dejándolos reposar por 20 min aproximadamente en la sorbona, se tapó los tubos digestores con las muestras listas procurando no apretarlas fuerte y se las llevó al microondas (Speedwave modelo MWS-2 anexo 7) programado a un tiempo de 35 min. Transcurrido este tiempo se retiró del digestor las muestras y así mismo se las llevó a la sorbona para reposar durante 15 min, se aflojó con suma suavidad cada tubo digestor permitiendo la salida de gases y obteniendo una sustancia con una coloración amarilla oscura, se filtró al vacío y se las colocó en balones aforados de 50 mL. De cada muestra se tomó 1 mL y se aforó en un balón de 100 mL, lista la muestra se procedió a leer en el espectrofotómetro de absorción atómica (Varian modelo SpectrAA-55).

2.3 Metodología para elaboración de microcápsulas de aceite esencial de

Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y hojas de Ishpink (*Ocotea quixos*)

Se preparó emulsiones con los dos tipos de muestras de alginato de sodio (M1 y M2), las cuales fueron sometidas al contacto con una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) 1 Molar (1M). El resultado de la interacción de las dos soluciones y los análisis anteriores permitió saber cuál de los polímeros resultó más adecuado para la microencapsulación del principio activo y con el que se trabajó durante todo el proceso de microencapsulación.

2.3.1 Preparación de solución madre.

Se preparó una solución madre del polímero encapsulante a una concentración de 2.5% p/v de alginato de sodio (M1) en 100 mL de agua destilada a temperatura ambiente en un vaso de precipitación, empleando un magneto y una plancha magnética permitiendo una agitación constante en un intervalo de velocidad de 700 a 900 rpm durante aproximadamente 30 min hasta que se forme una solución homogénea y viscosa. Posteriormente se adicionó a la solución madre un volumen de 2.5 mL de glicerina (agente humectante, conservante) y 2.5 mL de tween 80 (agente tensioactivo) adquiridos por el CIVABI (anexo 4 y 5). Se mantuvo la solución en agitación constante durante 15 min a una velocidad de 700 y 900 rpm, cabe mencionar que para la preparación de la solución no fue necesario someter a calentamiento, ya que puede cambiar su viscosidad. Inmediatamente a la solución madre se la llevó a homogenizar empleando un ultraemulsificador (Silverson L5M-A) en un intervalo de velocidades de 8000 a 10000 rpm durante 8 a 10 min, se dejó reposar la solución durante aproximadamente una hora hasta que la presencia de espuma debido al uso del ultraemulsificador desaparezca por completo y la

temperatura adquirida se estabilice a temperatura ambiente. Ya lista la solución madre de ALG (alginato de sodio) para las cuatro concentraciones (400 mL de solución en total) se formó las diferentes dispersiones o emulsiones a diferentes concentraciones de alginato de sodio (ALG) y aceite esencial de Hierba luisa (HL) (*Cymbopogon citratus*) e Ishpink (*Ocotea quixos*) (IS). (ALG/AE) 1:1; 2:1; 1:2; 3:1 (Paula, 2010).

Tabla 4.

Concentraciones para la formación de emulsiones con solución madre de alginato de sodio y aceite esencial.

Concentraciones	1:1	2:1	1:2	3:1
Emulsión madre	50mL	66,66 mL	33,32 Ml	75 mL
AE (HL e IS)	50 mL	33,32 mL	66,66 mL	25 mL
Total emulsión	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL

Nota: Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015

Cuando la solución madre de alginato de sodio se encontró a temperatura ambiente se adicionó las diferentes concentraciones según la tabla 4 de (ALG/AE) respectivamente, manteniéndose en agitación constante durante 8 a 10 minutos empleando un ultraemulsificador a un intervalo de 10000 rpm aproximadamente. Por último se dejó reposar la emulsión durante 24 horas en refrigeración a temperaturas de 0 a 4°C.

Para cada concentración de (ALG/AE) se asignó un código de identificación, estos son:

- M1:1-IS/HL es la muestra de la emulsión con concentración 1 de la solución madre de alginato de sodio y concentración 1 del aceite esencial de Ishpink (IS) o Hierba luisa (HL).

- M2:1-IS/HL es la muestra de la emulsión con concentración 2 de la solución madre de alginato de sodio y concentración 1 del aceite esencial de Ishpink (IS) o Hierba luisa (HL).
- M1:2-IS/HL es la muestra de la emulsión con concentración 1 de la solución madre de alginato de sodio y concentración 2 del aceite esencial de Ishpink (IS) o Hierba luisa (HL).
- M3:1-IS/HL es la muestra de la emulsión con concentración 3 de la solución madre de alginato de sodio y concentración 1 del aceite esencial de Ishpink (IS) o Hierba luisa (HL).

2.3.2 Estabilidad de emulsión por microscopio.

Para esta prueba se tomó 1 gota del reactivo azul de metileno o rojo sudan 3 y 1 gota de las emulsiones M2:1-IS/HL; M3:1-IS/HL respectivamente, se colocó y observó en un portaobjetos con ayuda de un microscopio óptico la presencia de aceite esencial y la heterogeneidad de la emulsión, ya que esto permitió identificar si la emulsión es agua/aceite (O/W) o aceite/agua (W/O) (Martín, Garcia, & Rodriguez, 2011).

2.3.3 Preparación de solución de cloruro de calcio a concentración 1

Molar.

Se preparó una solución de CaCl_2 1M a un volumen de 200 mL de agua destilada. Dicha solución se mantuvo en refrigeración a una temperatura entre 0 a 4°C, hasta su uso en la elaboración de microcápsulas (Paula, 2010).

2.3.4 Preparación de recubrimientos.

Como recubrimiento se usó goma arábiga (anexo 6). Según Paula (2010) se preparó una solución al 10% en 100 mL de agua destilada. Para ello se pesó 10 g de goma arábiga y se colocó en un vaso de precipitación con 100 mL de agua destilada, esta solución se sometió a un proceso de agitación constante durante aproximadamente 10 min con ayuda de una plancha magnética a temperatura ambiente. Posteriormente se llevó dicha solución a las mismas condiciones de refrigeración a la que fue sometido el CaCl_2 . Este proceso se realizó también para almidón y carboximetilcelulosa obtenidas del CIVABI.

2.3.5 Elaboración de microcápsulas de alginato de sodio.

Para la elaboración de las microcápsulas se tomó un volumen de 15 a 20 mL de las emulsiones finales M2:1-IS/HL; M3:1-IS/HL y se las añadió al sistema de goteo continuo casero, con ayuda de una bomba al vacío se logró cortar el tamaño de las gotas para obtener un tamaño adecuado al momento de caer a la solución de CaCl_2 , provocando la gelificación de las gotas, producto de una interacción iónica (Willaert & Baron, 1996) (anexo 16). Una vez terminada la cantidad suministrada en el sistema se llevó las cápsulas a través de tamices de 70, 350 y 500 μm , los cuales permitieron realizar 3 lavados con agua destilada. Las microcápsulas ya lavadas se las llevó a reposar en una solución de CMC, almidón y goma arábiga durante un tiempo de 45 a 60 minutos a condiciones ambientales, esto ayudó a elegir el mejor recubrimiento para la producción (anexo 17). Luego del tiempo de reposo en las soluciones de recubrimiento las microcápsulas fueron lavadas, por última vez llevándose a recipientes, los cuales poseían de base papel absorbente y papel filtro, para retirar todo el exceso de agua durante el proceso (anexo 18). Finalmente ya

retirado el exceso de agua se distribuyeron las microcápsulas en toda el área de cajas Petri de 15x15 cm de diámetro sometiéndolas a un proceso de secado que consistió en: Primer secado- estufa (25°C durante 48 horas), Segundo secado- estufa (35-40°C durante el día) y (25-40°C durante la noche) por un lapso de 48 horas y Tercer secado- desecador (condiciones ambientales) por 48 horas. Durante los diferentes periodos de tiempo fue necesario registrar ciertas características de las microcápsulas como son: tamaño, color, olor y apariencia, es importante mencionar que las microcápsulas fueron almacenadas en fundas ziploc de aluminio cerradas herméticamente para posteriores análisis (anexo 19).

