

Desarrollo y caracterización de una metodología de microencapsulación por emulsión de aceites vegetales a partir de alginato de sodio

Gabriela Durán Díaz

Trabajo de Grado para Optar al Título de Ingeniero Metalúrgico

Directora

Viviana Raquel Güiza Argüello

PhD en Ingeniería Química

Codirectora

Natalia Roció Moreno Castellanos

Dra. en Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales

Ingeniería Metalúrgica

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

A mi madre Esmeralda, por su amor, apoyo incondicional, esfuerzo, sacrificio día a día y ánimos en los buenos y malos momentos para conseguir este gran logro. A mis tías Nelly y Rubby por su acompañamiento y por estar cada día presente en mi camino. A mi Padrino Gabriel, por su apoyo, interés y cariño en todo lo que sucede en mi vida. A mi familia por el apoyo moral en esta etapa. Y por último y no menos importante dedico mi obra a la nona Ana, desde el cielo eres mi guía y mi fuerza para continuar hasta alcanzar este gran triunfo, que allí donde quiera que estés es para tí.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Industrial de Santander, por la formación para lograr ser la profesional en lo que más me apasiona, a mis maestras Viviana Güiza y Natalia Moreno por la confianza que depositaron en mí, los aportes y conocimientos para la elaboración de mi proyecto, su apoyo y acompañamiento en esta última etapa.

A los demás profesores, que me transmitieron sus conocimientos técnicos y tecnológicos por la Ingeniería Metalúrgica.

A la Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales, al Grupo de Investigación en Desarrollo y Tecnología de Nuevos Materiales (GIMAT), quienes aportaron en el proceso experimental de este proyecto y en mi formación profesional.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Objetivos.....	13
1.1 Objetivo General.....	13
1.2 Objetivos Específicos.....	13
2. Marco Teórico.....	13
2.1 Aceites Esenciales.....	14
2.2 Microencapsulación por emulsión	14
2.3 Gelificación iónica	15
2.3 Alginato.....	15
3. Metodología Experimental.....	15
3.1 Pruebas preliminares	16
3.2 Desarrollo de un protocolo para la fabricación de microcápsulas de alginato de sodio:	18
3.2.1 Ajuste de la concentración de alginato de sodio de grado de laboratorio.....	18
3.2.2 Evaluación de diferentes parámetros del proceso de microencapsulación en el tamaño y esfericidad de las microcápsulas obtenidas.....	18
3.3 Caracterización de las microcápsulas	21
3.3.1 Morfología y tamaño.....	21
3.3.2 Cinética de degradación.....	22
3.3.3 Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga	22
4. Resultados y Discusión.....	23
4.1 Caracterización preliminar de las microcápsulas.....	23

4.2 Desarrollo de un protocolo para la fabricación de microcápsulas de alginato de sodio:	25
4.2.1 Ajuste de la concentración de alginato de sodio (grado de laboratorio) en el precursor.	25
4.2.2 Evaluación del efecto de los parámetros de fabricación en el tamaño y esfericidad de las microcápsulas obtenidas.	26
4.3 Cinética de degradación	31
4.4 Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga	33
5. Conclusiones	37
Recomendaciones	38
Referencias Bibliográficas	39

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Condiciones para la fabricación de las microcápsulas en la primera prueba preliminar.</i>	16
Tabla 2. <i>Variables a evaluar en la segunda prueba preliminar.</i>	17
Tabla 3. <i>Condiciones para la fabricación de las microcápsulas en la segunda prueba preliminar.</i>	17
Tabla 4. <i>Condiciones para la fabricación de las microcápsulas en el ajuste de la concentración de alginato de grado de laboratorio.</i>	18
Tabla 5. <i>Variables estudiadas para la encapsulación. Prueba 1.</i>	19
Tabla 6. <i>Condiciones para la fabricación de las microcápsulas de alginato grado laboratorio. Prueba 1.</i>	19
Tabla 7. <i>Condiciones para la fabricación de las microcápsulas de alginato grado laboratorio. Prueba 2.</i>	20
Tabla 8. <i>Condiciones para la fabricación de las microcápsulas de alginato grado laboratorio. Prueba 3.</i>	21
Tabla 9. <i>Parámetros definidos para la fabricación de microcápsulas de alginato de sodio para encapsulación de aceites vegetales.</i>	31
Tabla 10. <i>Porcentaje de cambio de masa para microcápsulas fabricadas a partir de precursores con concentración de alginato del 4, 5 y 6%.</i>	33

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Esquema proceso de fabricación de las microcápsulas.</i>	16
Figura 2. <i>Micrografía (a), diámetro promedio (b) y factor de esfericidad (c) de las microcápsulas según el calibre de la aguja. Escala: 2000 μm. Las barras representan el promedio de 30 medidas.</i>	24
Figura 3. <i>Micrografía (a) y diámetro promedio (b) de las microcápsulas según el SOR y la capacidad volumétrica de la jeringa. Escala: 2000 μm. Las barras representan el promedio de 30 medidas.</i>	25
Figura 4. <i>Micrografía (a) y diámetro promedio (b) de microcápsulas de 5% y 7% de alginato según la concentración de alginato de sodio. Escala: 2000 μm. Las barras representan el promedio de 30 medidas.</i>	26
Figura 5. <i>Morfología de las microcápsulas según la concentración de alginato, concentración de CaCl_2 y la velocidad de agitación del baño gelificante. Escala: 2000 μm.</i>	27
Figura 6. <i>Efecto de la concentración de alginato de sodio, concentración de CaCl_2 y velocidad de agitación del baño gelificante en el diámetro promedio (a) y el factor de esfericidad (b). Las barras representan el promedio de 80 - 150 medidas.</i>	28
Figura 7. <i>Micrografía (a), diámetro promedio (b) y factor de esfericidad (c) de las microcápsulas con 3%, 4%, 5% y 6% de alginato con calibre de aguja 30G. Escala: 2000 μm. Las barras representan el promedio de 140 medidas.</i>	29
Figura 8. <i>Micrografía (a), diámetro promedio (b) y factor de esfericidad (c) de las microcápsulas de 4%, 5% y 6% p/v alginato de sodio con calibre de aguja 34G. Escala: 2000 μm. Las barras representan el promedio de 160 medidas.</i>	30

Figura 9. <i>Efecto de la concentración de alginato en el porcentaje de cambio de masa de las microcápsulas durante la prueba de cinética de degradación.</i>	33
Figura 10. <i>Espectros de absorbancia vs longitud de onda de los solventes estudiados con una concentración de 0.1785 mg/mL de aceite esencial.</i>	34
Figura 11. <i>Curva estándar de la muestra problema de aceite esencial 50% EtOH en PBS.</i>	34
Figura 12. <i>Espectros de absorbancia vs longitud de onda de las microcápsulas 4%, 5% y 6% alginato de sodio.</i>	35

Resumen

Título: Desarrollo y caracterización de una metodología de microencapsulación por emulsión de aceites vegetales a partir de alginato de sodio*

Autor: Gabriela Durán Díaz**

Palabras Clave: Microencapsulación, alginato de sodio, emulsión, aceites vegetales.

Descripción: En el presente trabajo se expone el desarrollo y la caracterización de un protocolo para la microencapsulación por emulsión de aceites vegetales con alginato de sodio por medio de la gelificación iónica, para aplicaciones biomédicas.

Se evaluó la influencia de la concentración del alginato de sodio, SOR (Surfactant to Oil Ratio), el calibre de la aguja, la capacidad volumétrica de la jeringa, la concentración de CaCl_2 y la velocidad de agitación del baño gelificante en el tamaño y morfología de las microcápsulas fabricadas. Las partículas fueron caracterizadas en términos de su diámetro promedio, factor de esfericidad y cinética de degradación. Los resultados de este estudio mostraron que el tamaño de partícula más pequeño que cumple con el factor de esfericidad es aproximadamente de $1600 \mu\text{m}$. A partir de los resultados obtenidos en la prueba de degradación in vitro se observó que el comportamiento de las microcápsulas varía según la concentración de alginato de sodio. Los diferentes experimentos para medir la cinética de degradación, la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga permitieron definir y/o descartar diferentes factores y variables en dichos procesos. Esta investigación permite definir una metodología inicial para próximos estudios en el área de la microencapsulación de aceites vegetales.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales. Ingeniería Metalúrgica. Director: Viviana Raquel Güiza Argüello. PhD en Ingeniería Química. Codirector: Natalia Roció Moreno Castellanos. Dra. en Ciencias Básicas Biomédicas.

Abstract

Title: Development and characterization of a microencapsulation methodology by emulsion of vegetable oils using sodium alginate*

Author: Gabriela Durán Díaz**

Key Words: Microencapsulation, sodium alginate, emulsion, vegetable oils.

Description: The present work presents the development and characterization of a protocol for microencapsulation by emulsion of vegetable oils with sodium alginate through ionic gelation, for biomedical applications.

