

OPTIMIZACION DE LA OBTENCION DE MICROCAPSULAS DE ACEITE ESENCIAL DE POMELO POR GELIFICACION IONICA

LM Cáceres*, GA Velasco y ER Chamorro

Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica (QUIMOBIO), UTN-FRRe,
French 414, H3500CHJ, Resistencia, Chaco, Argentina.

Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica (IMIT-CONICET), Corrientes,
Argentina

lmarielc@yahoo.com.ar

Resumen. La microencapsulación es definida como una tecnología de empaquetamiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos y actualmente es aplicada con éxito en la industria alimentaria, biotecnológica y farmacéutica. Se la utiliza como método de protección de principios activos sensibles a factores externos y pueden liberar su contenido a velocidades controladas. De esta manera, estos compuestos pueden ser incorporados a distintos productos, aprovechando sus propiedades antimicrobianas, conservantes, saborizantes o aromatizantes, entre otras. Los aceites esenciales son compuestos susceptibles a la luz, al agua y al oxígeno, por lo que su encapsulación, mejora su manipulación y aprovechamiento. En este trabajo se optimizó el proceso de microencapsulación del aceite esencial de pomelo con alginato de sodio por gelificación iónica externa acoplada a una extrusión. Se utilizó alginato de sodio al 1% p/v y carga de aceite esencial del 2% p/p. Se determinó el punto óptimo con concentración de cloruro de calcio del 10% p/v con tiempo de reticulación de 45 minutos. En estas condiciones la eficiencia media fue de $95,89 \pm 0,04\%$, y el rendimiento medio de $56,87 \pm 1,2\%$.

Palabras clave: Microencapsulación, Gelificación Iónica, Aceite esencial

1. Introducción

Los aceites esenciales son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como aditivos de aroma y sabor y como conservantes, entre otras aplicaciones (Benavidez et al., 2016). Sin embargo, presentan alta volatilidad e inestabilidad química en presencia de aire, luz, humedad y altas temperaturas. Por lo tanto, es beneficioso microencapsular estos ingredientes antes de su uso en alimentos o bebidas para limitar la degradación o pérdida de aroma durante el procesamiento y almacenamiento (Jun-Xia et al., 2012) en una microcápsula o microesfera. La microencapsulación genera una cobertura polimérica alrededor del aceite esencial a la cual lo protege y permite su liberación controlada (Hosseini et al., 2013). En la microencapsulación se puede obtener una cápsula con un núcleo interno con el ingrediente activo y una cubierta externa, o una microesfera que es una matriz sólida en la que el ingrediente activo está finamente distribuido y donde es necesaria la premezcla entre el ingrediente activo y la solución de polímero antes de la encapsulación (Saéz et al., 2004). Estos polímeros generalmente son hidrocoloides que poseen alta capacidad para absorber agua, fácil manipulación e inocuidad (Lupo Pasin et al., 2012). El alginato de sodio es uno de los hidrocoloides más interesante como polímero de pared o componente

* A quien debe enviarse toda la correspondencia

de revestimiento debido a sus propiedades coloidales únicas, que incluyen espesamiento, estabilización, suspensión, formación de película, producción de gel y estabilización de emulsión (Rhim, 2004). El alginato de sodio consiste en dos bloques de construcción con residuos de ácido α -L-gulurónico y ácido β -D-manurónico, unidos linealmente entre sí por enlaces α (1-4) glucosídicos (Goh et al., 1980). Esta composición química brinda al alginato la capacidad de experimentar una transición de sol-gel independiente de la temperatura en presencia de cationes multivalentes como el Calcio (Smidsrod y Draget, 1996), característica que se la aprovecha en el proceso de gelificación iónica. La gelificación iónica es uno de los métodos más importantes por su versatilidad y simplicidad (Saravanan y Rao, 2010). Este proceso incluye una reticulación del hidrogel de alginato con una solución del cloruro de calcio (Mahdi et al., 2016). Se puede adosar a este proceso de gelificación externa una extrusión para encapsular aceites (Chan, 2011) utilizando una bomba jeringa (Pasukamsonset et al., 2016).