2.3.6 Extracción de aceite esencial de microcápsulas para Cromatografía de Gases acoplada a Masas (GC-MS).

Para la extracción de aceites esenciales de las microcápsulas se utilizó el método descrito por (Yoshia, y otros, 2001) y el análisis estadístico no paramétrico Kruskal Wallis (Programa Past statistics 3.0) para probar diferencias significativas en el contenido de aceite esencial en las microcápsulas. Se pesó 0.15 g de cada una de las muestras (M2:1-IS/HL; M3:1-IS/HL) y se las colocó en tubos de centrifuga de 10 mL, se realizó una mezcla de concentración 1:1 entre hexano: isopropanol de la cual se tomó 4 mL más 1 mL de agua ultrapura y se colocó en el tubo con la muestra respectiva. Inmediatamente la mezcla fue llevada a un agitador vórtex durante 5 min, y se llevó a baño sónico a una temperatura de 50°C durante 15 min, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a una velocidad de 10000 rpm durante 15 min para finalmente almacenar el sobrenadante en un frasco ámbar para ser usado en la cuantificación por GC-MS del aceite esencial (anexo 20).

2.3.7 Condiciones de análisis del cromatógrafo para el aceite esencial de microcápsulas

Se procedió a analizar su composición mediante Cromatografía de Gases acoplada a Masas (GC-MS), el equipo trabajó con las siguientes características y parámetros:

- Equipo: Varian modelo 3900 y Varian Saturn 2100D
- Parámetros del GC/MS:
 - Flujo de gas Helio 1mL x min
 - Temperatura del inyector a 280°C
 - Split Ratio a 50
- Columna capilar:
 - Temperatura inicial 50°C,
 - Temperatura media 100°C (10°/min)
 - Temperatura final 250°C (5°/min)
- Tiempo de espera a 250°C (2 min)
- Tiempo total de análisis (38 min)
- Rango de masa de 40 a 450 m/z
- $\sum i=70$ eV

2.4 Controles del producto terminado de microcápsulas de aceite esencial de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y hojas de Ishpink (*Ocotea quixos*)

Una vez obtenidas las microcápsulas con aceites esenciales de Hierba luisa e Ishpink se procedió a determinar ciertos parámetros en el producto terminado.

2.4.1 Determinación del tamaño y la forma de las microcápsulas

Para la determinación del diámetro de las microcápsulas se tomaron fotografías de al menos 3 microcápsulas húmedas y secas en forma aleatoria mediante un microscopio

con cámara conectada a una computadora (Marca Micros). Para registrar las medidas de los diámetros se usó el software libre “MICROVISIBLE” analizador de imágenes (López A. , 2012).

La forma de los encapsulados fue determinada usando el factor de esfericidad (fe), calculado con la siguiente ecuación:

Ecuación 2. Factor de esfericidad

$$fe = \frac{d_{max}-d_{min}}{d_{max}+d_{min}}$$

Fuente: (Chan, Lee, Ravindra, & Poncelet, 2009)

Donde:

d_{max} = valor del diámetro más largo.

d_{min} = diámetro perpendicular al mismo.

2.4.2 Determinación del rendimiento de la producción de microencapsulados

El rendimiento de producción de las diferentes emulsiones se calculó mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 3. Rendimiento de producción

$$\text{Rendimiento de producción} = \frac{M}{ASA+A+CaCl_2} \times 100$$

Fuente: (López & Villalta, 2009)

Donde:

ASA= es la cantidad en gramos utilizada de aceite esencial.

A= es la cantidad en gramos de alginato de sodio utilizado.

CaCl₂= es la cantidad en gramos de cloruro de calcio utilizado.

M= es la cantidad en gramos de microesférmas obtenidas al final del proceso.

2.4.3 Cantidad de principio activo encapsulado

Para medir la cantidad de principio activo se utilizó la siguiente relación matemática:

Ecuación 4. Porcentaje de principio activo

$$\text{Contenido p. a (\%)} = \frac{\text{Cantidad de p.a encapsulado}}{\text{peso final de microesferas}} \times 100$$

Fuente: (Vilajato, 1997)

2.4.4 Contenido de aceite total

Para evaluar el contenido de aceite total o extracto etéreo se tomó como referencia el método cuantitativo de grasa total por hidrólisis ácida descrita en el Método oficial AOAC 922.06 (AOAC, 2005). Se pesó aproximadamente 1 g de cada muestra en vasos de precipitación de 50 mL al cual se adicionó 1 mL de alcohol etílico y 5 mL de ácido clorhídrico, se mezcló y llevó a baño maría por 40 min, luego se añadió 5 mL de alcohol y se dejó enfriar cada muestra. Cada tratamiento se trasvasó a tubos de ensayo de 15 mL de tal manera que se realizó 4 lavados con éter etílico y éter de petróleo, transvasándose a vasos previamente pesados, donde se dejó evaporar el solvente por aproximadamente 1 hora y finalmente se los llevó a la estufa a 100°C por 1 hora (Cuaspud, 2015).

2.4.5 Contenido de aceite superficial

Para evaluar el contenido de aceite presente en la superficie de las microcápsulas se siguió el proceso que se describe en (Calvo, Hernández, Lozano., & González-Gómez, 2010). Se pesó 1 g de muestra en un frasco de vidrio con tapón rosca y se añadió 7.5 mL hexano. Se llevó a un agitador vórtex durante 2 min a temperatura ambiente para extraer el aceite libre, la mezcla se decantó y filtró a través de papel filtro, el polvo recogido se enjuaga 3 veces con 10 mL de hexano. El polvo se secó

en la estufa a 60°C para eliminar el solvente residual y se registró el peso final, cada muestra se evaluó por duplicado.

La eficiencia de la microencapsulación se determinó de acuerdo a la ecuación:

Ecuación 5. Eficiencia de microencapsulación

$$EM = \frac{AT - AS}{AT} \times 100$$

Fuente: (Calvo, Hernández, Lozano., & González-Gómez, 2010)

Donde:

EM = eficiencia de la microencapsulación, en porcentaje de masa.

AT = aceite total retenido, en g.

AS = contenido de aceite superficial, en g.

2.5 Estabilidad del aceite microencapsulado

Se sometieron las microcápsulas a condiciones ambientales normales y extremas para conocer la eficiencia de proceso de microencapsulación, evaluando la capacidad del polímero para retener aceites esenciales de Hierba luisa e Ishpink durante cierto periodo de tiempo.

2.5.1 Preparación de la muestra.

Se pesó de 8 a 10 g de microencapsulados de cada muestra por duplicado y se empacó en fundas de aluminio a fin de simular y controlar la temperatura e influencia de la humedad sobre los resultados. Estos empaques fueron llevados durante 3 semanas a diferentes condiciones en una cámara de estabilidad (50°C y 60% humedad relativa) y condiciones ambientales (20°C y 25% humedad relativa) (Cuaspud, 2015) (anexo 19).

2.5.2 Análisis de estabilidad de microencapsulados en agua.

Con el fin de evaluar la estabilidad de microencapsulados en agua se llevó a cabo un experimento con 4 tratamientos. Se utilizó frascos boheco de 100 mL los cuales contenían en su interior agua destilada cubiertos con plástico y suficiente aireación (anexo 14). A cada tratamiento se agregó 1g de microencapsulados correspondiente a las muestras elaboradas T1 (M2:1 IS), T2 (M3:1 IS), T3 (M2:1 HL), T4 (M3:1 HL) y tratamiento 5 (T5) como control, por lo tanto no se adicionó microcápsulas. Los parámetros evaluados durante 3 semanas en la calidad del agua fueron: pH y Conductividad ($\mu\text{s/cm}$) (Zaniboni, 2013).

Capítulo 3

Resultados y discusión

2.6 Control de calidad de aceites esenciales

Tabla 5.

Análisis de control de calidad del aceite esencial de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) e Ishpink (*Ocotea quixos*) de CHANKUAP

ACEITE ESENCIAL		Hierba luisa (HL)	Ishpink (IS)
Índice de refracción		1,49	1,51
Apariencia		Líquido aceitoso cristalino	Líquido aceitoso cristalino
Color		Levemente amarillo	Levemente amarillo
Olor		Cítrico	Similar a canela
Densitómetro	Densidad (g/mL)	0,88	0,93
Densidad picnómetro	Densidad (g/mL)	0,87	0,94

Nota: Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

La tabla 5 indica los valores obtenidos en control de calidad de los aceites esenciales de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) e Ishpink (*Ocotea quixos*) adquiridos de La Fundación CHANKUAP, dichos datos son semejantes a las obtenidas por las fichas técnicas de los productos (anexo 1).

Tabla 6.