The influence of the concentration of sodium alginate, SOR (Surfactant to Oil Ratio), the gauge of the needle, the volumetric capacity of the syringe, the concentration of CaCl_2 and the stirring speed of the gelling bath on the size and morphology of the manufactured microcapsules. The particles were characterized in terms of their average diameter, sphericity factor and degradation kinetics. The results of this study showed that the smallest particle size that meets the sphericity factor is approximately 1600 μm . From the results obtained in the in vitro degradation test, it observed that the behavior of the microcapsules varies depending on the concentration of sodium alginate. The different experiments to measure the degradation kinetics, encapsulation efficiency and loading capacity made it possible to define and/or rule out different factors and variables in these processes. This research allows defining an initial methodology for future studies in the area of microencapsulation of vegetable oils.

* Degree Work

**Faculty of Physicochemical Engineering, School of Metallurgical Engineering and Materials Science. Metallurgical Engineering. Director: Viviana Raquel Güiza Argüello. PhD in Chemical Engineering. Co-director: Natalia Rocio Moreno Castellanos. Dr. in Basic Biomedical Sciences

Introducción

Varios estudios han indicado que extractos vegetales como los aceites esenciales, pueden tener propiedades beneficiosas para la salud y efectos positivos en el tratamiento de diversas enfermedades (Balanč et al., 2016, Flamminii et al., 2021, Ramsey et al., 2020, Rodrigues et al., 2022). Los nutraceuticos son sustancias fabricadas a partir de compuestos naturales utilizados en aplicaciones nutricionales y medicas. Actualmente es un tema de interés, ya que ofrece beneficios como prevenir enfermedades, mejorar la salud y proporcionar efectos nutritivos y terapéuticos (Nasri et al., 2014). Los aceites esenciales son estudiados por su alto potencial para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiacas, respiratorias, gástricas, hepáticas y enfermedades crónicas como la diabetes (Matera et al., 2023). Sin embargo, los aceites esenciales son inestables, volátiles y susceptibles a la degradación por diversos factores ambientales como la temperatura y la humedad, por esta razón su uso como complemento alimenticio se ve limitado y requieren un tratamiento especial para su conservación, manipulación y transporte (Alcantar et al., 2014, Baranauskaite et al., 2021, Chan et al., 2011, Dima et al., 2016).

Por lo tanto, una alternativa para disminuir la degradación de los aceites esenciales es la microencapsulación, una tecnología de almacenamiento de compuestos bioactivos en una matriz polimérica, la cual permite prolongar la vida útil del compuesto, proporcionar el enmascaramiento de sabores y aromas, mejorar la estabilidad y permitir una liberación controlada en el cuerpo (Alcantar et al., 2014, Khorshidian et al., 2018, Rodrigues et al., 2022). Existen múltiples técnicas de microencapsulación, sin embargo, en el contexto de la industria de alimentos, la microencapsulación con emulsiones de alginato es de gran relevancia, ya que provee una metodología de bajo costo, sencilla, biodegradable y biocompatible para encapsular nutraceuticos

de interés como los aceites esenciales (Alcantar et al., 2014, Baranauskaite et al., 2021, Letocha et al., 2022).

En este contexto, el presente trabajo de investigación apunta al desarrollo y caracterización de un protocolo para la microencapsulación de aceites vegetales, utilizando alginato de sodio como material encapsulante. Se planea evaluar las diferentes variables (concentración de alginato, calibre de la aguja de extrusión, SOR (Surfactant to Oil Ratio) y concentración de CaCl_2) que afectan el proceso de encapsulación, la morfología, el tamaño de las microcápsulas, la cinética de degradación, la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga. Con el fin de determinar los parámetros óptimos para realizar el proceso de microencapsulación de aceites vegetales con alginato de sodio.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Desarrollar y caracterizar una metodología de microencapsulación por emulsión de aceites vegetales a partir de alginato de sodio.

1.2 Objetivos Específicos

Diseñar un protocolo experimental para la fabricación de microcápsulas de alginato de sodio para la encapsulación de aceites vegetales.

Evaluar el efecto de la composición de la solución polimérica precursora en la morfología, tamaño y la eficiencia de encapsulación de las microcápsulas obtenidas.

Estudiar la biodegradabilidad *in vitro* de las microcápsulas fabricadas.

2. Marco Teórico

2.1 Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son una mezcla de compuestos líquidos volátiles de consistencia oleosa extraídos a partir de hojas, raíces, flores y frutos de plantas. Se utilizan en una amplia gama de aplicaciones en industrias como la farmacéutica, alimentaria y biomédica por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antibacterianas, antifúngicas y antivirales, ya que han evidenciado efectos en tratamientos para enfermedades cardíacas, respiratorias y enfermedades crónicas como la diabetes (Dima et al., 2016, Ramsey et al., 2020). Sin embargo, la conservación de estos compuestos es un problema complejo ya que tienden a degradarse cuando son expuestos a factores externos como la luz, el calor, el oxígeno, la humedad y temperaturas superiores a los 26°C (Alcantar et al., 2014, Rodrigues et al., 2022).

2.2 Microencapsulación por emulsión

La microencapsulación es una tecnología de almacenamiento de compuestos bioactivos como los aceites esenciales, células, microorganismos, vitaminas y minerales en una matriz polimérica, la cual permite proteger el compuesto frente a las diferentes condiciones del medioambiente, prolonga la vida útil, proporciona el enmascaramiento de sabores y permite realizar una liberación controlada en el cuerpo (Alcantar et al., 2014, Khorshidian et al., 2018).

La técnica de emulsión es uno de los métodos más utilizados para la microencapsulación de aceites esenciales (Bannikova et al., 2017); consiste en la mezcla de una fase acuosa que contiene el material encapsulante con una fase oleosa (aceite esencial). Para estabilizar dicha solución es necesario añadir un tensioactivo o surfactante para evitar que las fases se separen. Para ello, es importante tener en cuenta la relación surfactante/aceite (SOR, Surfactant to Oil Ratio), la cual puede tener un efecto en la estabilidad de la emulsión, la morfología y el tamaño de las

microcápsulas. Además, estas características también se ven afectadas por la concentración del polímero encapsulante (Baranauskaite et al., 2021; Gholamian et al., 2021; Letocha et al., 2022).

2.3 Gelificación iónica

La gelificación iónica permite formar geles por medio de un proceso simple, que consiste en gotear la emulsión sobre una solución catiónica con presencia de iones Ca^{2+} o Ba^{2+} bajo agitación. Esta técnica permite gelificar la emulsión debido a la interacción de los iones de calcio con los grupos carboxilos del polímero encapsulante (Alcantar et al., 2014, Fujiwara, et al., 2013).

2.3 Alginato

El alginato es un polímero polianiónico y un polisacárido natural soluble en agua que se obtiene a partir de algas pardas y algas marinas. Su estructura consiste en un copolímero no ramificado de 1,4-alfa-L-gulurónico y ácido β -D-manurónico (Letocha et al., 2022). El alginato es ampliamente utilizado como polímero encapsulante gracias a su biocompatibilidad, inmunogenicidad, no toxicidad, bajo costo y su capacidad de formar geles a partir de la gelificación iónica en presencia de cationes (Fujiwara et al., 2013). Además, es un polímero aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como un material de recubrimiento en aplicaciones biomédicas, alimentarias y de salud (Balanč et al., 2016, Natrajan et al., 2015).

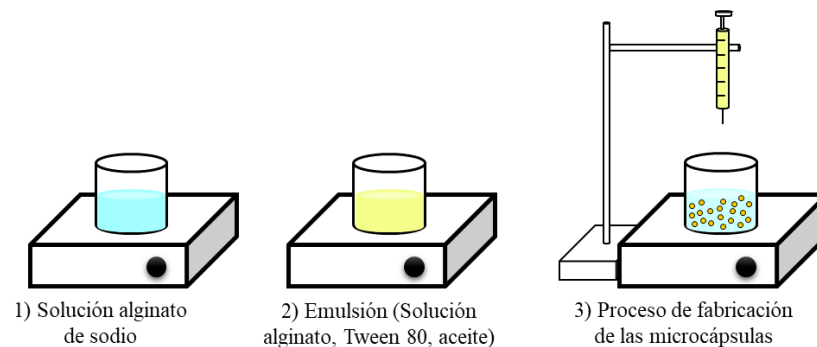
3. Metodología Experimental

De acuerdo con las referencias estudiadas, se definió el montaje necesario para la fabricación de las microcápsulas (Figura 1) y se fijó una distancia de 10 cm entre la punta de la aguja y la superficie del baño gelificante. Además, se definió un rango de concentraciones de aceite de oliva entre 0.02 y 0.06 g/mL en la emulsión. Para las pruebas de ajuste de variables, se utilizó

una concentración promedio de 0.04 g/mL de aceite en la emulsión precursora (Baranauskaite et al., 2021).

Figura 1.

Esquema proceso de fabricación de las microcápsulas.



3.1 Pruebas preliminares

Para las pruebas preliminares, se utilizó un alginato de sodio de grado comercial (para la industria de alimentos), con el fin de realizar una caracterización inicial del proceso de fabricación de las microcápsulas. Primero se evaluó el efecto del calibre de la aguja de la jeringa de extrusión en el tamaño y la morfología de las microcápsulas fabricadas. Se utilizaron 3 tipos de calibre de aguja: 21G (800 μm), 27G (400 μm) y 30G (300 μm).

Tabla 1.