El objetivo de este trabajo fue encapsular aceite esencial de pomelo en cápsulas de alginato de calcio por gelificación iónica externa y extrusión. Se optimizó el proceso de microencapsulación, estudiando también la influencia de parámetros del proceso de reticulación, tales como la concentración de cloruro de calcio y el tiempo de curado sobre la eficiencia y el rendimiento de encapsulación.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

Se utilizó alginato de sodio (Aldrich), cloruro de calcio anhidro p.a. (Cicarelli), alcohol ter-butílico (Anedra), patrón de limoneno (Aldrich), agua desionizada. Aceite de pomelo, con un contenido del 93% de limoneno, analizado e informado en trabajos anteriores (Vasek et al., 2015) fue proporcionado por la empresa Magger Cítricos del Valle de la provincia de Corrientes.

2.2. Metodología

Obtención de microcápsulas. Se prepararon las siguientes soluciones: solución reticulante de cloruro de calcio al 2-5 y 10% p/v, y solución de alginato de sodio al 1% p/v. Con un homogenizador agitador compacto digital vertical de paletas (Cole-Parmer modelo 50006-00, Canadá) sobre un baño María a 40°C. Se formó una emulsión adicionando aceite de pomelo 2% p/p a la solución de alginato, con un homogenizador DLAB, Modelo D-500 a 2000 rpm durante 3 minutos para lograr la distribución homogénea de la emulsión. Se formaron las cápsulas a través de una extrusión con una bomba jeringa APEMA PC 11 UBT, goteando la emulsión sobre la solución de cloruro de calcio a 5cm de altura, con caudal de 90ml/h. El diámetro de salida de la gota fue de 0,21 mm, el tiempo de reticulación fue de 15-30 y 45 minutos. Luego se filtraron las cápsulas y se lavaron con alcohol terbutílico para eliminar el aceite residual y luego se registró su peso. Se analizó la morfología de las microcápsulas observándolas con microscopio óptico.

Cálculo de la eficiencia de microencapsulación. La eficiencia porcentual de limoneno encapsulado se determinó por cromatografía gaseosa (Solomon et al., 2012). Se tomó una muestra de 30 μ l de la solución de lavado de las microcápsulas y se agregó el estándar interno (metilisobutilcetona) para luego ser analizada con un SHIMADZU GC 14B, con columna polar Megabore DB-WAX P/N 125-7032 de 30m de longitud x 0,53mm de diámetro interno x 1 μ de espesor, conectada a un detector FID. La temperatura del detector fue de 220°C y la temperatura de inyector de 180°C. La temperatura de la columna se mantuvo isotérmica en 40°C durante 2 minutos, luego inició una rampa de 5°Cmin⁻¹ hasta llegar a 180°C, por último se mantuvo isotérmica a 180°C durante 2 minutos. Se comparan las relaciones de áreas de los cromatogramas en una curva de calibración para conocer la masa de aceite encapsulado. El valor de la eficiencia (E%) se determinó con la siguiente Ec. (1), (Maji, 2007).

$$E\% = w_1/w_2 \cdot 100 \quad (1)$$

Donde w_1 es la masa de aceite en una masa conocida de microcápsulas que se determina por diferencia de w_2 (masa inicial teórica de aceite agregada) y la masa final calculada por cromatografía gaseosa.

Cálculo del rendimiento de microencapsulación. Para determinar el rendimiento, se pesaron las microcápsulas (w_m) obtenidas y conociendo la cantidad de principio activo (w_a) y de polímero (w_p) que se empleó para preparar la emulsión, se aplicó la siguiente Ec. (2) (González et al., 2005):

$$R\% = \frac{wm}{(wa+wp)} \cdot 100 \quad (2)$$

Observación microscópica. Se analizó la forma y tamaño de las microcápsulas obtenidas con microscopio óptico trinocular marca Lancet modelo SME F6E, equipado con cámara (TOUPCAM UCMOS01300KPA, modelo TP601300A, origen China) y software de procesamiento de datos (Toup View: Touptek Photonics of Touptek Corporation) con aumento de 4x.

Diseño experimental. Se utilizó un diseño experimental factorial de dos factores con tres niveles (3^2), con un total de 18 tratamientos para la realización de los experimentos. Se estudiaron como factores la concentración de cloruro de calcio y el tiempo de reticulación, y se analizaron como variables respuesta a la eficiencia y el rendimiento de encapsulación. Este tipo de diseños permite evaluar el efecto de ambos factores en la respuesta del proceso, y determinar si la actuación de ambos es independiente (Montgomery, 2004). El modelo matemático de optimización que rige para este modelo de dos factores totalmente aleatorizado es el siguiente, Ec. (3), obtenido a partir de un análisis de regresión (Kuehl, 2001):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \varepsilon \quad (3)$$

Donde y representa cada respuesta a analizar, β son los efectos medios, x_1 y x_2 son los factores o variables de entrada, y ε es el error medio aleatorio.