Resultado de Cromatografía de gases (GC-MS) de aceite esencial de Hierba luisa
(*Cymbopogon citratus*)

Quan Ions:	RIC	Spectrum Match Type:	Normal- Forward		
RF Used:	None	Match Thresh:	700		
# RT	Compound Name	Status	Area	Amount	R.Ma
1 10.939	.beta.-Pinene	TIC	1,03E+09	2.330	896
2 11.288	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-d	TIC	7,83E+09	17.797	877
3 35.214	2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl	TIC	1,22E+10	27.700	854
4 38.829	2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl	TIC	1,51E+10	34.400	867
5 53.627	No Match	Unk.	3,59E+05	0.815	
6 57.684	Silane, [[4-[1,2-bis[(trimet	TIC	8,46E+04	0.192	901
7 58.558	Silane, [[4-[1,2-bis[(trimet	TIC	1,77E+05	0.401	904
8 74.066	2,4-Bis(dimethylbenzyl)-6-t-	TIC	3,81E+05	0.865	748
9 74.503	No Match	Unk.	7,15E+05	1.624	
10 74.907	No Match	Unk.	2,50E+09	5.669	
11 74.996	No Match	Unk.	1,24E+09	2.827	
12 75.238	No Match	Unk.	2,37E+09	5.380	

Nota: Elaborado por D.Caicedo y N. Chamba, 2015.

Tabla 7.

Resultado de Cromatografía de gases (GC-MS) de aceite esencial de Ishpink (*Ocotea quixos*)

# RT	Compound Name	Area	Amount	R.Ma
7.877	1R ALFA PINENO	3,53E+05	0.381	53.85
8.232	5.787 min. Scan: 360 Channel: 1 Ion: 816	2,66E+09	2.871	19.30
9.065	Camphene	3,14E+05	0.339	36.41
10.324	1R ALFA PINENO	7,96E+05	0.860	45.98
10.599	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-me	2,11E+09	2.275	21.63
11.357	.beta.-Pinene	2,56E+05	0.276	36.23
13.176	TERPINOLEN	4,05E+05	0.438	24.20
13.789	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-	1,17E+09	1.266	18.87
14.076	CAMPHENO	1,21E+09	1.303	30.19
14.314	EUCALIPTOL	2,59E+09	2.797	78.57
16.412	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methyl	9,93E+05	1.073	32.46
20.433	LINALOL	3,22E+05	0.348	61.14
28.378	4 TERPINEOL	6,73E+05	0.727	62.78
45.203	.gamma.-Elemene	5,79E+05	0.625	25.52
46.762	ALFA CUBEBENO	3,66E+05	0.395	25.44
48.855	Copaene	3,49E+09	3.774	17.78
49.726	1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene	1,13E+05	0.122	41.87
49.868	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(9,44E+05	1.020	14.84
50.055	CINAMATO DE METIL	1,09E+10	11.819	75.28
51.331	Caryophyllene	1,60E+10	17.293	24.03
52.211	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-	2,88E+05	0.311	5.98
53.012	Alfa cariofileno	1,44E+10	15.499	28.55
53.107	Cinamil acetato	6,80E+09	7.342	65.24
53.900	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro	1,41E+05	0.148	13.35
54.070	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro	2,14E+05	0.241	10.34
54.224	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-me	1,37E+05	0.233	56.96
54.375	Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-	2,23E+05	1.306	6.54
54.482	1H-Cyclopropa[a]naphthalene, 1a,2,3,5,6,	2,16E+05	0.335	8.31
54.651	Azulene, 1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-	1,21E+09	2.002	6.67
54.748	1H-3a,7-Methanoazulene, 2,3,4,7,8,8a-hex	3,10E+05	0.721	33.52
54.967	Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4-d	1,85E+09	0.058	6.01
55.118	Benzene, 1,2-dimethoxy-4-(1-propenyl)-	6,67E+05	2.733	73.18
55.191	ISOEUGENOL METIL ETER	5,37E+04	2.918	42.75
55.517	CADINENO	2,53E+09	2.756	38.08
55.728	Cedrene	2,70E+09	0.050	9.19
55.816	1H-3a,7-Methanoazulene, 2,3,6,7,8,8a-hex	2,55E+09	3.034	18.79
57.304	Longipinocarvone	7,96E+04	0.524	26.78
57.420	(-)-Spathulenol	4,61E+04	0.435	50.88
57.541	OXIDO DE CARIOFILENO	2,81E+09	4.018	45.91

Nota: Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

2.7 Control de calidad del alginato de sodio

Tabla 8.

Análisis de las dos muestras de alginato de sodio

ENSAYO		MUESTRA 1 (M1)	MUESTRA 2 (M2)
ORGANOLEPTICAS	Color	Amarillo parduzco	Amarillo parduzco claro
	Olor	Alga seca	Inoloro
	Apariencia	Polvo fino sin partículas extrañas	Polvo muy fino, con presencia de partículas extrañas blancas finas
SOLUBILIDAD	SAM1	Lentamente soluble	Soluble
	SAM2	Lentamente soluble	Soluble
	SEM1	Insoluble	Insoluble
	SEM2	Insoluble	Insoluble
	SETPM1	Insoluble	Insoluble
	SETPM2	Insoluble	Insoluble
	SCM1	Insoluble	Poco soluble
	SCM2	Insoluble	Poco soluble
	pH	5,43	9,74
	Conductividad eléctrica (µs/cm)	1154	2,17
	Índice de refracción	1,33	1,33
	Densidad (g/mL)	1,00	1,00
Viscosidad (Aguja S61)	Porcentaje	21,60%	26,00%
	Cp	12,96	15,60
Cenizas sulfatadas	Porcentaje	26,14%	35,54%
Humedad en estufa	Porcentaje	15,37%	6,54%

Nota: SAM1: soluble en agua muestra 1; SAM2: soluble en agua muestra 2; SEM1: soluble en éter muestra 1; SEM2: soluble en éter muestra 2; SETPM1: soluble en éter de petróleo muestra 1; SETPM2: soluble en éter de petróleo muestra 2; SCM1: soluble en cloroformo muestra 1; SCM2: soluble en cloroformo muestra 2. Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

Según la tabla 8 se puede observar que existen diferencias importantes en los ensayos realizados entre M1 y M2, lo que demuestra que son estructuralmente diferentes (anexo 2 y 3).

2.7.1 Determinación de la cantidad de sodio del alginato.

Según lo calculado (anexo 8) la cantidad de sodio para la muestra M1 es de 0,13 mg Na/Kg y para M2 es de 0,03 mg Na/Kg, con ello se confirmó que existe una diferencia en la cantidad de sodio presente en los alginatos.

También es importante mencionar que el análisis infrarrojo FIT-IR para alginato de sodio presentó espectros con picos diferentes entre M1 y M2, los mismos que al ser comparados con un patrón referencial obtenido por una biblioteca virtual se pudo verificar que la similitud más alta es con la muestra M2 (anexo 9).

2.8 Elección de polímero a utilizar para formulación de emulsiones

Al realizar emulsiones al 2.5% (p/v) con las dos muestras de alginato M1 y M2 para someter a la interacción con la solución de CaCl_2 para la formación de microcápsulas y sin incorporación de otros componentes como la glicerina o tween 80, se pudo observar que la muestra M1 presentó una alta formación de microcápsulas al contacto con la solución encapsulante de una manera instantánea, proveyendo microcápsulas fuertes, flexibles y resistentes a diferencia de M2 las cuales no lograron formar cápsulas mezclándose el gel con la solución de CaCl_2 provocando un solución turbia y espesa, por ende se decidió trabajar con M1 por las características idóneas del gel para microencapsular y por ser usado en la producción de alimentos (anexo 10).

2.8.1 Emulsión madre.

Tabla 9.

Resultado de calidad de emulsión madre

pH	Densidad	Conductividad (ms/cm)	Viscosidad		Color	Apariencia
			Cp	%		
5.69	1,03	3,83	312,07	62,40	amarillo pardo	Viscosa

Nota: Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

2.8.2 Emulsiones finales.

Tabla 10.

Resultado de calidad y estabilidad de emulsión concentración 2:1

DENSIDAD	HL	0,98	
	IS	0,99	
pH (0 horas)	HL (ms/cm)	4,96	
	IS (µs/cm)	5,38	
pH (168 horas)	HL	4,63	
	IS	5,52	
CONDUCTIVIDAD (0 horas)	HL (ms/cm)	2,09	
	IS (µs/cm)	1864,33	
CONDUCTIVIDAD (168 horas)	HL (ms/cm)	1,95	
	IS (µs/cm)	1911,33	
VISCOCIDAD	HL	Cp	6,96
		%	11,70
	IS	Cp	7,02
		%	11,70
Separación de fases baño maría	IS	negativo	
	HL	negativo	
Formación de microcápsula	IS	positivo	
	HL	positivo	
Color	IS	Blanca	
	HL	Blanca	
Apariencia	IS	viscosa	
	HL	viscosa	
Estabilidad microcápsula	IS	media-alta	
	HL	media-alta	
Separación de fases	IS	negativo	
	HL	negativo	
Tipo de emulsión	IS	O/W	
	HL	O/W	

Nota: Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

Tabla 11.