Condiciones para la fabricación de las microcápsulas en la primera prueba preliminar.

Concentración de alginato en la emulsión	1.5% p/v
Concentración de aceite de oliva en la emulsión	0.04 g/mL
SOR (Surfactant to Oil Ratio)	4
Concentración CaCl_2 en baño gelificante	0.4 g/mL
Volumen de la jeringa utilizada para extrusión	1 mL

Después, se evaluó el efecto del SOR (Surfactant to Oil Ratio) y la capacidad volumétrica de la jeringa en la morfología y tamaño de las microcápsulas obtenidas (Tabla 2). Debido a que el proceso de extrusión se realizó de manera manual, este se ve afectado por el tamaño de la jeringa que contiene la emulsión (entre mayor sea la capacidad volumétrica de la jeringa, mayor es la fuerza necesaria para realizar la extrusión). Por otra parte, otros autores han reportado previamente que el SOR utilizado en la emulsión tiene un efecto en el diámetro final de las partículas fabricadas. Según reporta Baranauskaite (2021), cuando el SOR disminuye, el diámetro de las partículas disminuye; asimismo cuando la cantidad de surfactante aumenta, se obtienen microcápsulas de menor tamaño.

Tabla 2.

Variables a evaluar en la segunda prueba preliminar.

SOR (Surfactant to Oil Ratio)	Capacidad volumétrica de la jeringa
SOR 1	3 mL
	10 mL
SOR 5	3 mL
	10 mL

Tabla 3.

Condiciones para la fabricación de las microcápsulas en la segunda prueba preliminar.

Concentración de alginato en la emulsión	1.5% p/v
Concentración de aceite de oliva en la emulsión	0.04 g/mL
Concentración CaCl₂ en baño gelificante	0.5 g/mL
Calibre de aguja de la jeringa de extrusión	27G

3.2 Desarrollo de un protocolo para la fabricación de microcápsulas de alginato de sodio:

3.2.1 Ajuste de la concentración de alginato de sodio de grado de laboratorio.

Una vez concluidas las pruebas preliminares, se adquirió alginato de grado laboratorio (Sigma Aldrich, viscosidad baja) para trabajar el resto de las etapas del proyecto. Debido a que este tipo de alginato es diferente al alginato de grado alimenticio usado previamente, fue necesario realizar primero un ajuste cualitativo de la concentración de alginato que permitiera una extrusión apropiada de la emulsión precursora. Se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones de alginato de sodio (Sigma Aldrich, viscosidad baja): 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% y 8% p/v, cuya viscosidad fue cualitativamente evaluada. Finalmente, para el proceso de microencapsulación, se escogieron dos niveles de alginato de sodio: 5% y 7% y se estudió su efecto en la morfología y el tamaño de las microcápsulas obtenidas.

Tabla 4.

Condiciones para la fabricación de las microcápsulas en el ajuste de la concentración de alginato de grado de laboratorio.

Concentración de aceite de oliva en la emulsión	0.04 g/mL
SOR (Surfactant to Oil Ratio)	4
Concentración CaCl₂ en baño gelificante	0.5 g/mL
Calibre de aguja de la jeringa de extrusión	27G
Volumen de la jeringa utilizada para extrusión	1 mL

3.2.2 Evaluación de diferentes parámetros del proceso de microencapsulación en el tamaño y esfericidad de las microcápsulas obtenidas.

A partir de una revisión de la literatura, se encontró que varios autores han reportado el efecto de las variables de fabricación como la concentración de alginato de sodio, la concentración baño gelificante de cloruro de calcio y la velocidad de agitación del baño gelificante en el tamaño

y la morfología de las microcápsulas obtenidas (Alcantar 2014; Baranauskaite, 2021; Chan, 2011; Natrajan et al., 2015). Por lo tanto, se evaluaron en esta etapa los siguientes parámetros de encapsulación:

Tabla 5.

Variables estudiadas para la encapsulación. Prueba 1.

Concentración de alginato de sodio (%p/v)	Concentración de CaCl ₂ (%p/v)	Velocidad de agitación baño gelificante
6%	0.5%	200 rpm
	0.5%	600 rpm
	1%	200 rpm
	1%	600 rpm
7%	0.5%	200 rpm
	0.5%	600 rpm
	1%	200 rpm
	1%	600 rpm
8%	0.5%	200 rpm
	0.5%	600 rpm
	1%	200 rpm
	1%	600 rpm

Tabla 6.

Condiciones para la fabricación de las microcápsulas de alginato grado laboratorio. Prueba 1.

Concentración de aceite de oliva en la emulsión	0.04 g/mL
SOR (Surfactant to Oil Ratio)	3
Tiempo de gelificación	25 minutos
Calibre de aguja de la jeringa de extrusión	30G
Volumen de la jeringa utilizada para extrusión	1 mL
Volumen de emulsión	1 mL

Lo anterior, permitió definir las condiciones de gelificación de las cápsulas. Una vez establecido esto, se decidió realizar una prueba con concentraciones menores de alginato de sodio

(3%, 4%, 5% y 6% p/v), con el objetivo de intentar disminuir el tamaño de las partículas, sin afectar el factor de esfericidad de estas.

Tabla 7.

Condiciones para la fabricación de las microcápsulas de alginato grado laboratorio. Prueba 2.

Concentración de aceite de oliva en la emulsión	0.04 g/mL
SOR (Surfactant to Oil Ratio)	3
Concentración del baño gelificante CaCl₂	1% p/v
Velocidad de agitación baño gelificante	600 rpm
Tiempo de gelificación	25 minutos
Calibre de aguja de la jeringa de extrusión	30G
Volumen de la jeringa utilizada para extrusión	1 mL
Volumen de emulsión	1 mL

Por último, utilizando las condiciones de la Tabla 8, se fabricaron microcápsulas a partir de emulsiones precursoras de 4%, 5% y 6% de alginato, empleando una aguja calibre 34G (180 μ m) con el fin de observar si era posible disminuir aún más el tamaño de las microcápsulas. Cabe mencionar que las agujas de calibre 34G no se consiguen fácilmente en el mercado y son más costosas que las de calibre 30G. Sin embargo, se logró obtener algunas agujas 34G y por lo tanto se consideró importante estudiarlas.

Tabla 8.

Condiciones para la fabricación de las microcápsulas de alginato grado laboratorio. Prueba 3.

Concentración de aceite de oliva en la emulsión	0.04 g/mL
SOR (Surfactant to Oil Ratio)	3
Concentración del baño gelificante CaCl₂	1% p/v
Velocidad de agitación baño gelificante	600 rpm
Tiempo de gelificación	25 minutos
Calibre de aguja de la jeringa de extrusión	34G
Volumen de la jeringa utilizada para extrusión	1 mL
Volumen de emulsión	1 mL

3.3 Caracterización de las microcápsulas

3.3.1 Morfología y tamaño

El análisis de la morfología y el tamaño de las microcápsulas se realizó después de 24 horas de hinchamiento en agua desionizada, utilizando un microscopio óptico (Digital Microscope KH-7700 Hirox) para tomar micrografías a 35X. Para medir los diámetros de las microcápsulas, se utilizó el software de libre acceso ImageJ y se realizaron un mínimo de 30 mediciones por muestra para obtener un diámetro promedio.

El factor de esfericidad (SF) se calculó con la siguiente fórmula:

$$SF = \frac{d_{max} - d_{per}}{d_{max} + d_{per}} \quad (1)$$

donde d_{max} es el diámetro mayor que pasa por el centro de la partícula y d_{per} es el diámetro perpendicular al d_{max} que pasa por el centro de la partícula. Las microcápsulas con un SF menor a 0.05 son consideradas esféricas (Chan, 2011, Gholamian et al., 2021).

3.3.2 Cinética de degradación

El estudio de cinética de degradación se llevó a cabo con base en lo reportado por Wu (2016), ajustando la concentración de citrato trisódico dihidratado (Sigma Aldrich). Se sumergió cada muestra de microcápsulas (4%, 5% y 6% p/v alginato de sodio) en una solución 0.005 M de citrato trisódico y se midió el porcentaje de pérdida de masa de las microcápsulas tres veces al día durante dos días. Cabe destacar que la prueba se realizó con tres muestras de microcápsulas para cada concentración de alginato.

3.3.3 Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga

Una vez realizada la optimización de parámetros de fabricación en las etapas anteriores, se procedió a evaluar la eficiencia de encapsulación de dicho proceso, utilizando una muestra de aceite esencial vegetal, en vez de aceite de oliva, siguiendo la metodología reportada por Alcantar (2014) y Natrajan (2015), con algunas modificaciones. Inicialmente, se midió la absorbancia del aceite con un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 220 Thermo Scientific), realizando un barrido en el rango de longitud de onda (190-700 nm) para determinar dónde se presenta el pico máximo de absorbancia del aceite. Posteriormente, se evaluaron tres solventes para el aceite (50% etanol (EtOH) en solución salina fosfatada (PBS), 1% Tween 80 en agua y 40% dimetilsulfóxido (DMSO) en agua) y se corrió la correspondiente curva estándar por espectrofotometría UV-Vis.