Los factores del diseño con sus niveles se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores y niveles del diseño experimental

Niveles	Factores	
	Cc CaCl ₂ (% p/v)	Tiempo (min)
	a	b
1	2	15
2	5	30
3	10	45

3. Resultados y Discusión

3.1. Obtención de microcápsulas

Las microcápsulas obtenidas fueron de forma esférica y homogénea. Los diámetros se midieron con microscopio óptico utilizando el software de medición. Se obtuvieron diámetros de hasta 2mm, similares resultados fueron obtenidos por Liu (2012).

3.2. Eficiencia y Rendimiento

En la Tabla 2 se muestran los valores medios obtenidos de eficiencia y rendimiento de encapsulación para cada factor y nivel, aplicando respectivamente las ecuaciones (1) y (2). Los valores máximos de eficiencia (96,33%) y rendimiento (52,01%) fueron con concentración de cloruro de calcio al 10% y tiempo de reticulación de 30 minutos. En estudios similares se reportaron eficiencias menores del 85% con concentración de cloruro de calcio de 1,5% p/v (Benavides et al., 2016); y eficiencias del 83,8% con el uso de un agente emulsionante (Tween-80) (Banerjee et al., 2013). El rendimiento máximo obtenido es similar al reportado por Benavides et al. (2016) de un 60 a 62%. En otro estudio de Ribeiro et al. (1999) se obtuvieron rendimientos del 60-80% con el uso de emulsiones dobles de aceite y agua, además de la incorporación de quitosano, aumentando la complejidad del proceso de esferificación.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la prueba ANOVA para la eficiencia y rendimiento de encapsulación. Se observa que, tanto la concentración de cloruro de calcio y el tiempo de reticulación, tienen efecto significativo (para $\alpha=0,05$) sobre ambas variables respuestas. El efecto lineal es mayor que el cuadrático (valor F mayor). En el rendimiento afecta significativamente la concentración de cloruro de calcio y no el tiempo de reticulación. El coeficiente R^2 que indica la variabilidad que de los factores que explica el modelo, tiene un valor de 79,20% para la eficiencia y un 78,61% para el rendimiento.

Tabla 2. Medias de Eficiencia y Rendimiento de encapsulación.

Fuente	Eficiencia (%)		Rendimiento (%)	
	Media	DST	Media	DST
Cl₂Ca				
2	94,78	0,22	32,87	2,32
5	95,04	0,22	42,43	2,32
10	96,01	0,22	51,76	2,32
Tiempo				
15	94,36	0,22	43,00	2,32
30	95,71	0,22	42,35	2,32
45	95,76	0,22	41,70	2,32
Cl₂Ca *Tiempo				
2*15	92,98	0,37	33,39	4,02
2*30	95,51	0,37	32,91	4,02
2*45	95,85	0,37	32,29	4,02
5*15	94,53	0,37	43,68	4,02
5*30	95,30	0,37	42,13	4,02
5*45	95,28	0,37	41,46	4,02
10*15	95,57	0,37	51,93	4,02
10*30	96,33	0,37	52,01	4,02
10*45	96,14	0,37	51,34	4,02

Tabla 3. Tabla ANOVA

Fuente	GL	Eficiencia		Rendimiento	
		F	P	F	P
Modelo	5	9,14	0,00	8,82	0,00
Lineal	2	14,83	0,00	22,03	0,00
Cl₂Ca	1	14,02	0,00	43,87	0,00
Tiempo	1	15,63	0,00	0,2	0,67
Cuadrado	2	2,88	0,10	0,49	0,62
Cl₂Ca * Cl₂Ca	1	0,5	0,49	0,98	0,34
Tiempo*Tiempo	1	5,26	0,04	0,00	1,00
Interacción de 2 factores	1	6,86	0,02	0,01	0,92
Cl₂Ca *Tiempo	1	6,86	0,02	0,01	0,92
Error	12				
R ²		79,20%		78,61%	
Falta de ajuste	3	1,71	0,23	0,02	1,00
Error puro	9				
Total	17				