Resultado de calidad y estabilidad de emulsión concentración 3:1

DENSIDAD	HL	0,99	
	IS	0,98	
pH (0 horas)	HL	4,39	
	IS	5,94	
pH (168 horas)	HL	4,39	
	IS	6,00	
CONDUCTIVIDAD (0 horas)	HL (ms/cm)	2,21	
	IS (µs/cm)	1732	
CONDUCTIVIDAD (168 horas)	HL (ms/cm)	2,09	
	IS (µs/cm)	1714	
VISCOCIDAD	HL	Cp	7,02
		%	12,00
	IS	Cp	6,66
		%	11,10
Separación de fases baño maría	IS	negativo	
	HL	negativo	
Formación de microcápsula	IS	positivo	
	HL	positivo	
Color	IS	Blanca	
	HL	Blanca	
Apariencia	IS	Viscosa	
	HL	Viscosa	
Estabilidad microcápsula	IS	media-alta	
	HL	media-alta	
Separación de fases	IS	negativo	
	HL	Negativo	
Tipo de emulsión	IS	O/W	
	HL	O/W	

Nota: Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

La tabla 10 y 11 indican los ensayos que se realizaron en cada una de las emulsiones a concentraciones diferentes, obteniendo valores que reflejaron ser emulsiones estables durante un período determinado 168 horas y con cualidades para permanecer a las mismas condiciones por un mayor tiempo. También corroboramos con la información obtenida por (Lupo, 2012) respecto a la apariencia de la emulsión, la cual se presenta como blanco-lechosa con un tamaño de partícula de aceite mayor a 1µm, asimismo según Tanford (1980) se obtuvo emulsiones agua en aceite (O/W) debido a que el aceite se encontraba disperso en el agua (anexo 11).

2.9 Elección de recubrimiento para microencapsulados

Tabla 12.

Características provistas por recubrimientos para microencapsulados

RECUBRIMIENTO	CMC	ALMIDÓN	GOMA ARÁBIGA
Dureza de película	2	1	3
Resistencia a presión	2	1	3
Protección al principio activo	1	1	3
Secado	1	1	3

Nota: 1= malo, 2= bueno, 3= excelente. Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

A pesar de ser efectivos los tres recubrimientos, se eligió a la goma arábica, por las características que ofreció al microencapsulado formado, ya que posee propiedades lipofílicas que le confieren una excelente protección contra la oxidación (García & López, 2012, pág. 90), formando una película bioelástica, fuerte y resistente (anexo 12).

2.10 Control de producto terminado de microencapsulados

Tabla 13.

Determinación de forma y tamaño de microcápsulas húmedas

MUESTRA	Recién formadas o húmedas			\bar{X}
2:1-HL	0,047	0,067	0,134	0,083
3:1-HL	0,046	0,017	0,058	0,040
2:1-IS	0,011	0,106	0,134	0,084
3:1-IS	0,040	0,002	0,038	0,027

Nota: Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

Tabla 14.

Determinación de forma y tamaño de microcápsulas secas

MUESTRA	Secas a 48 horas			\bar{X}
2:1-HL	0,091	0,028	0,106	0,075
3:1-HL	0,121	0,108	0,113	0,114
2:1-IS	0,150	0,075	0,031	0,086
3:1-IS	0,073	0,087	0,046	0,069

Nota: Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

Chan y otros (2009) consideran que los sistemas son esféricos cuando presentan valores menores a 0,05, por ello la mayoría de las cápsulas obtenidas (húmedas y secas) en la presente investigación mostraron un porcentaje bajo de esfericidad (anexo 13). En la tabla 13 las muestras (2:1 HL y 2:1 IS) y la tabla 14 (2:1 HL, 3:1 HL, 2:1 IS y 3:1 IS) revelan un valor mayor a 0,05 en capsulas secas, mostrando en su superficie poros y grietas (anexo 14), posiblemente por la reacción producida al momento de entrar en contacto con la solución de CaCl_2 lo que provocó una gelificación instantánea en la interface, lo que indujo a que los iones de calcio se difundan en la solución e interactúen formando una red (George & Abraham, 2006).

Tabla 15.

Rendimiento de producción

MUESTRA	Peso de Aceite esencial (g)	Peso de alginato (g)	CaCl_2 (g)	Peso microcápsulas (g)	% de rendimiento
2:1-HL	25	1,67	36,75	53,42	84,24
3:1-HL	33,32	1,88	36,75	46,79	65,04
2:1-IS	25	1,67	36,75	55,22	87,08
3:1-IS	33,32	1,88	36,75	34,93	48,55

Nota: Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

En la tabla 15 se observa que existe un alto rendimiento de producción en concentraciones 2:1HL y 2:1 IS, sin embargo a concentración 3:1HL y 3:1 IS el rendimiento decrece. Es posible que el recipiente que contiene el CaCl₂, la cantidad y la profundidad del mismo influya en el rendimiento de producción debido a que las esferas deben flotar libremente y no rozarse con las paredes o entre ellas.

Tabla 16.

Cantidad de principio activo encapsulado

MUESTRA	Cantidad de principio activo encapsulado. (g)	Peso final de microencapsulado con principio activo (g)	% Contenido de principio activo
2:1-HL	25	53,42	46,79
3:1-HL	33,32	46,79	71,21
2:1-IS	25	55,22	45,27
3:1-IS	33,32	34,93	95,39

Nota: Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

En la tabla 16 se puede observar que el porcentaje de contenido de principio activo al final del proceso de microencapsulación es diferente en las cuatro concentraciones, pero con una particular semejanza en las concentraciones 2:1 por presentar valores bajos (46%) de encapsulación, ya que según la investigación de Rodea y otros (2012, pág. 106) al aumentar el contenido de polímero en la formulación incrementa la capacidad de retención del principio activo, es por ello que la cantidad de alginato de sodio utilizado para la formulación de las emulsiones en concentración 3:1 favoreció a una mayor retención del componente activo presentando un elevado contenido encapsulado (83%).

Tabla 17.

Contenido de aceite superficial de microencapsulados

MUESTRA	ACEITE SUPERFICIAL				
	PESO INICIAL <small>(vaso vacío)</small>	PESO FINAL <small>(vaso + muestra)</small>	% ACEITE TOTAL <small>(muestra)</small>	% ACEITE SUPERFICIAL	% EFICIENCIA
2:1-HL	0,75	1,37	81,65	62,58	23,36
3:1-HL	0,61	1,04	49,93	43,95	11,98
2:1-IS	0,59	0,79	89,60	19,39	78,36
3:1-IS	0,78	1,00	89,92	22,39	75,10

Nota: Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

Se puede observar en la tabla 17 que el porcentaje de eficiencia es más alto (76%) para las concentraciones con aceite esencial de Ishpink, a diferencia de las concentraciones con aceite esencial de Hierba luisa una eficiencia del 17%, esto pudo deberse al porcentaje de aceite superficial presente en las muestras, ya que algunos autores (Madai Bringas & Pino, 2012) mencionan que un alto contenido de aceite superficial puede causar no solo una mayor pérdida de componentes volátiles por evaporación, sino también una mayor inestabilidad.

Tabla 18.

Análisis de estabilidad al ambiente de microencapsulado por GC-MS

Kruskal-Wallis test for equal medians				
Emulsiones	2 1 HL AMB	3 1 HL AMB	2 1 IS AMB	3 1 IS AMB
H (chi2):	0,650	1,241	6,691	3,857
Hc (tie corrected):	0,650	1,241	6,691	3,857
p (same):	0,723	0,538	0,035	0,145

Nota: Color celeste= conserva aceite esencial, Color rosado= pierde aceite esencial.

Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

En la tabla 18 se observa que las muestras con aceite esencial de Hierba luisa a concentraciones (2:1 y 3:1) e Ishpink (3:1) no presentan diferencias significativas entre las medianas de la muestra, por tanto no se rechaza la hipótesis nula, puesto que los valores, antes y después del tratamiento, son estadísticamente similares demostrando que los microencapsulados no varían en el contenido de aceite esencial durante el tiempo de ensayo. La concentración 2:1 Ishpink presenta un “valor p” menor a 0,05. Por tanto, hay una diferencia significativa entre las medianas de la muestra y se rechaza la hipótesis nula, dado que el valor de al menos uno de los grupos de datos es diferente a la de los otros grupos, demostrando que no conserva aceite esencial en su interior durante las 3 semanas.