Después de determinar el solvente correcto, se midió la absorbancia de los estándares con concentraciones de aceite: 0.0, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 y 0.5 mg aceite/mL,

Para liberar el aceite encapsulado, se rompieron las microcápsulas utilizando el solvente apropiado y un homogeneizador ultrasónico (Fisher Scientific) durante dos minutos en un vaso de precipitado con hielo. El líquido de cada muestra se recuperó y centrifugó a 5000 rpm durante diez minutos, para separar el residuo sólido. Luego, se extrajo el sobrenadante y se midió la

absorbancia. La concentración de aceite se calculó a partir de la curva de estándar construida previamente. La eficiencia de encapsulación (EE) y la capacidad de carga (LC) se determinaron con base en las siguientes ecuaciones (Alcantar, 2014, Faidi et al., 2019):

$$EE(\%) = \frac{C_{total}}{C_{inicial}} \times 100 \quad (2)$$

donde C_{total} es la concentración total de aceite encapsulado (mg/mL) y $C_{inicial}$ es la concentración inicial de aceite utilizado para fabricar las microcápsulas (mg/mL).

$$LC(\%) = \frac{M_{aceite}}{M_{microcápsulas}} \times 100 \quad (3)$$

donde M_{aceite} es la masa de aceite encapsulado (mg) y $M_{microcápsulas}$ es la masa de la muestra de microcápsulas (mg).

4. Resultados y Discusión

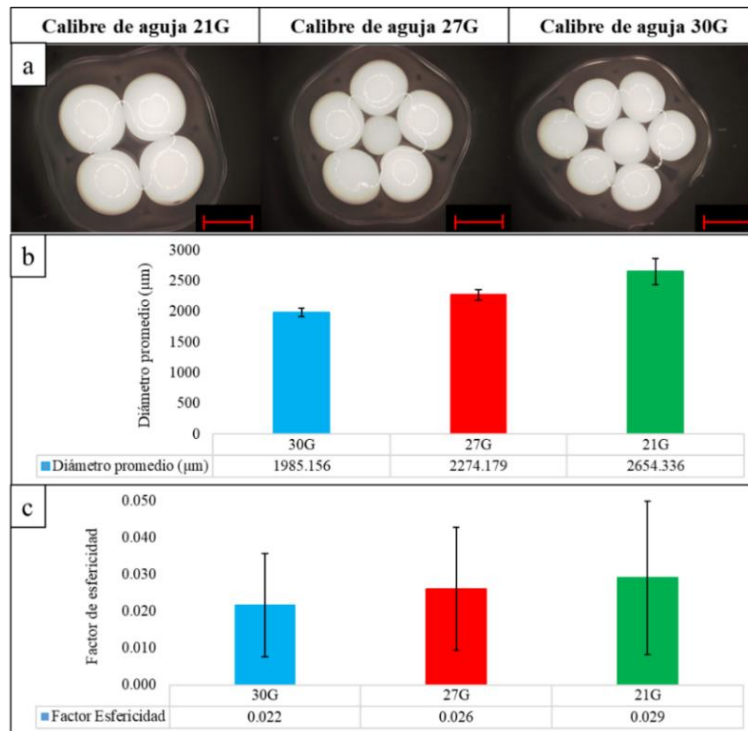
4.1 Caracterización preliminar de las microcápsulas

En la primera prueba preliminar se tomaron las micrográficas mostradas en la Figura 2a, donde se observa que las microcápsulas fabricadas con los 3 calibres de aguja presentaron una morfología esférica.

En la Figura 2b se puede observar que las microcápsulas más pequeñas se fabricaron con la aguja calibre 30G. La gráfica de la Figura 2c muestra que los tres calibres de aguja permiten fabricar microcápsulas con un factor de esfericidad menor a 0.05. Sin embargo, el calibre de aguja 30G no es intercambiable y solo permite usar jeringas con una capacidad volumétrica de 1 mL. Por esta razón, se decidió escoger el calibre de aguja 27G.

Figura 2.

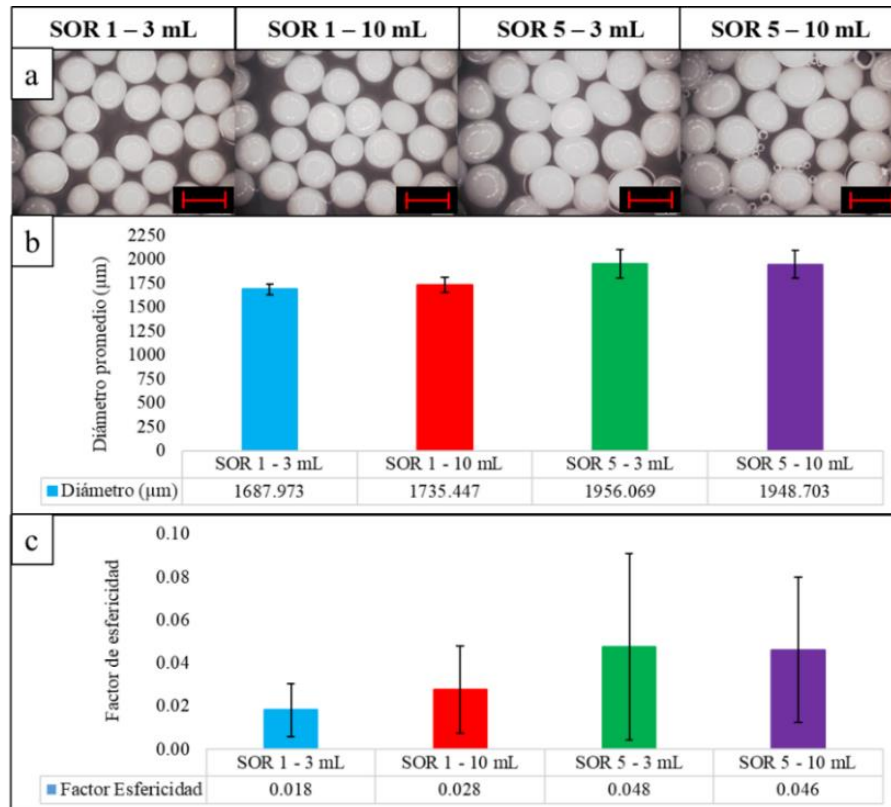
Micrografía (a), diámetro promedio (b) y factor de esfericidad (c) de las microcápsulas según el calibre de la aguja. Escala: 2000 μm . Las barras representan el promedio de 30 medidas.



A partir de la segunda prueba preliminar se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 3 donde no se observa una variación del diámetro promedio de las partículas cuando se varía la capacidad volumétrica de la jeringa (Figura 3b). Así mismo dichos resultados coinciden con lo reportado en Baranauskaite (2021), donde el diámetro de las microcápsulas es menor cuando el SOR disminuye, esto ocurre debido al aumento de la cantidad de surfactante (Tween 80) y aceite lo que produce que el SOR disminuya. En la Figura 3c el factor de esfericidad muestra que se obtuvieron partículas más esféricas con un SOR menor, además se observó que con un volumen de jeringa menor es posible obtener microcápsulas con un factor de esfericidad menor, es decir partículas más redondas.

Figura 3.

Micrografía (a) y diámetro promedio (b) de las microcápsulas según el SOR y la capacidad volumétrica de la jeringa. Escala: 2000 μm . Las barras representan el promedio de 30 medidas.



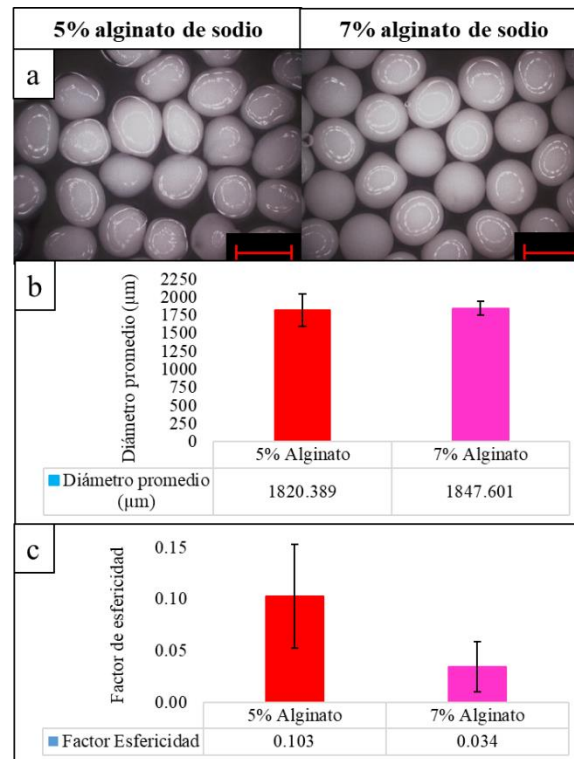
4.2 Desarrollo de un protocolo para la fabricación de microcápsulas de alginato de sodio:

4.2.1 Ajuste de la concentración de alginato de sodio (grado de laboratorio) en el precursor.

Una vez fue posible adquirir alginato de grado laboratorio, el primer paso para desarrollar el protocolo final de fabricación de las microcápsulas, fue el de seleccionar la concentración de alginato a usar en el precursor, y hacer el respectivo ajuste con base en lo observado en las pruebas preliminares. Se prepararon 8 soluciones de alginato de sodio, de las cuales se seleccionaron las concentraciones de 5% y 7% p/v de alginato para realizar el proceso de encapsulación, ya que fueron las formulaciones que presentaron mejores características para extrusión.