GL: Grados de libertad, F: estadístico de Fisher, P: p-valor

Las Ecuaciones (4) y (5) muestran las optimizaciones obtenidas para la eficiencia (E%) y el rendimiento (R%) de encapsulación basadas en un modelo de regresión cuadrático. En ambas puede observarse el efecto positivo de los factores concentración de cloruro de calcio (x_1), sin embargo, el tiempo de reticulación (x_2) posee un efecto positivo sobre la Eficiencia (E%) y negativa sobre el Rendimiento (R%). Además el efecto de las interacciones de ambos factores es negativo en ambos casos.

$$E\% = 89,68 + 0,253x_1 + 0,271x_2 - 0,008x_1x_2 - 0,0136x_1^2 - 0,003x_2^2 \quad (4)$$

$$R\% = 26,600 + 4,250x_1 - 0,060x_2 - 0,003x_1x_2 - 1,65x_1^2 + 0,000x_2^2 \quad (5)$$

Las gráficas de contorno muestran que la eficiencia (Fig. 1.a) alcanza valores mayores para concentraciones de cloruro de calcio entre el 9 y 10% p/v y tiempos entre 25 y 45 minutos. Mientras que el rendimiento (Fig. 1.b) muestra valores mayores para todos los tiempos también con concentraciones de cloruro de calcio entre 9 y 10% p/v.

La optimización de ambas variables a través de la función deseabilidad se muestra en la Fig. 2. La deseabilidad compuesta (0,83) es buena, lo que indica que la combinación de los valores de las variables permite maximizar la eficiencia y el rendimiento. Sin embargo, la deseabilidad individual indica que la configuración es más efectiva para maximizar la eficiencia ($d=0,94$) que para maximizar el rendimiento ($d=0,74$). Según el modelo, con una concentración de cloruro de calcio de 10% p/v y un tiempo de reticulación de 45 minutos se obtendría un rendimiento de 51,7% y un 96,5% de eficiencia del proceso de encapsulación. Con estos valores configurados se obtiene un intervalo de predicción con un nivel de confianza del 95% para la eficiencia de 95,8% a 97,1% y para el rendimiento de 46,1% a 57,4%. La validación del modelo fue realizada con cinco corridas en el punto óptimo, reticulando con una solución de cloruro de calcio de 10% w/v, durante un tiempo de 45 minutos. Los resultados obtenidos se ajustaron al modelo, siendo la eficiencia media de $95,89 \pm 0,04\%$, y el rendimiento medio de $56,87 \pm 1,2\%$

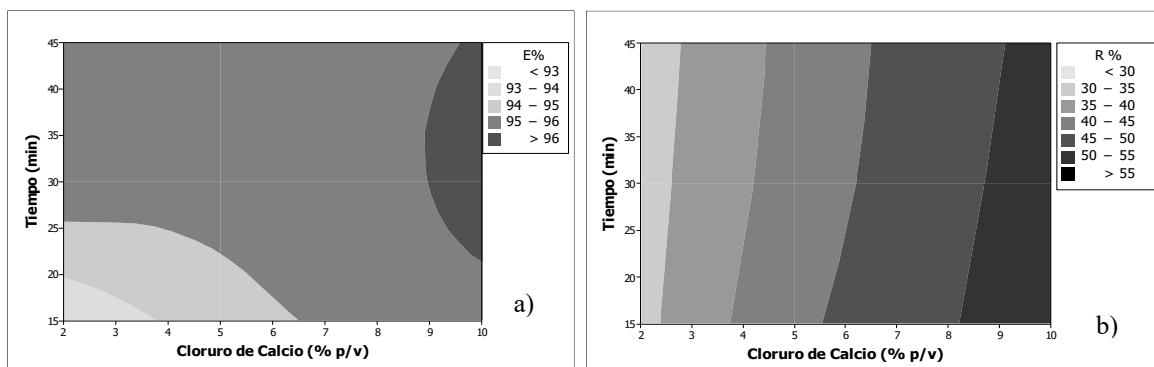


Fig. 1. Gráficas de Contorno: a) eficiencia de encapsulación, b) rendimiento de encapsulación