Tabla 19.

Análisis en cámara de estabilidad de microencapsulados por GC-MS

Kruskal-Wallis test for equal medians				
Emulsiones	2 1 HL CAM	3 1 HL CAM	2 1 IS CAM	3 1 IS CAM
H (chi2):	8,503	1,170	7,767	1,189
Hc (tie corrected):	8,503	1,170	7,767	1,189
p (same):	0,014	0,557	0,021	0,552

Nota: Color celeste= conserva aceite esencial, Color rosado= pierde aceite esencial.

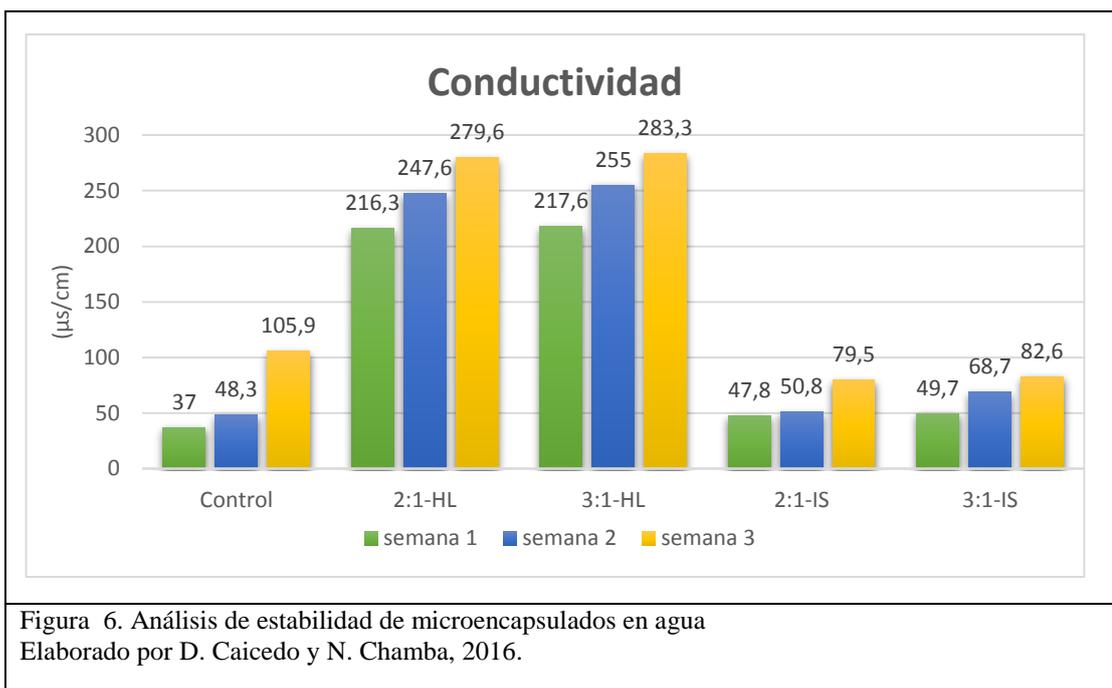
Elaborado por D. Caicedo y N. Chamba, 2015.

En la tabla 19 se observa que las muestras con aceite esencial de Hierba luisa e Ishpink a concentraciones (3:1) no presentan diferencias significativas entre las medianas de la muestra, no rechazando la hipótesis nula, puesto que los valores son estadísticamente similares demostrando que conservan aceite esencial en los microencapsulados. Las concentraciones (2:1) de Hierba luisa e Ishpink presentan un “valor p” menor a 0,05. Por tanto, hay una diferencia significativa entre las medianas de la muestra y se rechaza la hipótesis nula, dado que el valor de al menos uno de los grupos de datos es diferente a la de los otros grupos, demostrando que no conserva aceite esencial en su interior durante las 3 semanas.

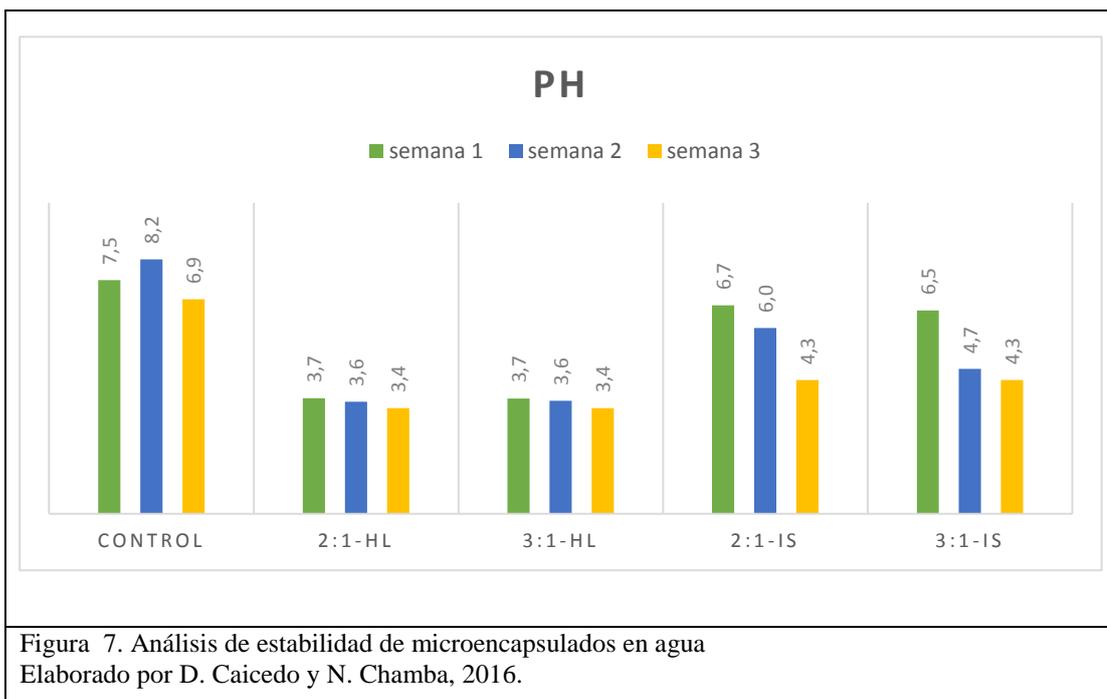
La volatilidad de los microencapsulados pueden deberse a varios factores en los cuales están involucrados sus componentes (alginato de sodio, tween 80, glicerina y goma arábiga) o las condiciones a las que fueron sometidas durante la experimentación afectando directamente al contenido de principio activo.

Según Planas y otros (1990) debe existir una mezcla de polímeros para provocar un balance estequiométrico entre un polianión y polication para lograr una buena microencapsulación. Pero en esta investigación no se realizó mezclas con polímeros

adicionales para elaborar las emulsiones mencionadas, teniendo en cuenta que la goma arábica fue empleada como recubrimiento de los microencapsulados, por lo que se cree que al haber un desequilibrio estequiométrico por falta de un polícatión en la formulación provocó la liberación y volatilización del aceite esencial.



Se cree que el aumento en la conductividad eléctrica (figura 6) puede deberse a procesos degradativos de las microcápsulas en el agua, especialmente para las muestras que contienen aceites esencial de Hierba luisa (Yúfera, Fernández, & Pascual, 2005).



Según la figura 7 la muestra control presentó un pH ligeramente básico a neutro durante las tres semanas de estudio, mientras que los microencapsulados con aceite esencial de Hierba luisa reflejaron un valor de pH ácido desde el inicio hasta el final de la evaluación y los de aceite esencial de Ishpink mostraron un descenso de pH neutro a ácido. Estos valores de pH muy ácidos en las muestras con Hierba luisa pudieron afectar la permeabilidad de las microcápsulas, visto que según Pedroza y otros (1999) altera la estructura del polímero y las densidades de carga provocando una baja eficiencia en la microencapsulación, así mismo la volatilización de compuestos principales como es del citral en Hierba luisa, cinamaldehído en Ishpink y el eugenol en ambos.

Conclusiones

Las concentraciones 2:1 y 3:1 de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) e Ishpink (*Ocotea quixos*) elaboradas a partir de la muestra M1 permitió la producción de microencapsulados homogéneos y resistentes, recubiertos por goma arábica para evitar la degradación y volatilización por sus propiedades lipofílicas las cuales brindan al microencapsulado una excelente protección contra la oxidación. Es decir se trabajó con una emulsión hidrofílica (O/W) en la cual la cantidad de solución madre fue mayor que la cantidad de aceite esencial empleado en la formulación.