Figura 4.

Micrografía (a), diámetro promedio (b) y factor de esfericidad (c) de microcápsulas de 5% y 7% de alginato según la concentración de alginato de sodio. Escala: 2000 μm . Las barras representan el promedio de 30 medidas.



En la Figura 4a se muestran las micrografías de las microcápsulas fabricadas, a simple vista se observa que las partículas con 7% alginato son más esféricas en comparación con las microcápsulas de 5% de alginato. En la Figura 4c se observa el factor de esfericidad, las microcápsulas fabricadas con 5% alginato no cumplen con el factor de esfericidad definido (0.05). Además, en la Figura 4b no se observa una variación en el diámetro promedio de las microcápsulas.

4.2.2 Evaluación del efecto de los parámetros de fabricación en el tamaño y esfericidad de las microcápsulas obtenidas.

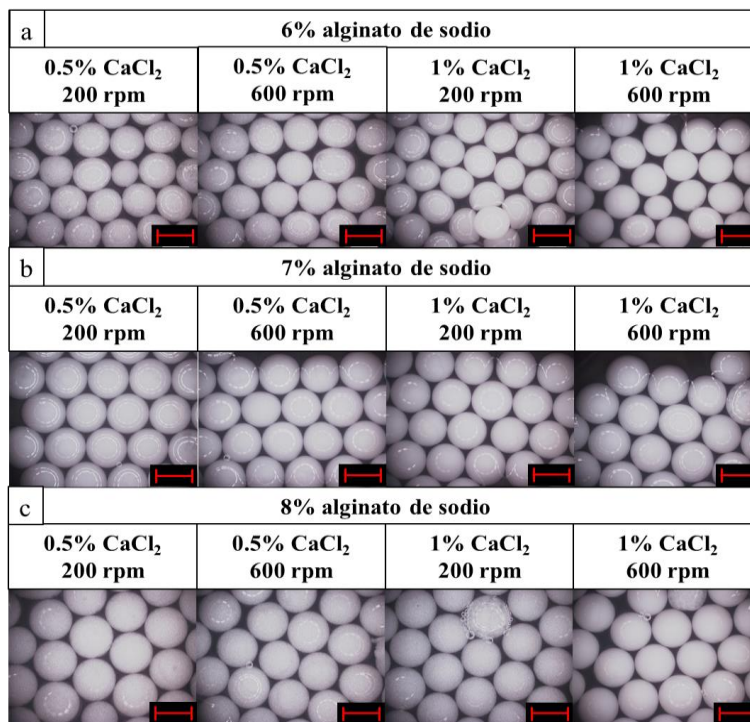
En primer lugar, se evaluaron tres factores: 1) concentración de alginato en el precursor: 6%, 7% y 8%; 2) concentración de CaCl_2 en el baño gelificante (0.5% y 1%); y 3) velocidad de

agitación del baño gelificante: 200 rpm y 600 rpm. Se fabricaron doce muestras diferentes, las cuales fueron después analizadas en términos de diámetro promedio y factor de esfericidad de las partículas.

En la Figura 5 se puede apreciar la morfología de las microcápsulas obtenidas con los diferentes valores de concentración de alginato, concentración de CaCl_2 y la velocidad de agitación del baño gelificante. Se observa que las microcápsulas son más pequeñas y menos redondas cuando la concentración de alginato disminuye. Por esta razón es importante encontrar un equilibrio entre estos dos parámetros. Según reporta Letocha (2022) la concentración de alginato tiene un efecto importante en el tamaño de las partículas, además una baja concentración del mismo produce microcápsulas no esféricas.

Figura 5.

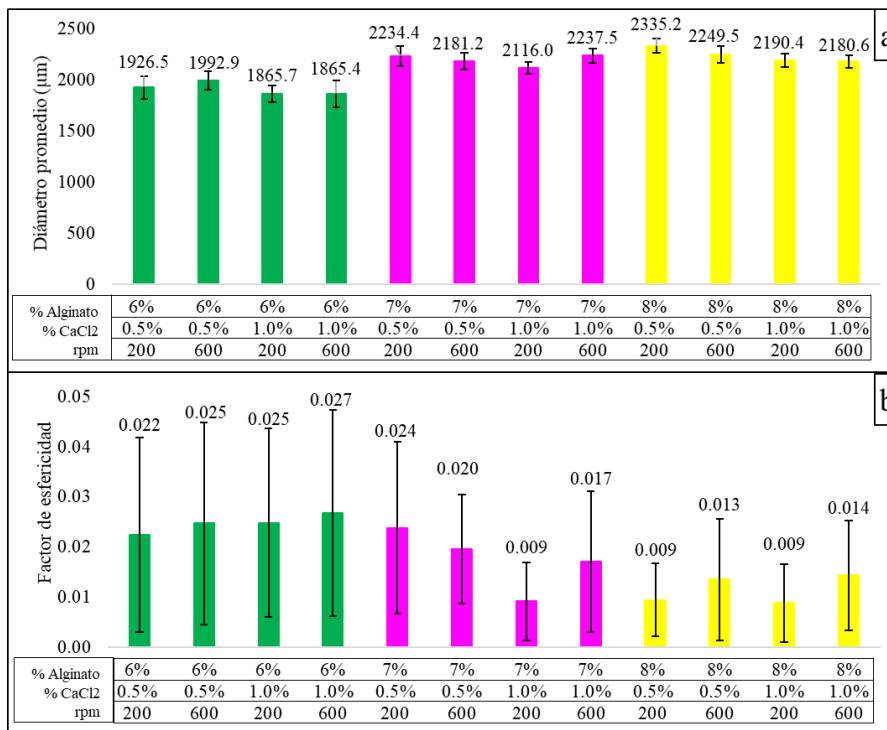
Morfología de las microcápsulas según la concentración de alginato, concentración de CaCl_2 y la velocidad de agitación del baño gelificante. Escala: 2000 μm .



En la Figura 6a se puede apreciar que las microcápsulas más pequeñas se fabricaron con una concentración de alginato de sodio del 6%. Por el tamaño de partícula se decidió descartar las formulaciones fabricadas con 8% alginato ya que no presentaron un cambio con respecto a las microcápsulas fabricadas con 7% alginato de sodio. La concentración del CaCl₂ y la velocidad del baño gelificante no presentaron ninguna tendencia con respecto al diámetro promedio de las microcápsulas.

Figura 6.

Efecto de la concentración de alginato de sodio, concentración de CaCl₂ y velocidad de agitación del baño gelificante en el diámetro promedio (a) y el factor de esfericidad (b). Las barras representan el promedio de 80 - 150 medidas.

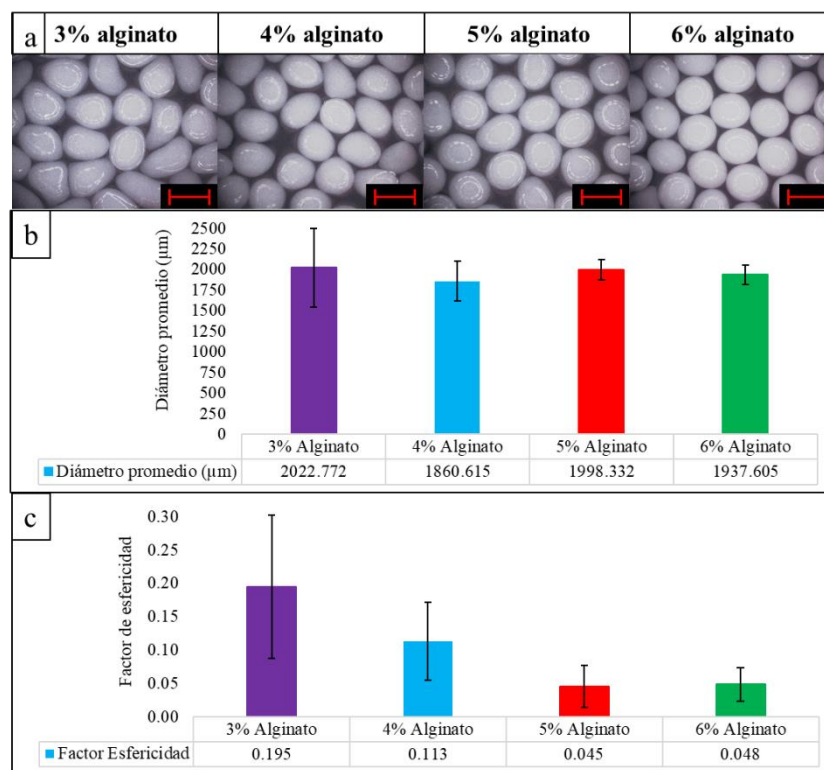


En la Figura 6b se puede observar que todas las muestras cumplen con un factor de esfericidad menor o igual a 0.05. Por esta razón, se decidió disminuir la concentración de alginato de sodio a 3%, 4%, 5% y 6% p/v para fabricar microcápsulas con un diámetro promedio menor.