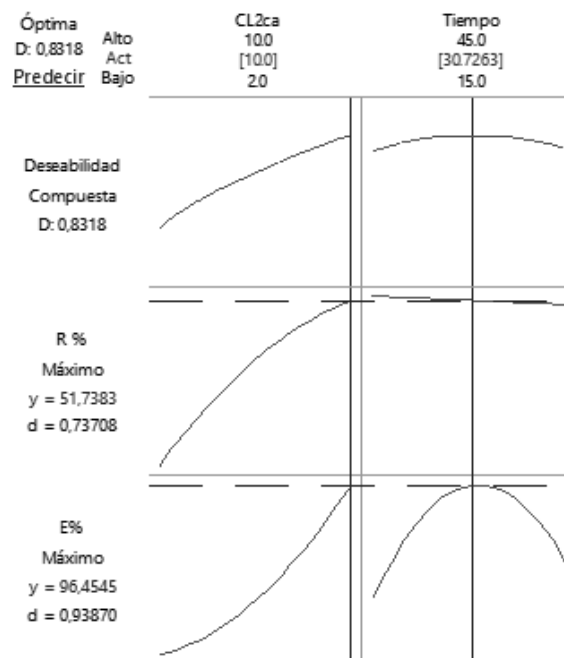


Fig. 2. Gráfica de optimización y deseabilidad

4. Conclusión

Se estudió la encapsulación de aceite de pomelo por gelificación iónica externa y extrusión con alginato al 1% p/p y carga de aceite del 2% p/p. Se optimizó el proceso de obtención de las microcápsulas obteniendo el punto óptimo cuando la concentración de cloruro de calcio es del 10% p/v con tiempo de reticulación de 45 minutos. En estas condiciones la eficiencia media fue de $95,89 \pm 0,04\%$, y el rendimiento medio de $56,87 \pm 1,2\%$.

Referencias

- Banerjee, S., Chattopadhyay, P., Ghosh, A., Goyary, D., Karmakar, S., & Veer, V. (2013). Influence of process variables on essential oil microcapsule properties by carbohydrate polymer–protein blends. *Carbohydrate polymers*, *93*(2), 691-697.
- Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food chemistry*, *204*, 77-83.
- Chan, E. (2011). Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers*, *84*, 1267–1275.
- Goh, C. H., Heng, P. W. S., Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, *88*(1), 1-12.
- González, N., Fernández, D., Gómez, M., Núñez, L., & Lafita, O. (2005). Efecto del Eudragit y la Etilcelulosa como agentes retardantes de la liberación sobre las características físico-químicas y la liberación in vitro de microesferas cargadas con zidovudina. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, *24*(3), 350-355.
- Hosseini, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M., Mortazavian, A., Mohammadi, A., Khosravi-Darani, K., Shojaee-Aliabadi, S., Khaksar, R. (2013). Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *International Journal of Biological Macromolecules*, *62*, 582–588. Web: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.054>
- Jun-xia, X., Hai-yan, Y., Jian.Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, *125*, 1267–1272.
- Kuehl, R. (2001). Diseño de experimentos. Principios estadísticos para el diseño y el análisis de las investigaciones. México. Thompson, Learning
- Lupo Pasin, B., González Azón, C., Maestro Garriga, A. (2012). Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *3*(1), 130-151.
- Mahdi, M. H., Diryak, R., Kontogiorgos, V., Morris, G. A., & Smith, A. M. (2016). In situ rheological measurements of the external gelation of alginate. *Food Hydrocolloids*, *55*, 77-80.
- Montgomery, D. C. (2003). Diseño y análisis de experimentos, Ed. *Limusa Wiley, México*.
- Pasukamonset, P., Kwon, O., & Adisakwattana, S. (2016). Alginate-based encapsulation of polyphenols from Clitoria ternatea petal flower extract enhances stability and biological activity under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, *61*, 772-779.
- Rhim, J. W. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT-Food science and technology*, *37*(3), 323-330.
- Ribeiro, A. J., Neufeld, R. J., Arnaud, P., & Chaumeil, J. C. (1999). Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. *International journal of pharmaceutics*, *187*(1), 115-123.
- Sáez, V., Hernández, E., Sanz, L., Katime, I. (2004). Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, *5*(2), 87-101.
- Saravanan, M., Rao, K. P. (2010). Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, *80*(3), 808-816.
- Smidsrod, O., & Draget, KL (1996). Chemistry and physical properties of alginates. *Carbohyd Eur* *14*:6-13.
- Solomon, B., Sahle, F. F., Gebre-Mariam, T., Asres, K., Neubert, R. H. H. (2012). Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *80*(1), 61-66.
- Vasek, O. M., Cáceres, L. M., Chamorro, E. R., & Velasco, G. A. (2015). Antibacterial activity of *Citrus paradise* essential oil. *Journal of Natural Products*, *8*, 16-26.