En el control de producto terminado se obtuvo un tamaño y forma con un porcentaje bajo de esfericidad (< 0.05) y esto pudo deberse a las variables manejadas durante el método de gelificación iónica como son: la concentración de la emulsión madre (alginato de sodio, glicerina y tween 80), tamaño de aguja, tiempo de inmersión de microcápsulas en CaCl_2 y principalmente el flujo de aire en el sistema.

El porcentaje de rendimiento en la producción fue alto en un 85 % para las concentraciones 2:1 Hierba luisa e Ishpink, mientras que para las concentraciones 3:1 su rendimiento fue de 56%.

Existieron pérdidas del producto durante el proceso como es el caso del aceite esencial de Hierba luisa, donde la eficiencia de encapsulación es desfavorable a diferencia de la de Ishpink que conserva hasta un 70% del principio activo encapsulado, lo cual pudo deberse a valores de pH neutros a ácidos manejados durante el proceso provocando una alta porosidad y por ende una reducción de su eficiencia por volatilización de sus compuestos.

El análisis de GC-MS permitió determinar, que bajo condiciones ambientales se conserva hasta un 75% de principio activo, mientras que en cámara de estabilidad apenas llega a un 50%. Por lo que se cree que la temperatura y humedad excesiva inciden drásticamente en la pérdida del principio activo.

El análisis de estabilidad en agua indicó que a mayor conductividad eléctrica mayor proceso degradativo y mayor pérdida del principio activo. Es así que las muestras con aceite esencial de Ishpink presentaron valores bajos de conductividad eléctrica seguramente por sus propiedades antimicrobianas las cuales disminuyeron el proceso degradativo en las microcápsulas.

La investigación desarrollada permitió obtener microencapsulados con características óptimas en cuanto a su tamaño, composición y estabilidad, los cuales pueden ser probados en la dieta de especies acuícolas de interés comercial como trucha o tilapia.

Recomendaciones

Realizar pruebas in vivo con alevines de trucha o tilapia y comprobar la toxicidad de los microencapsulados elaborados con aceite esencial de Hierba luisa e Ishpink, evaluando su capacidad nutricional como dieta diaria de peces y los posibles efectos que estos puedan causar al interactuar con el agua.

No almacenar varias emulsiones durante el proceso, teniendo en cuenta que no todas se logran producir el mismo día, pudiendo afectar directamente al principio activo por someter a las emulsiones a cambios bruscos de temperatura (condiciones de refrigeración a condiciones ambientales y viceversa). También es necesario que las emulsiones se conserven de 0 a 4°C en envases ámbar para protegerlas de la luz y altas temperaturas.

Desarrollar esta investigación mejorando la formulación de las emulsiones, es decir combinado el alginato de sodio con otro polímero (goma arábiga, maltodextrina o quitosano) o proteína los cuales provocaran un balance estequiométrico al jugar con sus pesos moleculares, confiriendo al principio activo una cubierta con características menos porosas y más resistentes a procesos degradativos.

Realizar una comparación de análisis de producto terminado entre la técnica utilizada en esta investigación y otra bajo las condiciones de Spray dryer con los mismos ingredientes y concentraciones utilizadas.

Realizar el análisis de aceite total y aceite superficial por GC-MS para obtención de datos más precisos y realizar una comparación cuantitativa con el propósito de comprobar la eficacia entre los dos procesos (método AOAC y GC-MS).

Referencias

- Albarracín, G., & Gallo, S. (2003). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper aduncum (cardoncillo) procedente de la zona cafetalera*. Tesis de pregrado tecnología de alimentos, Universidad de Colombia, Ingeniería química, Manizales. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/989/1/gloriacristinaalbarracinmontoya.2003.pdf>
- Alegria, G., & Amaya, C. (2007). *Recopilación de monografías de excipientes y vehículos utilizados en la fabricación de medicamentos y cosméticos en la cátedra de Tecnología farmacéutica*. Salvador: Universidad del Salvador. Recuperado el 14 de 1 de 2016
- Ali, H., Kamal, M., & Mohamed, S. (2009). In vitro clove oil activity against periodontopathic bacteria. *Journal of Science and Technology*, 10, 1-7. Recuperado el 5 de 1 de 2016
- Alonso, M. (2011). *Proceso de microencapsulación*. Universidad de País Vasco. Recuperado el 10 de 10 de 2015, de [https://addi.ehu.es/bitstream/10810/6944/8/2-%20Cap.II%20\(Tesis-Alonso\).pdf](https://addi.ehu.es/bitstream/10810/6944/8/2-%20Cap.II%20(Tesis-Alonso).pdf)
- AOAC. (2005). *Official Method 922.06. Acid Hydrolysis Method*. Obtenido de AOAC: <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=26940>
- Avendaño, G. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería en Alimentos*, 7(1), 88. Recuperado el 16 de 12 de 2015, de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-71-Avendano-Romero-et-al-2013.pdf>

- Bandoni, A. L. (2002). *Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica*. Proyecto IV.6 La flora iberoamericana y su aprovechamiento para la producción de aromas y fragancias de interés industrial, Buenos Aires. Recuperado el 9 de 1 de 2016, de <http://es.scribd.com/doc/7959699/Los-Recursos-Vegetales-Aromaticos-en-America-Latina#scribd>
- Boateg, J., Stevens, H., Eccleston, G., Auffret, A., Humphrey, M., & Matthews, K. (2009). Development and mechanical characterization of solvent-cast polymeric films as potential drug delivery systems to mucosal surfaces. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(8), 986-996. Recuperado el 9 de 1 de 2016
- Buitrón C., X. (1999). *Ecuador: Uso y Comercio de Plantas Medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación*. TRAFFIC International. Recuperado el 12 de 12 de 2015, de www.traffic.org/medicinal-reports/traffic_pub_medicinal27.pdf
- Cabello, C., Bair, W., Lamore, S., Ley, S., Bausse, A., Azimian, S., & Wondrak, G. (2009.). The cinnamon-derived Michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor growth. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 220-231. Recuperado el 5 de 1 de 2016
- Calvo, P., Hernández, T., Lozano., M., & González-Gómez, D. (2010). Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(8), 852-858. doi:10.1002/ejlt.201000059
- Campos, C., Gerschenson, L., & Flores, S. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*., 4(6),

849-875. Recuperado el 9 de 1 de 2016, de

<http://link.springer.com/article/10.1007/s11947-010-0434-1#/page-1>

Cárdenas, D., Castaño, N., SUA, S., & Quintero, L. (2015). *Planes de manejo para la conservación de Abarco, Caoba, Cedro, Palorosa, y Canelo de los Andaquíes*. Bogotá: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-SINCHI.

Carlson, L., Machad, C., Pereira, L., & Bolsan, A. (2001). Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 21, 33-39. Recuperado el 5 de 1 de 2016, de <http://www.ijcea.org/papers/360-L0018.pdf>

Cazorla, M. (2013). *Actividad fotoprotectora de la Maracuyá (Passiflora edulis), Ishpingo (Ocotea quixos) en fototipos III (Homo sapiens) para elaboración de un protector solar*. Riobamba. Recuperado el 5 de 1 de 2016, de LINK

Chan, E., Lee, B., Ravindra, P., & Poncelet, D. (2009). Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), 63–72. Recuperado el 12 de 05 de 2015, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979709006584>

Charcosset, C. (2009). Preparation of emulsions and particles by membrane emulsification for the food processing industry. *Journal of Food Engineering*, 92(3), 241-249. Recuperado el 30 de 12 de 2015

Cuaspu, A. (2015). *Obtención de aceite de aguacate microencapsulado mediante secado por atomización*. Proyecto previo a la obtención del título de ingeniero agroindustrial, Escuela Politécnica Nacional, Quito. Recuperado el

26 de 10 de 2015, de

<http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/10511/1/CD-6219.pdf>

Cubero, N. M. (2002). *Aditivos Alimentarios*. Madrid, Madrid, España: Mundi-Prensa. Recuperado el 25 de 11 de 2015

Dieffenbacher, A., & Pocklington, W. (1992). *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. Recuperado el 12 de 1 de 2016

Domingo, D., & López, M. (Diciembre de 2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Quimioterap*, 16(4), 385-393. Recuperado el <http://dialnet.unirioja.es/servlet/oaiart?codigo=786844> de 01 de 2016