En la Figura 7a se observan las micrografías que muestran la morfología de las microcápsulas fabricadas con 3%, 4%, 5% y 6% de alginato. A medida que aumenta la concentración de alginato se obtienen partículas más esféricas

Figura 7.

Micrografía (a), diámetro promedio (b) y factor de esfericidad (c) de las microcápsulas con 3%, 4%, 5% y 6% de alginato con calibre de aguja 30G. Escala: 2000 μm . Las barras representan el promedio de 140 medidas.

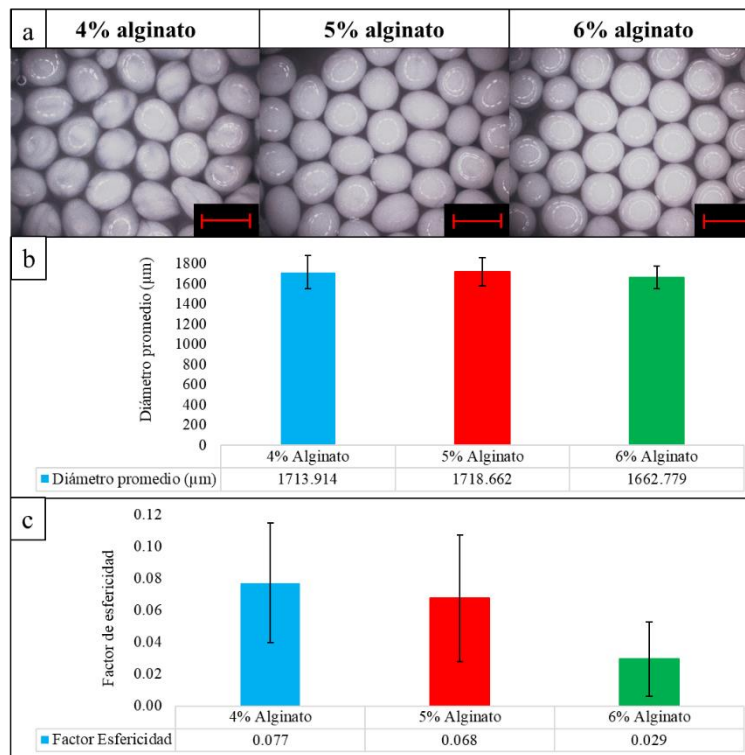


En la Figura 7b se observan los diámetros de las microcápsulas fabricadas, las de menor diámetro fueron las de 4% alginato de sodio. Sin embargo, las partículas fabricadas con 3% alginato son las que presentan un diámetro mayor, por esta razón se descartó el uso de la concentración de 3% alginato de sodio.

Por último, se analizó el efecto de las tres concentraciones de alginato (4%, 5% y 6% p/v) sobre el diámetro promedio y el factor de esfericidad. En la Figura 8a se muestran las microcápsulas fabricadas y cómo la concentración de alginato de sodio afecta la esfericidad de las partículas. Cabe destacar que las microcápsulas se fabricaron utilizando un calibre de aguja 34G para obtener un diámetro de partícula menor, pero dicho calibre de aguja no se consigue fácilmente en el mercado y son más costosas que el calibre de aguja 30G.

Figura 8.

Micrografía (a), diámetro promedio (b) y factor de esfericidad (c) de las microcápsulas de 4%, 5% y 6% p/v alginato de sodio con calibre de aguja 34G. Escala: 2000 μm . Las barras representan el promedio de 160 medidas.



En la Figura 8b se muestran los resultados obtenidos a partir de las microcápsulas fabricadas con 4%, 5% y 6% p/v alginato de sodio. Se puede observar que el diámetro promedio de las microcápsulas no presenta una tendencia cuando se varía la concentración de alginato de

sodio. Pero en la Figura 8c se observa que las microcápsulas fabricadas con 6% alginato de sodio son las únicas que cumplen con el factor de esfericidad menor a 0.05. De la misma forma, el diámetro promedio de las microcápsulas de 6% de alginato es menor comparado con los otros grupos; esto se debe a que al cumplir el factor de esfericidad los diámetros de las microcápsulas fabricada con 6% de alginato son más homogéneos en comparación con las partículas obtenidas con una concentración menor de alginato.

Con base en el análisis global de los resultados obtenidos de todos los experimentos realizados, se definieron las siguientes condiciones para el proceso de microencapsulación por emulsión de aceites vegetales a partir de alginato de sodio:

Tabla 9.

Parámetros definidos para la fabricación de microcápsulas de alginato de sodio para encapsulación de aceites vegetales.

Concentración de alginato de sodio	6% p/v
Concentración de aceite	0.04 g/mL
Concentración de Tween 80	0.12 g/mL
SOR	3
Concentración de CaCl₂	1%
Velocidad del baño gelificante	600 rpm
Calibre de aguja	30G

4.3 Cinética de degradación

Se evaluaron diferentes concentraciones de citrato trisódico: 1) se evaluaron cinco concentraciones 0.1, 0.03, 0.02 y 0.01 M, pero la degradación ocurría demasiado rápido; 2) se disminuyó la concentración a 0.001 con el objetivo de poder observar el proceso de degradación

por dos días. A partir de las pruebas realizadas, se definió que la concentración de citrato trisódico dihidratado que permitiría evaluar la cinética de degradación es 0.005 M. La cinética de degradación se analizó por medio de la pérdida de masa de las microcápsulas y se calculó el porcentaje de cambio de masa con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cambio de masa} = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100 \quad (4)$$

donde m_1 es la masa de microcápsulas en el tiempo actual (mg) y m_0 es la masa de microcápsulas en el tiempo anterior (mg).

En la Tabla 10 se muestra el promedio del porcentaje de cambio de masa de cada tipo de microcápsula, de acuerdo con el tiempo de inmersión en la solución 0.005 M de citrato trisódico. A partir de esos datos se obtuvo la gráfica mostrada en la Figura 9, donde primero se observa un hinchamiento de las microcápsulas en las primeras cinco horas, luego la pérdida de masa con un comportamiento constante por aproximadamente 15 horas y después de este tiempo se observa una disminución en el porcentaje de cambio de masa. Se observa que el comportamiento de la gráfica de las microcápsulas fabricadas con 6% alginato es más estable en comparación con las concentraciones menores (4% y 5% alginato). Por lo tanto, el efecto de la concentración de alginato en el precursor de las microcápsulas en la cinética de degradación indica una tendencia inversamente proporcional, es decir cuando la concentración de alginato es mayor, el porcentaje de cambio de masa es menor.

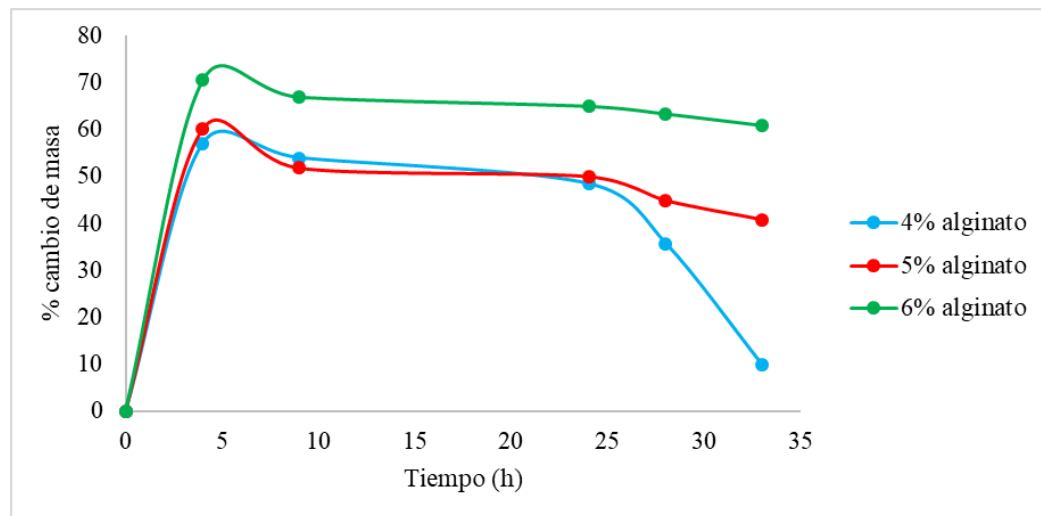
Tabla 10.

Porcentaje de cambio de masa para microcápsulas fabricadas a partir de precursores con concentración de alginato del 4, 5 y 6%.

Tiempo (h)	%Cambio masa 4% alginato	%Cambio masa 5% alginato	%Cambio masa 6% alginato
0	0.00	0.00	0.00
4	61.91 ± 4.91	60.15 ± 7.87	70.49 ± 1.05
9	53.92 ± 7.36	51.78 ± 5.60	66.91 ± 0.40
24	48.41 ± 10.42	49.95 ± 5.73	64.93 ± 0.57
28	35.63 ± 13.72	44.87 ± 5.65	63.30 ± 0.94
33	9.77 ± 31.71	40.81 ± 8.10	60.84 ± 2.10

Figura 9.