Domínguez, M., & Jiménez, M. (2012). Películas comestibles formuladas con polisacáridos: propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 110-121. Recuperado el 9 de 1 de 2016

Draget, K. (2000). Handbook of hydrocolloids-alginates. En *Handbook of hydrocolloids* (págs. 218-219). Cambridge: England: Woodhead Publishing Limited - Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC. Recuperado el 10 de 10 de 2015, de http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v06/bpol6008_215_224.pdf

Eikani, M., Golmohammad, F., & Roswhanzamir, S. (2007). Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Engineering*, 80(2), 735-740. Recuperado el 9 de 1 de 2016, de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-71-Leal-Torres-et-al-2013.pdf>

- Enebro, J., Momcilovic, D., Siika-Aho, M., & Karlsson, S. (2007). A new approach for studying correlations between the chemical structure and the rheological properties in carboximethyl cellulose. *Biomacromolecules*, 8(10), 3235-3257. Recuperado el 9 de 1 de 2016
- García, A., & López, A. (2012). Biopolímeros utilizados en la encapsulación. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, 6(1), 84-97. Recuperado el 9 de 1 de 2016
- George, M., & Abraham, T. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan: a review. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 1-14. Recuperado el 10 de 1 de 2016
- Gómez, N., & Munguia, M. (2014). Método de secado de emulsiones alimentarias. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos.*, 8(2), 23-33. Recuperado el 30 de 12 de 2015
- González, J. (2014). Limpieza bucodental mediante técnicas de adsorción de material desechable. Nueva alternativa de higiene. *Avances en odontología*, 30(6), 299-305. Recuperado el 9 de 1 de 2016
- González, G. (2009). *Estabilidad e intercambio de iones calcio en geles de alginato*. Residencia profesional, Instituto Tecnológico de Durango, Ingenierías Química y Bioquímica, Durango. Recuperado el 29 de 12 de 2015, de <http://tecno.cruzfierro.com/residencias/03040882-gonzalez-residencia>
- Gordillo Galeano, A. (2013). *Preparación y Caracterización de Micropartículas Sólidas Lipídicas Cargadas con Aceite Esencial de Cidrón (Aloysia triphylla) Mediante Emulsificación por Ultrasonido*. Tesis Postgrado Magister en

Ciencias Farmacéuticas, Bogotá. Recuperado el 30 de 11 de 2015, de
<http://www.bdigital.unal.edu.co/10787/1/192598.2013.pdf>

Harvey, D. (2000). *Modern analytical chemistry*. New York: McGraw Hill.

Recuperado el 02 de 02 de 2016

Helgerud, S., Gazerod, O., Fjaeraide, T., Andersen, P., & Larsen, C. (2010). In food stabilizers, thickeners and gelling agents, alginates. *Wiley Blackwell*, 66-90.

Recuperado el 10 de 10 de 2015, de

<http://blog.ub.ac.id/fawzy/files/2013/07/Food-Stabilizer.pdf#page=66>

Hernández, G., Rodríguez, Y., Arvizu, D., Reyes, R., Murillo, J., & Muñoz, M.

(2012). Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México.

Ingeniería Investigación y Tecnología, 13(2), 155-168. Retrieved 12 29, 2015

Holgado Arroyo, F. (2011). *Comportamiento oxidativo de aceites*

microencapsulados: influencia de las condiciones de preparación en sistemas modelos y estudios específicos en alimentos. Tesis doctoral, Madrid.

Recuperado el 30 de 11 de 2015

Imeson, A. (2010). Food stabilizers, thickeners and gelling agents. United Kingdom:

Wiley-Blackwell. Recuperado el 9 de 1 de 2016

Juarez, D., Fernandez, S., & Balart, R. (2015). Análisis del estado del arte de

plásticos flexibles y mejora del confort térmico en los sectores de ortopedia

del pie y puericultura del pie. *Ingeniería y Tecnología*, 66-70. Recuperado el

10 de 10 de 2015, de

http://issuu.com/3ciencias/docs/an__lisis_del_estado_del_arte_de_pl/67?e=4517965/11719737

- Kaoba, K., Sandak, K., Raynaud, C., Nenonene, Y., Mollet, J., & Chaumont, P. (2006). Activite antimicrobiennes d huiles essentielles de tríos Cymbopogon sp. Africannins vis-avis de germen pathogenes d animaux de compagnie.
- Kim, Y, D., & Morr. C, V. (1996). Microencapsulation properties of gum arabic and severial food proteins: Sray-dried orange oil emulsion partieles. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 44(5), 1308-1313. Recuperado el 30 de 11 de 2015, de [https://books.google.es/books?id=4_kuj2xeV9QC&pg=PA61&lpg=PA61&q=contenido+de+aceite+superficial+de+microencapsulados&source=bl&ots=8GFnbTaVSl&sig=sC_Fb18fneMJJyeu1RWQNMm2unU&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiBnf7GgLvJAhWDJiYKHTPyA8EQ6AEIHDA#v=onepage&q=contenido%](https://books.google.es/books?id=4_kuj2xeV9QC&pg=PA61&lpg=PA61&q=contenido+de+aceite+superficial+de+microencapsulados&source=bl&ots=8GFnbTaVSl&sig=sC_Fb18fneMJJyeu1RWQNMm2unU&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiBnf7GgLvJAhWDJiYKHTPyA8EQ6AEIHDA#v=onepage&q=contenido%20)
- Kováts, E. (1965). Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv. Chromatog.*, 229-247.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona-España: Omegas, S.A. Recuperado el 16 de 12 de 2015, de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2465/1/tq1108.pdf>
- Lewinsohn, E., Dudai, N., Tadmor, Y., Katzir, I., Ravid, U., Putievsky, E., & Joel, D. (1998). Histochemical localization of citral accumulation in lemon grass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) stapf, Poaceae). *Annals of Botany*, 81, 35-39. doi:10.5897/JMPR2013.5549
- López, A. (2012). *Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de Yerba mate*. Trabajo de tesis

presentado para optar al grado académico de Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos, Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) La Plata, Buenos Aires. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/24904/Documento_completo____.pdf?sequence=1

López, G. (2008). *Diseño de formas líquidas de liberación modificada para el tratamiento del dolor*. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Granada: Universidad de Granada. Recuperado el 28 de 12 de 2015, de <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1738/1/17253822.pdf>

López, L., & Villalta, M. (2009). *Propuesta de un método para la elaboración de microesferas matriciales de ácido acetilsalicílico utilizando alginato de sodio por la técnica de gelificación iónica*. Tesis Licenciatura en Química y Farmacia, Universidad de San Salvador, Facultad de Química y Farmacia, San Salvador. Recuperado el 7 de 12 de 2015, de <http://core.ac.uk/download/pdf/11228244.pdf>

López, Y., Goycolea, F., Valdez, M., & Calderón, A. (2006). Goma de mezquite: una alternativa de uso industrial. *INTERCIENCIA*, 183-189. Recuperado el 9 de 1 de 2016

Lozano, M. (2009). *Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de opuntia stricta mediante secado por atomización*. Tesis pregrado Ingeniería Técnica Industrial, Cartagena. Recuperado el 30 de 11 de 2015, de <http://repositorio.bib.upct.es:8080/jspui/bitstream/10317/954/1/pfc3022.pdf>

Lupo, B. (2012). *Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales*.