Efecto de la concentración de alginato en el porcentaje de cambio de masa de las microcápsulas durante la prueba de cinética de degradación.



4.4 Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga

De acuerdo con las referencias estudiadas, la absorbancia de los aceites esenciales se puede medir en un rango de longitud de onda entre 190 - 300 nm (Alcantar, 2014, Dima et al., 2016, Muresan et al., 2023).

En la Figura 10 se muestran las gráficas de absorbancia vs longitud de onda obtenidas con una concentración de 0.1785 mg/mL del aceite esencial con los 3 solventes, donde se observa que los espectros para los solventes 40% DMSO y 1% Tween 80 no se presentan un pico de absorbancia máximo para medir el aceite esencial. Sin embargo, en el espectro del solvente 50% EtOH en PBS se observa un pico de absorbancia máximo en 208 nm para la muestra problema de aceite esencial. Debido a lo expuesto se decidió utilizar el solvente 50% EtOH en PBS para obtener la curva estándar (Figura 11) y para determinar la cantidad de aceite esencial en las microcápsulas.

Figura 10.

Espectros de absorbancia vs longitud de onda de los solventes estudiados con una concentración de 0.1785 mg/mL de aceite esencial.

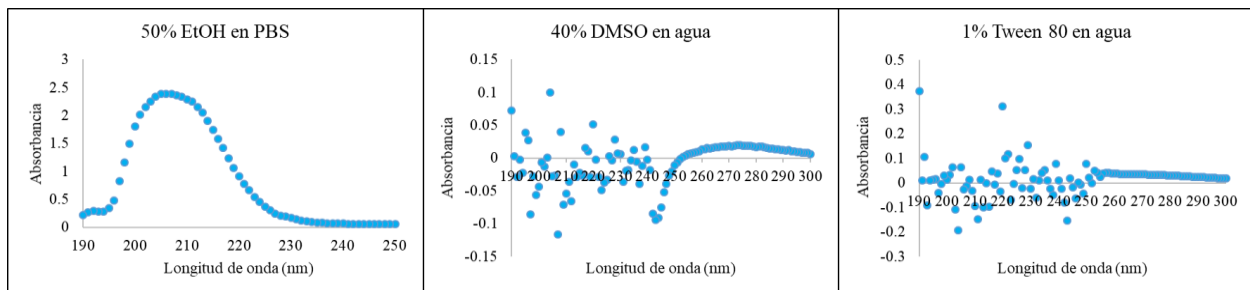
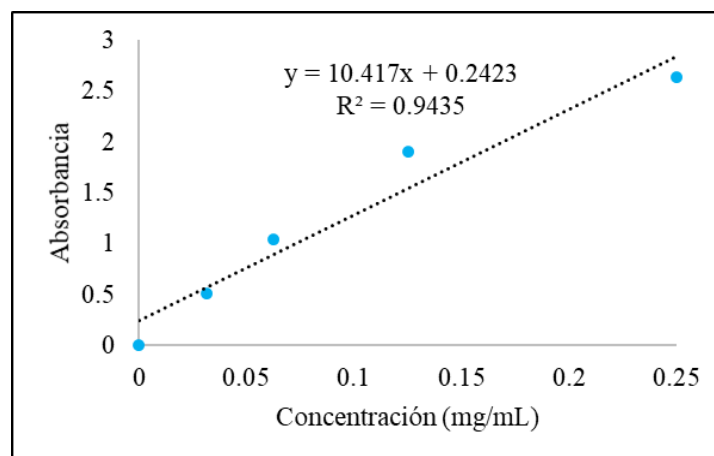


Figura 11.

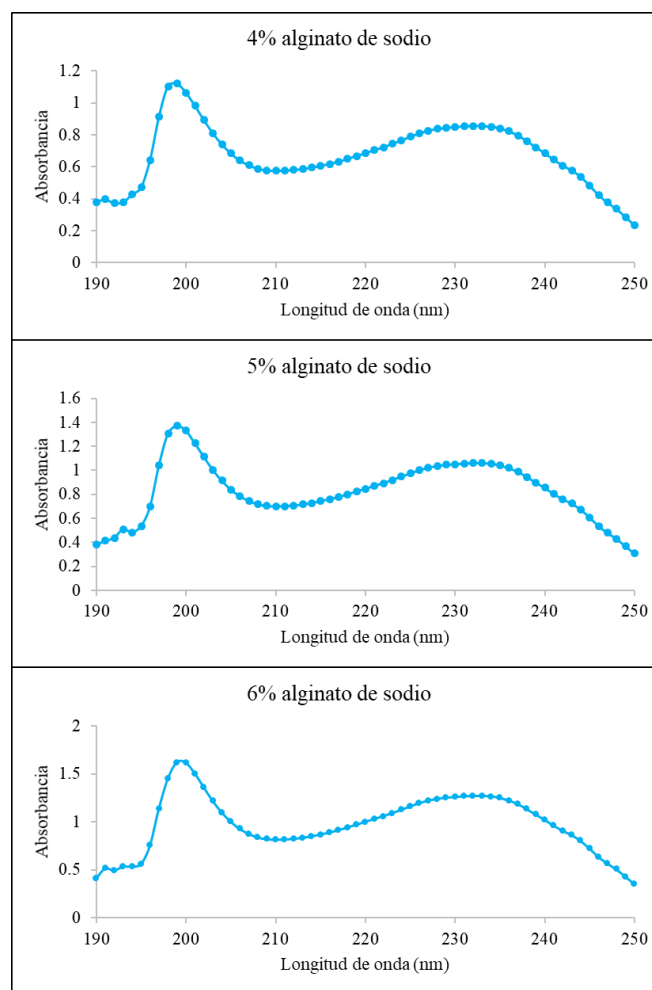
Curva estándar de la muestra problema de aceite esencial 50% EtOH en PBS.



Una vez verificado que se podía obtener una curva estándar consistente utilizando el 50% EtOH en PBS, se procedió a triturar las microcápsulas en dicho solvente, para extraer el aceite encapsulado previamente. Usando el espectrofotómetro UV-Vis, se obtuvieron los siguientes espectros para cada concentración de alginato de sodio:

Figura 12.

Espectros de absorbancia vs longitud de onda de las microcápsulas 4%, 5% y 6% alginato de sodio.



Como se puede apreciar en la Figura 12, en los espectros obtenidos no se observa el pico de absorbancia de la muestra problema de aceite esencial en 208 nm, por lo tanto, no fue posible calcular la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga de las microcápsulas.

Esto se debe a que durante el proceso de trituración de las microcápsulas en el solvente 50% EtOH en el PBS, al utilizar el homogeneizador ultrasónico, el EtOH se calienta, a pesar de realizar dicho procedimiento con el solvente frío y en un vaso de precipitado lleno de hielo. Lo anterior produce la degradación del aceite esencial y por lo tanto no es posible leer la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis.

A partir de los resultados obtenidos en la Figura 12, se realizó una revisión bibliográfica para determinar que compuestos se estaban leyendo en la longitud de onda de 199 nm y 232 nm. Según reporta Kolotova (2023) se puede obtener el pico máximo de absorbancia en 197 nm para una solución de alginato de sodio. Y a partir de lo reportado por Wuelfing (2006) es posible medir la absorbancia del Tween 80 (Polisorbato 80) en el mismo rango de longitud de onda en el que se midió la muestra problema de aceite esencial. La longitud de onda para medir este surfactante depende de la concentración y la marca del mismo, en este caso el Tween 80 de la marca Sigma Aldrich se mide a 234 nm con una concentración 0.1% p/p.

5. Conclusiones

Los diferentes experimentos realizados permitieron definir las condiciones necesarias para la fabricación de las microcápsulas con una morfología esférica y un tamaño de partícula pequeño. Los mejores resultados se presentaron fabricando microcápsulas con una concentración de alginato de sodio grado laboratorio (Sigma Aldrich, viscosidad baja) del 6% p/v, una concentración de aceite de 0.04 g/mL, SOR (Surfactant to Oil Ratio) de 3, un baño gelificante al 1% p/v de CaCl_2 , agitado a 600 rpm y utilizando una jeringa de 1 mL con una aguja calibre 30G. Con las condiciones mencionadas fue posible obtener microcápsulas con un diámetro promedio alrededor de 1800 a 2000 μm .

Las variables con las que se observó una mayor variación del diámetro promedio y el factor de esfericidad fueron la concentración de alginato de sodio, el SOR y el calibre de la aguja. La concentración de alginato de sodio afecta la morfología y el tamaño de las microcápsulas, al disminuir dicha concentración, las partículas presentan una morfología ovalada, lo cual produce que no se cumpla el factor de esfericidad establecido. Además, el diámetro promedio aumenta debido a dicha deformación en las microcápsulas. Por esta razón, se escogió la concentración de 6% p/v alginato de sodio ya que permite obtener un factor de esfericidad menor al 0.05 y un diámetro promedio menor.

Las mediciones de la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga se vieron afectadas por el proceso de trituración de las microcápsulas, ya que el solvente utilizado se calentó

al utilizar el homogeneizador ultrasónico y esto produjo la degradación del aceite esencial, por lo tanto, fue imposible medir la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis.