- Mchugh. (1987). *Production, properties and uses of alginates*. FAO. Fisheries Technical Paper Chapter 2. Recuperado el 25 de 11 de 2015, de <http://www.fao.org/docrep/x5822e/x5822e00.htm>
- Mercosur. (2015). *Gaceta oficial de la República de Venezuela*. Ministerio del poder popular para la salud. Caracas: Imprenta nacional y gaceta oficial. Recuperado el 7 de 12 de 2015, de <https://microjurisve.files.wordpress.com/2015/07/gaceta-oficial-nc3bamero-40-701.pdf>
- Miramont, S. (2012). *Recubrimientos elaborados a partir de bipolímeros para el soporte de sustancias con actividad antimicrobiana: carvacrol y sorbatos*. Tesis Magistral, Buenos Aires. Recuperado el 9 de 1 de 2016
- Murillo, M., Espuelas, S., Prior, Vitas, I., Renedo, M., Goñi, M., . . . Gamazo, C. (2001). Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénica. *Revista Medica de la Universidad de Navarra*, 45(4), 181-196. Recuperado el 09 de 10 de 2015, de <http://dadun.unav.edu/bitstream/10171/39342/1/liberacion.pdf>
- Noriega, P., & Dacarro, C. (2008). Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam), Kosterm.; actividad microbiana y antifúngica. *La Granja*, 7(1), 3-8. Recuperado el 1 de 12 de 2015
- Ooi, L., Li, Y., Kam, S., Wang, H., Wong, E., & Ooi, V. (2006). Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *American Journal of Chinese Medicine*, 34, 511-22. Recuperado el 5 de 1 de 2016

- Parra H., R. (2010). Microencapsulación de Alimentos. *Fac.Nal.Agr.Medellín*, 63(2), 5669. Recuperado el 16 de 12 de 2015, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n2/a20v63n01.pdf>
- Paula, H. (2010). Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm. 20(2), 113. doi: 10.1590/S0104-14282010005000019
- Pawar, S., & Edgar, K. (2012). Alginate derivation: A review of chemistry properties and applications. *Biomaterials*, 33, 3279-3305. doi:doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.007
- Pedroza, R., Verno, J., Durán, C., & Trejo, S. (1999). Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation. I. Microcapsule particle size, morphology and microstructure. *Food Research International*, 32, 367-374. Recuperado el 12 de 1 de 2016
- Planas, M., Fernández, M., Ferreiro, M., & Labarata, U. (1990). Effect of selected variables on the preparation of gelatin-acacia microcapsules for the aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 9, 329-341. Recuperado el 12 de 1 de 2016
- Qiu- Ping, Z., & Wen- Shui, X. (2008). Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava starch/gelatin blend plasticized. *Food Technology & Biotechnology*, 46(3), 262-269. Recuperado el 9 de 1 de 2016
- Reyes, F., Palou, E., & López, A. (2012). *Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales*. Programa de maestría en ciencias de alimentos, Fundación Universidad de las Américas Puebla, Ingeniería Química,

Alimentos y Ambiental, Puebla. Recuperado el 2 de 12 de 2015, de <http://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6%281%29-Reyes-Jurado-et-al-2012.pdf>

Riojas H. H., G. I. (2011). Aplicación de Tween 80 y D-Limoneno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos. *Ide@s CONCYTEG*, 6(71), 571-584. Recuperado el 2 de 1 de 2016, de http://concyteg.gob.mx/ideasConcyteg/Archivos/71072011_APLICACION_TWEEN_80_D_LIMONENO_BIORREMEDIACION.pdf

Ríos, J., & Ubidia, W. (2014). *Evaluación de los parámetros de crecimiento y supervivencia de alevines de trucha (Oncorhynchus mykiss) con dietas enriquecidas con tres aceites esenciales; Jengibre (Zingiber officinale), Cúrcuma (Curcuma longa) y Hierba luisa (Cymbopogon citratus)*. Quito. Recuperado el 28 de 1 de 2016, de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8736/1/UPS-QT06658.pdf>

Rodea, D., Cruz, J., Román, A., Rodríguez, M., Vernon, E., & Pérez, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 102-109. doi:10.1016/j.foodeng.2012.01.020

Ruiz, A. (2005). *Evaluación de la liberación in vitro-in vivo de la teofilina a partir de comprimidos matriciales elaborados por copolímeros de metacrilato de metilo y derivados almidonados*. Tesis doctoral, Universidad de Antioquia, Facultad de química. Retrieved 10 12, 2015

Sáez, V., Hernández, E., Sanz, L., & Katime, I. (2004). Liberación controlada de fármacos, Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(2), 87-

101. Recuperado el 28 de 12 de 2015, de

<http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/JUL04/Saez.pdf>

Salazar, C., & Flores, C. (2015). *Evaluación de los parámetros de crecimiento de alevines de tilapia roja (Oreochromis sp.) Con dietas enriquecidas con dos aceites esenciales: cúrcuma (Curcuma longa) y hierbaluisa (Cymbopogon citratus)*. Quito. Recuperado el 28 de 1 de 2016, de

<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8736/1/UPS-QT06658.pdf>

Sandoval, A., Rodriguez, E., & Ayala, A. (Mayo de 2004). Encapsulación de

Aditivos para la Industria de Alimentos. 5(2), 73-83. Recuperado el 11 de 10 de 2015, de

<http://revistaingenieria.univalle.edu.co:8000/index.php/inymce/article/view/75/75>

Santin, M., Dos Santos, A., Nakamura, C., Filho, B., Ferreira, I., & Ueda-Nakamura, T. (2009). In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its mayor component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Journal of Parasitology Research*, 05, 1489-1496. Recuperado el 5 de 1 de 2016

Schramm, L. (2005). *Emulsions, foams and suspensions: Fundamentals and applications*. Canadá: Wiley - VCH. Recuperado el 2 de 1 de 2016, de

<http://61.188.205.38:8081/hxgcx/hcjs/UploadFiles/pdf/%E6%96%87%E7%8C%AE%E5%BA%93/%E6%A8%A1%E5%9D%97%E4%BA%8C-%E8%A1%A8%E9%9D%A2%E6%B4%BB%E6%80%A7%E5%89%82/Emulsions,%20Foams,%20and%20Suspensions%20-%20Fundamentals%20and%20Applications.pdf>

- Shaugnessy, D. S. (2006). Inhibition of spontaneous mutagenesis by vanillin and cinnamaldehyde in *Escherichia coli*: Dependence on recombinational repair. *Mutation Research*, 602, 54-64. Recuperado el 5 de 1 de 2016
- Tanford, C. (1980). *The hydrophobic effect. Formation of Micelles and Biological Membranes*. (2 ed.). New York: Wiley. Recuperado el 9 de 1 de 2016
- Terán, E., & Escalera, R. (2007). Obtención de carboximetilcelulosa a partir de linter de algodón. *Investigación & Desarrollo*(7), 107-120. Recuperado el 9 de 1 de 2016
- Torres E., K. (2014). *Caracterización de las dispersiones acuosas homogéneas de hidroxipropilmetil celulosa Rh y alginato de sodio, empleadas como aglutinantes en la fabricación de productos farmacéuticos granulados de uso veterinario*. Tesis pregrado Químico Farmacéutico, Santiago de Cali. Recuperado el 6 de 12 de 2015, de https://bibliotecadigital.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/76964/1/caracterizacion_dispersiones_acuosas.pdf
- Trindade, C., Pinho, S., & Rocha, G. (2008). Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11(2), 103-112. Recuperado el 26 de 12 de 2015, de <http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/html/busca/PDF/v11n2318a.pdf>
- Valdés, O. (2005). *Diseño de soportes combinados a base de polímeros naturales y sintéticos para su evaluación en cultivos celulares y la liberación de principios activos*. Habana: Universidad de la Habana. Recuperado el 10 de 10 de 2015, de

<http://ri.ues.edu.sv/2785/1/TRABAJO%20FINAL%20ELABORACION%20DE%20MICROESFERAS%20MATRICIALES%20DE%20ASA.pdf>

Vilajato, J. (1997). *Tecnología Farmacéutica*. Madrid: Síntesis.

Villatoro, J. (2008). *Interacciones entre tintes de Rodamina y polímeros solubles en agua*. Tesis de pregrado, Universidad de Chile, Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias, Chile. Recuperado el 11 de 10 de 2015, de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fca663e/doc/fca663e.pdf>

Willaert, R. G., & Baron, G. V. (1996). Gel entrapment and microencapsulation: methods, applications and engineering principles. *Reviews in Chemical Engineering*, 12(1-2), 5-205. Recuperado el 7 de 12 de 2015, de <http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/brazilianjournal/free/p05188.pdf>

Windhab, E., Dressler, M., Fiegl, K., & Megias, D. (2005). Emulsion processing- from single drop deformation to design of complex processes and products. *Chemical Engineering Science*, 60, 210-213. Recuperado el 30 de 12 de 2015

Yoshia, H., Sootitantawata, A., Liua, X.-D., Atarashia, T., Furutaa, T., Aishimab, S., . . . Linkoc, P. (2001). Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 55-61. doi:10.1016/S1466-8564(01)00019-4

Yúfera, M., Fernández, C., & Pascual, E. (2005). Food microparticules for laval fish prepared by internal gelation. *Aquaculture*, 248, 253-262. Recuperado el 11 de 1 de 2016, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004484860500219X>

Zaniboni, E. (2013). *Características físicas e estabilidade na água do alimento para peixes microencapsulado de sódio*. Bárbara Othero Nunes Mugnaini, Florianópolis,. Recuperado el 20 de 10 de 2015, de <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/122147/B%C3%A1rbara%20Othero%20Nunes%20Mugnaini.pdf?sequence=1&isAllowed=y>