El estudio de la degradación de las microcápsulas mostró que el tiempo de hinchamiento de las microcápsulas sin importar la concentración de alginato es aproximadamente 5 horas, después de este tiempo se observó la disminución del cambio de masa de las partículas, donde la velocidad de degradación aumenta cuando la concentración de alginato de sodio disminuye.

Recomendaciones

En el futuro, se podría evaluar un proceso controlado de atomización del precursor, con el fin de estudiar la posibilidad de obtener un diámetro promedio menor para las microcápsulas fabricadas.

Por otra parte, se podría explorar el uso de alginato de mayor peso molecular, con el fin de obtener precursores más viscosos con concentraciones menores de alginato, lo cual disminuiría la tasa de hinchamiento de las cápsulas, y por ende, su tamaño final.

Para la medición de la eficiencia de encapsulación, se recomienda experimentar con otros procesos alternativos a la trituración, buscando minimizar el calentamiento de las muestras y así reducir el efecto negativo en la composición del aceite esencial.

Referencias Bibliográficas

- Alcantar, M. A. (2014). Preparación y caracterización de microcápsulas de alginato y mucílago de nopal que contiene aceite esencial de limón por gelificación iónica. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/2010
- Azad, A. K., Al-Mahmood, S. M. A., Chatterjee, B., Wan Sulaiman, W. M. A., Elsayed, T. M., & Doolaanea, A. A. (2020). Encapsulation of Black Seed Oil in Alginate Beads as a pH-Sensitive Carrier for Intestine-Targeted Drug Delivery: In Vitro, In Vivo and Ex Vivo Study. *Pharmaceutics*, 12(3), 219. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030219>
- Balanč, B., Kalušević, A., Drvenica, I., Coelho, M. T., Djordjević, V., Alves, V. D., Sousa, I., Moldão-Martins, M., Rakić, V., Nedović, V., & Bugarski, B. (2016). Calcium-Alginate-Inulin Microbeads as Carriers for Aqueous Carqueja Extract. *Journal of food science*, 81(1), E65–E75. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13167>
- Baranauskaite, J., Ockun, M. A., Uner, B., Tas, C., & Ivanauskas, L. (2021). Effect of the Amount of Polysorbate 80 and Oregano Essential Oil on the Emulsion Stability and Characterization Properties of Sodium Alginate Microcapsules. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(20), 6304. <https://doi.org/10.3390/molecules26206304>
- Bannikova, A., Evteev, A., Pankin, K., Evdokimov, I., Kasapis, S. (2018). Microencapsulation of fish oil with alginate: In-vitro evaluation and controlled release, *LWT*, Volume 90, Pages 310-315, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.045>.
- Berraaouan, D., Essifi, K., Addi, M., Hano, C., Fauconnier, M.-L., & Tahani, A. (2023). Hybrid Microcapsules for Encapsulation and Controlled Release of Rosemary Essential Oil. *Polymers*, 15(4), 823. <https://doi.org/10.3390/polym15040823>

- Chan, E. (2011). Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties, *Carbohydrate Polymers*.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.015>
- Dima, C., Pătrașcu, L., Cantaragiu, A., Alexe, P., Dima, S. (2016). The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules, *Food Chemistry*, Volume 195, Pages 39-48, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.044>.
- Faghmous, N., Bouzid, D., Boumaza, M., Touati, A. & Boyron, O. (2021) Optimization of chitosan-coated W/O/W multiple emulsion stabilized with Span 80 and Tween 80 using Box–Behnken design, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 42:10, 1566-1578, DOI: 10.1080/01932691.2020.1774387
- Faidi, A., Lassoued, M.A., Becheikh, M.E.H, Touati, M., Stumbé, J.F., Farhat, F. (2019). Application of sodium alginate extracted from a Tunisian brown algae *Padina pavonica* for essential oil encapsulation: Microspheres preparation, characterization and in vitro release study, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 136, Pages 386-394, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.023>.
- Flamminii, F., Paciulli, M., Di Michele, A., Littardi, P., Carini, E., Chiavaro, E., Pittia, P., Di Mattia, C. (2021). Alginate-based microparticles structured with different biopolymers and enriched with a phenolic-rich olive leaves extract: A physico-chemical characterization, *Current Research in Food Science*, Volume 4, 2021, Pages 698-706, ISSN 2665-9271, <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.10.001>

- Fuentes, E., Báez, M.E., Bravo, M. (2012). Determination of Total Phenolic Content in Olive Oil Samples by UV–visible Spectrometry and Multivariate Calibration. *Food Anal. Methods* 5, 1311–1319. <https://doi-org.bibliotecavirtual.uis.edu.co/10.1007/s12161-012-9379-5>
- Fujiwara, GM, Campos, R., Costa, CK, Dias, JDFG, Miguel, OG, Miguel, MD, & Zanin, SMW. (2013). Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmasterol through the external ionic gelation technique. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49 (3), 537-547. <https://www.scielo.br/j/bjps/a/bVC3tR6GN8FmDmvxc5PHwSx/?lang=en>
- Gholamian, S., Nourani, M., Bakhshi, N. (2021). Formation and characterization of calcium alginate hydrogel beads filled with cumin seeds essential oil, *Food Chemistry*, Volume 338, 021, 128143, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128143>.
- Hosseini, S. M., Hosseini, H., Mohammadifar, H. A., Mortazavian, A. M., Mohammadi, A., Khosravi-Darani, K., Shojaee-Aliabadi, S., Ramin, S. D. (2013). Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 62, 2013, Pages 582-588, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.054>.
- Kolotova, D. S., Borovinskaya, E. V., Bordiyan, V. V., Zuev, Y. F., Salnikov, V. V., Zueva, O. S., & Derkach, S. R. (2023). Phase Behavior of Aqueous Mixtures of Sodium Alginate with Fish Gelatin: Effects of pH and Ionic Strength. *Polymers*, 15(10), 2253. <https://doi.org/10.3390/polym15102253>
- Łętocha, A., Miastkowska, M., & Sikora, E. (2022). Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Polymers*, 14(18), 3834. <https://doi.org/10.3390/polym14183834>

- Mania S, Tylingo R, Michałowska A. The Drop-in-Drop Encapsulation in Chitosan and Sodium Alginate as a Method of Prolonging the Quality of Linseed Oil. *Polymers (Basel)*. 2018 Dec 6;10(12):1355. doi: 10.3390/polym10121355. PMID: 30961280; PMCID: PMC6402032.
- Matera, R., Lucchi, E., & Valgimigli, L. (2023). Plant Essential Oils as Healthy Functional Ingredients of Nutraceuticals and Diet Supplements: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(2), 901. <https://doi.org/10.3390/molecules28020901>
- Muñoz, B. I., Sandoval, O., Meléndez, N. J., Hahn, F., Valle, S. (2022). Release kinetics modeling and fungal control potential of encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil. *Revista Bio Ciencias* 9, e1168. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1168>
- Muresan, S. M. C., Dreanca, A., Repciuc, C., Dejescu, C., Rotar, O., Pop, R. A., Pantea, S., Pall, E., Ciotlaus, I., Sarosi, C., Mohan, A. G., Moldovan, M., & Oana, L. (2023). Dental Hydrogels with Essential Oils with Potential Activity in Periodontitis. *Applied Sciences*, 13(3), 1787. <https://doi.org/10.3390/app13031787>
- Nasri, H., Baradaran, A., Shirzad, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. *International journal of preventive medicine*, 5(12), 1487–1499.
- Natrajan, D., Srinivasan, S., Sundar, K., Ravindran, A. (2015). Formulation of essential oil-loaded chitosan–alginate nanocapsules, *Journal of Food and Drug Analysis*, Volume 23, Issue 3, Pages 560-568, ISSN 1021-9498, <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.001>.
- Patole, V.C. & Pandit, A.P. (2018). Mesalamine-loaded alginate microspheres filled in enteric coated HPMC capsules for local treatment of ulcerative colitis: in vitro and in vivo

- characterization. *J. Pharm. Investig.* 48, 257–267 (2018). [https://doi-org.bibliotecavirtual.uis.edu.co/10.1007/s40005-017-0304-1](https://doi.org/bibliotecavirtual.uis.edu.co/10.1007/s40005-017-0304-1)
- Ramsey, J. T., Shropshire, B. C., Nagy, T. R., Chambers, K. D., Li, Y., & Korach, K. S. (2020). Essential Oils and Health. *The Yale journal of biology and medicine*, 93(2), 291–305. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32607090/>
- Rodrigues, D., Ambrosi, A., Di Luccio, M. (2022). Encapsulated essential oils: A perspective in food preservation, *Future Foods*, Volume 5, 2022, 100126, ISSN 2666-8335, <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100126>.
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133–1174. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/md13031133>
- Wu, Z., Su, X., Xu, Y., Kong, B., Sun, W., & Mi, S. (2016). Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation. *Scientific reports*, 6, 24474. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27091175/>
- Wuelfing, W. P., Kosuda, K., Templeton, A. C., Harman, A., Mowery, M. D., & Reed, R. A. (2006). Polysorbate 80 UV/vis spectral and chromatographic characteristics--defining boundary conditions for use of the surfactant in dissolution analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(3), 774–782. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.020>